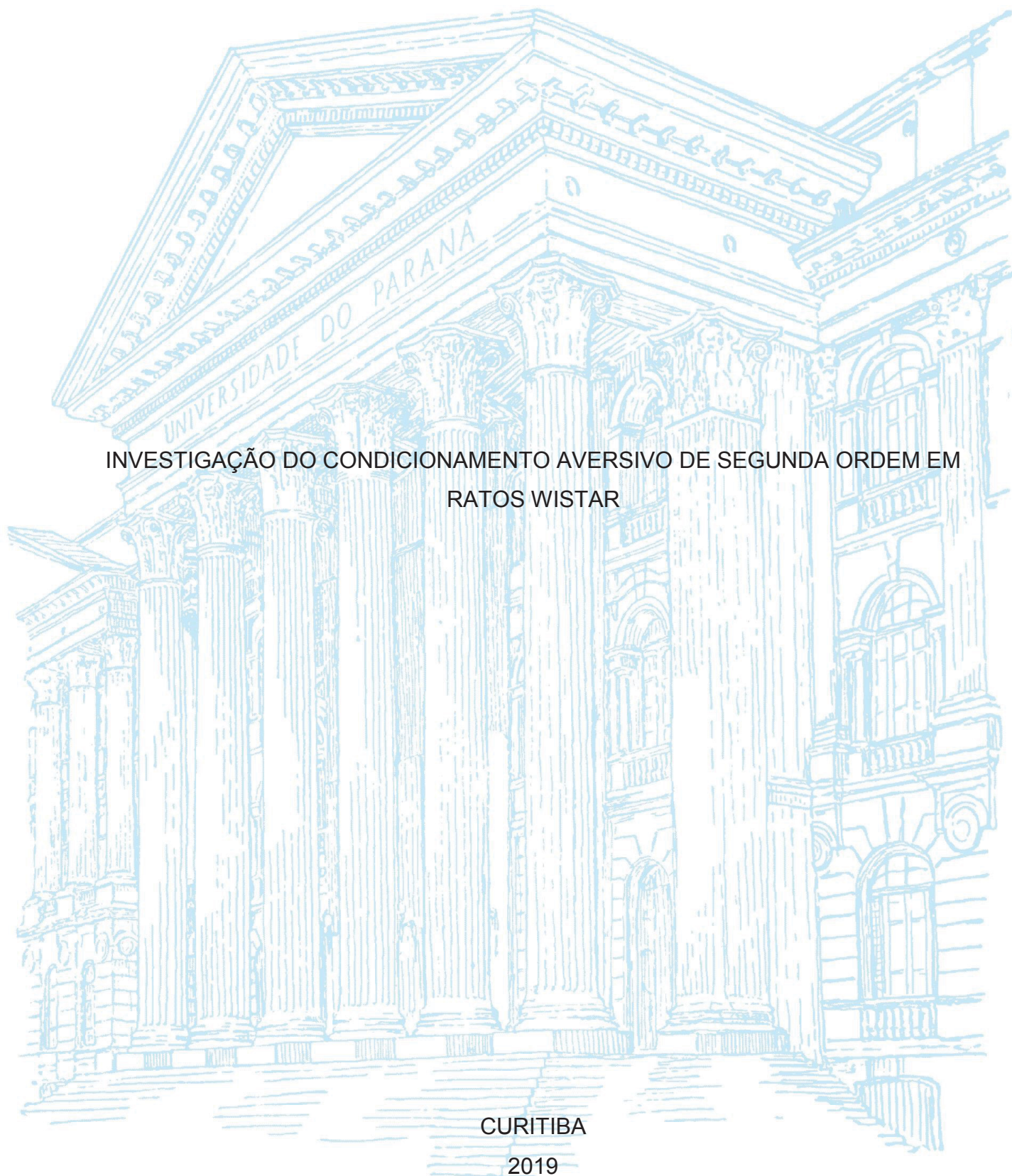


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REBECA BUEST DE MESQUITA SILVA



INVESTIGAÇÃO DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO DE SEGUNDA ORDEM EM
RATOS WISTAR

CURITIBA

2019

REBECA BUEST DE MESQUITA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO DE SEGUNDA ORDEM EM
RATOS WISTAR

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia, no Programa de Pós- Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.º Drº Bruno Jacson Martynhak
Coorientadora: Prof.ª Drª Cristina A. J. Stern

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Silva, Rebeca Buest de Mesquita
Investigação do condicionamento aversivo de segunda ordem em ratos
Wistar. / Rebeca Buest de Mesquita Silva. – Curitiba, 2019.
72 p.: il.

Orientador: Bruno Jacson Martynhak
Coorientadora: Cristina A.J. Stern
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Transtornos de estresse pós-traumáticos 2. Estímulos aversivos 3.
loimbina 4. Condicionamento (Psicologia) I. Título II. Martynhak, Bruno
Jacson III. Stern, A. J. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.8521
612.8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **REBECA BUEST DE MESQUITA SILVA**, intitulada: **INVESTIGAÇÃO DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO DE SEGUNDA ORDEM EM RATOS WISTAR**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2019.



BRUNO JACSON MARTYNHAK
Presidente da Banca Examinadora



MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Avaliador Interno (UFPR)



ROBERTO ANDREATINI
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por esse sonho realizado, pelo sustento e pela força durante a realização desse trabalho. **“Tudo posso naquele que me fortalece”**. Filipenses 4:13.

À minha família, deixo meu agradecimento por todo o suporte, conselhos, amor e paciência durante esse período. Dedico esse trabalho a vocês!

Agradeço ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Bruno Jacson Martynhak pela orientação e assistência durante a realização desse trabalho. À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Cristina A. J. Stern, obrigada pelo auxílio e idéias durante esse estudo.

Aos meus colegas de laboratório, obrigada pela ajuda nos momentos difíceis dos meus experimentos! Todo sucesso para vocês!

À banca (Prof^o Dr^o Marcelo de Meira Santos Lima e Prof^o Dr^o Roberto Andreatini) pelas contribuições para este trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia, aos professores do departamento, a todos os técnicos e colegas de pós graduação pelo auxílio e pelo conhecimento adquirido durante esse processo.

À CAPES, pelo financiamento.

Obrigada!

RESUMO

O transtorno do estresse pós traumático (TEPT) é uma doença psiquiátrica que desenvolve-se quando o indivíduo presencia uma situação traumática e reage anormalmente ao trauma. Em modelo animal o TEPT pode ser estudado através de modelos de condicionamento aversivo, pela apresentação de um estímulo condicionado (neutro) e um estímulo incondicionado (valor biológico relevante). Nessa associação, o animal tem uma resposta condicionada na presença do estímulo neutro. Um condicionamento observado nos pacientes é o condicionamento de segunda ordem (segundo estímulo condicionado poderá ser associado ao primeiro estímulo condicionado neutro). Quando tal condicionamento ocorre, a resposta condicionada é formada, mesmo se não foi associado com o estímulo incondicionado. Esse condicionamento é importante, pois pistas que não estavam associadas com o evento traumático poderão ser incorporadas à memória traumática, podendo “reativar” a experiência traumática. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de condicionamento de segunda ordem em ratos Wistar. O estímulo incondicionado foi o choque nas patas dos animais e o estímulo condicionado foi o contexto do condicionamento e o acetato de isoamila (líquido com odor de banana). A resposta condicionada foi avaliada pelo tempo de congelamento no contexto do choque (contexto A) ou no contexto neutro na presença do odor (contexto C). O primeiro experimento foi o de validação do condicionamento ao odor, onde os animais foram condicionados ao contexto com o odor. No dia seguinte, os animais foram expostos ao contexto C na presença do odor. Foi observado um aumento no tempo de congelamento nos animais condicionados ao odor em comparação com os animais que não receberam o odor. O segundo experimento teve como objetivo promover o condicionamento de segunda ordem pelo pareamento da resposta de medo no contexto A com o odor, sendo os animais posteriormente testados na presença de odor no contexto C. O tempo de congelamento no contexto C dos animais que passaram pela seção de evocação na presença do odor não diferiu dos animais cuja memória foi evocada na ausência do odor. Os experimentos seguintes tiveram como objetivo fortalecer o pareamento do condicionamento com o odor, mas sem causar generalização da memória aversiva. Os animais receberam ioimbina (1 mg/kg, ip) ou salina logo após o condicionamento e/ou logo após a seção de evocação. Em outro experimento os animais receberam uma administração de 2 mg/kg ou 3 mg/kg de ioimbina após a evocação. Em outro experimento, os animais passaram por duas sessões em dias consecutivos de pareamento entre contexto aversivo (contexto A) e odor. Finalmente, no último, o odor foi apresentado em um diferente contexto após a evocação da memória. Nenhum destes protocolos induziram o condicionamento de segunda ordem. Nesse estudo, verificou-se que a administração de ioimbina em diferentes doses, administrada após o condicionamento ao medo e/ou após a evocação, a reexposição ao odor e a apresentação de um novo estímulo durante a janela de reconsolidação não foram suficientes para levar ao condicionamento de segunda ordem, sugerindo que existem mecanismos distintos da reconsolidação para a formação do condicionamento de segunda ordem.

Palavras chave: Transtorno do Estresse Pós Traumático. Memória aversiva. Condicionamento ao medo. Ioimbina. Condicionamento de segunda ordem.

ABSTRACT

Post traumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatry disorder that develops when the individual experience a traumatic situation and reacts abnormally to the trauma. In animal model, PTSD can be studied in aversive conditioning models, by the presentation of a conditioned stimulus (neutral) and an unconditioned stimulus (high biological value). In this association, the animal has a conditioned response in the presence of the neutral stimulus. A form of conditioning observed in patients is the second order conditioning (when a second conditioned stimulus is associated to the first conditioned neutral stimulus). When this conditioning happens, the conditioned response is formed, even when there is no association with the unconditioned stimulus. This conditioning is important, because clues that were not associated with the trauma has the power to “reactivate” the traumatic memory. The objective of this study was to investigate the occurrence of second order conditioning in Wistar rats. The unconditioned stimulus was the foot shock and the conditioned stimulus was the context of the conditioning and the isoamyl acetate (liquid with a banana odour). The conditioned response was evaluated by the time of freezing in the context of the shock (context A) or in the neutral context in the presence of odour (context C). The first experiment was the validation of odour conditioning, where the rats were conditioned to the context with the odour. In the next day, rats were exposed to context C in the presence of odour. The results showed increased freezing time in conditioned rats to the odour in comparison to the rats that did not receive the odour. The second experiment had the objective to promote the second order conditioning by the pairing of the response to fear to the odour in context A, where the rats were posteriorly tested with the odour in context C. The freezing time of the rats that went through retrieval in the presence of the odour in context C did not differ from the rats whose memory were retrieved in the absence of odour. The next experiments had as objective to strengthen the association of conditioning and the odour, but without generate generalization of the aversive memory. The rats received yohimbine (1 mg/kg, ip) or vehicle after the conditioning and/or after the retrieval session. In other experiment the animals received yohimbine (2 mg/kg or 3 mg/kg, ip) after retrieval. In another experiment, rats received two pairings in consecutive days between the context A and odour. The last experiment attempt to create the second order conditioning by the presentation of odour in a different context after the retrieval of memory. None of the protocols induced second order conditioning. Through this study we observed that the administration of yohimbine in different doses, administrated after fear conditioning and/or retrieval, the reexposure to the odour and the presentation of a new stimulus during memory reconsolidation were not sufficient to create second order conditioning, which indicates that there are distinct mechanisms between memory reconsolidation and the formation of second order conditioning.

Key-words: Post traumatic stress disorder. Aversive memory. Fear conditioning. Yohimbine. Second order conditioning.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM	20
FIGURA 2: APARATO COMPORTAMENTAL – CONTEXTO A	35
FIGURA 3: APARATO COMPORTAMENTAL – CONTEXTO C	35
FIGURA 4: DESENHO EXPERIMENTAL DO CONDICIONAMENTO DE PRIMEIRA ORDEM.....	37
FIGURA 5: DESENHO EXPERIMENTAL DO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM.....	38
FIGURA 6: DESENHO EXPERIMENTAL DA ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA E GENERALIZAÇÃO	39
FIGURA 7: DESENHO EXPERIMENTAL DA ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA APÓS O CONDICIONAMENTO E EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA	40
FIGURA 8: DESENHO EXPERIMENTAL DA ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA APÓS A EVOCAÇÃO	41
FIGURA 9: DESENHO EXPERIMENTAL DA REEXPOSIÇÃO AO ODOR COMO MODELO DO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM E DO TEPT	42
FIGURA 10: DESENHO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3E	43
FIGURA 11: DELINEAMENTO EXPERIMENTO DO EXPERIMENTO 1	45
FIGURA 12: GRÁFICO DO CONDICIONAMENTO DE PRIMEIRA ORDEM	46
FIGURA 13: GRÁFICO DA SESSÃO DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA	47
FIGURA 14: GRÁFICO DO TESTE COM ODOR APÓS A SESSÃO DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA	49
FIGURA 15: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 2.....	50
FIGURA 16: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 2	51
FIGURA 17: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3 ^a	53
FIGURA 18: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3 ^a	53
FIGURA 19: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3B	56
FIGURA 20: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3B	57
FIGURA 21: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3C	60
FIGURA 22: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3C	60
FIGURA 23: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3D.....	61
FIGURA 24: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3D	62
FIGURA 25: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3E	65

FIGURA 26: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3E	65
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PROTOCOLO DO CONDICIONAMENTO AO MEDO.....	33
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MEMÓRIA	13
1.1.2 FASES DA MEMÓRIA	13
1.3 TRANTORNO DO ESTRESSE PÓS TRAUMÁTICO (TEPT).....	15
1.4 MODELO ANIMAL DE MEMÓRIA AVERSIVA.....	17
1.5 TEPT E CONDICIONAMENTO AO MEDO	18
1.6ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	22
1.7 FISIOPATOLOGIA DO TEPT	27
1.8 DESCRIÇÃO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 ANIMAIS.....	33
3.2 ESTÍMULO INCONDICIONADO	33
3.3 ESTÍMULO CONDICIONADO	33
3.4 DROGAS.....	34
3.5 APARATOS COMPORTAMENTAIS	34
3.6 EXPERIMENTOS.....	35
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DO CONDICIONAMENTO AO ODOR	45
EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM.....	49
EXPERIMENTO 3 ^a : A ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA NA FASE DE CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA LEVA A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO.....	52
EXPERIMENTO 3B: A ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA APÓS O CONDICIONAMENTO E A EVOCAÇÃO COM O ODOR NÃO LEVA AO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM.....	56
EXPERIMENTO 3C: A ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA APÓS A EVOCAÇÃO NÃO INDUZ O CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM	59

EXPERIMENTO 3D: A REEXPOSIÇÃO DO ODOR NA EVOCAÇÃO NÃO LEVA AO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM.....	61
EXPERIMENTO 3E: A EXPOSIÇÃO DO ODOR NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO PROMOVE O CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM.....	64
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

A memória pode ser definida como um conjunto de informações que são adquiridas e armazenadas e lembradas durante a vida. A memória é capaz de nos definir como indivíduos, o que preferimos, as habilidades que possuímos, e estão de certa forma “enraizadas” nas memórias de longo prazo. A memória é essencial para a nossa sobrevivência (MCGAUGH, 2013).

As memórias não são capazes de serem observadas diretamente, e essa observação ocorre através do comportamento humano e animal. Durante o processo de aprendizagem, estruturas cerebrais relacionadas com o armazenamento de memórias são modificadas, podendo durar por muito tempo (LALUMIERE, MCGAUGH & MCINTYRE, 2017).

1.1.1 FASES DA MEMÓRIA

Para uma memória ser lembrada, existe uma sequência de fases que são necessárias para que o aprendizado seja primariamente adquirido. A primeira fase é a aquisição da memória, seguida pela consolidação da memória. A próxima fase é a evocação da memória.

1.1.1.1 AQUISIÇÃO

A aquisição da memória se refere a uma experiência que é adquirida pelo indivíduo, e tal experiência é capaz de produzir um aprendizado. As informações primárias são levadas para estruturas encefálicas importantes para a memória, através de órgãos sensoriais (SILVA, 2016), que envolvem o olfato, a visão, o tato e a audição. Nesta fase, as informações são obtidas e se forem relevantes para o indivíduo, ou de grande valência emocional, são armazenadas e passam para a fase de consolidação.

1.1.1.2 CONSOLIDAÇÃO

A consolidação é a fase onde a memória de curto prazo é convertida em uma memória persistente, a memória de longo prazo. Alguns autores também relacionam a fase da consolidação com a formação de uma memória, antes lábil, agora estável e resiliente à transformações (ALBERINI, 2008).

Para uma memória ser consolidada é necessária a síntese de várias proteínas, sendo que nesse processo, várias estruturas cerebrais estão interconectadas e inúmeros passos moleculares são necessários para que ocorra o armazenamento dessa memória (IZQUIERDO et al, 2013).

Entre os processos moleculares necessários para que uma memória se consolide, encontra-se a potenciação de longo prazo (do termo em inglês LTP – *long term potentiation*). A LTP foi descrita por Bliss e Lomo (1973), que descobriram que períodos de estimulação de uma alta frequência levavam ao aumento do potencial sináptico na região do giro denteado quando era estimulado o caminho perforante do córtex entorrinal. Esse fenômeno levou a idéia de que a LTP estava envolvida com o processo de consolidação da memória de longo prazo (VOLIANSKIS et al, 2015).

Hoje, sabe-se que a modificação de sinapses ocorre através da ativação por receptores do glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid). Após a ativação do receptor AMPA, ocorre o influxo de Na^+ e K^+ que levam a despolarização da membrana plasmática. O canal NMDA é bloqueado pelo Mg^{2+} , e quando ocorre a despolarização, o Mg^{2+} é liberado, permitindo o influxo de Na^+ e K^+ e a passagem de Ca^{2+} . Após a passagem de Ca^{2+} , ocorre a ativação da CaMKII (quinase II dependente de cálcio calmodulina) que por sua vez leva ao aumento do espinho dendrítico (NICOLL, 2017).

Nas últimas décadas, têm se usado inibidores de síntese proteica para a identificação de vias intracelulares que estariam relacionadas com o armazenamento e consolidação de memórias. Muitos fatores de transcrição, receptores de neurotransmissores e fatores de crescimento foram relacionados com o armazenamento das memórias, entre eles, respectivamente: CREB (do inglês - *cAMP response element binding*), zif 268 (do inglês – *Zinc finger protein 268*), nur 77 (do inglês - *Nerve growth factor IB*) receptores da acetilcolina $\alpha 7$ e BDNF (do inglês – *Brain derived neurotrophic factor*) (ALBERINI, 2008). Uma vez que ocorre a inibição de uma proteína específica dentro de uma cascata intracelular, investiga-se o papel

daquela proteína, ou fator de transcrição sobre o processo de aprendizado daquele animal.

Depois que a consolidação é processada, a memória armazenada pode ser posteriormente recuperada, ou evocada.

1.1.1.3 EVOCAÇÃO

A fase da evocação consiste na recuperação da informação que foi armazenada anteriormente. Nessa fase, a memória pode ser capaz de desencadear respostas comportamentais e fisiológicas e poderá ser reconsolidada (MOURA, 2016; GONCZAROWSKA, 2016).

Nesse contexto de aprendizado, diferentes memórias podem ser formadas, como a memória de trabalho, memória espacial e também as memórias emocionais, onde estão classificadas as memórias aversivas.

A memória aversiva é o termo utilizado que se refere a aquisição, armazenamento e evocação de comportamentos que induzem ou aumentam o medo (IZQUIERDO, FURINI & MYSKIW, 2016). Evidências já mostraram que as memórias emocionais são lembradas mais facilmente do que outros tipos de memória (MCGAUGH, 2013).

A formação de uma memória aversiva pode levar ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos relacionados a trauma e estressores, como o transtorno do estresse pós traumático.

1.2 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS TRAUMÁTICO (TEPT)

O TEPT é uma doença psiquiátrica que por muito tempo foi negligenciada pela população médica. No contexto histórico, a investigação de “neuroses traumáticas”, como eram chamados os quadros de estresse após um trauma, surgiu perto dos anos 1970 quando os psiquiatras começaram a observar os veteranos que retornaram da guerra do Vietnã. A partir desse momento, surgiu a necessidade de introduzir um diagnóstico para tais indivíduos que apresentassem sintomas decorrentes de um estresse intenso, onde foi inserido no DSM-III (Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais, 3ª Edição - 1980), publicado pela APA (Associação Psiquiátrica Americana), as características específicas dos sintomas de estresse que eram

manifestadas por esses indivíduos. Portanto, o diagnóstico do TEPT como uma desordem psiquiátrica passou a ser feito apenas na década de 80 (SBARDELLOTO, 2011; VANELZAKKER et al, 2014).

Historicamente, um indivíduo que apresentasse tal transtorno passava por uma situação de “vergonha social” relacionada a ocorrência do evento traumático testemunhado, em especial a população feminina que passasse por uma situação traumática. De acordo com estudos epidemiológicos, os dados mostram que existe uma prevalência de 1.3 – 12.2% de tal desordem na população em geral, porém, esses números mudam de acordo com a população analisada. O TEPT é mais prevalente em mulheres do que em homens, e geralmente está associado a outras doenças psiquiátricas, como a depressão e desordens de ansiedade. Em termos de saúde pública, a doença tem alto custo, pois leva na maior parte dos casos à perda da produtividade e o tratamento em si tem um custo elevado (PARSONS & RESSLER, 2013; LOPRESTO, SCHIPPER & HOMBERG, 2016; FENSTER et al, 2018).

O TEPT está classificado nos transtornos relacionados a traumas e estressores no DSM-V (Manual Diagnóstico e Estatístico de Desordens Mentais, 5ª Edição - 2013) e o diagnóstico é feito segundo alguns critérios, como:

A. Exposição a um evento concreto ou ameaça de morte, lesão grave ou violência sexual. Nesse critério, o indivíduo pode ter vivenciado diretamente o trauma ou testemunhado tal evento com outras pessoas;

B. Presença de sintomas intrusivos relacionados com o trauma, como lembranças angustiantes, manifestação de medo intenso e presença de reações fisiológicas marcadas a pistas internas que possuem semelhanças ao evento traumático que ocorreu;

C. Esquiva persistente dos estímulos associados com o trauma;

D. Alterações na cognição e humor;

E. Alterações na reatividade associada ao evento traumático, como problemas relacionados ao sono, hipervigilância e surtos de raiva.

Segundo o DSM-V, o TEPT ainda pode ser classificado como dissociativo, com sintomas de despersonalização ou desrealização.

O indivíduo que possui o TEPT, portanto, presencia uma situação traumática que pode ser psicológica e/ou física e no desenvolvimento da doença, ocorre uma reação anormal ao trauma presenciado (ALBERINI, 2011). As características apresentadas pelos pacientes mostram que existe uma heterogeneidade de sintomas

e conseqüentemente, a população que possui tal desordem também possui características diferentes entre si.

1.2.1 GENERALIZAÇÃO

Um aspecto importante apresentado pelos pacientes que possuem o TEPT, é a generalização. A generalização é definida como uma situação de medo que ocorre durante uma condição segura, que se assemelhou com a experimentada durante o evento traumático. Um indivíduo que não possui o transtorno é capaz de distinguir a situação nova, que, por mais que seja semelhante à situação traumática, não é exatamente a mesma situação. No entanto, os indivíduos que possuem o TEPT, possuem uma reatividade elevada frente a essas situações aversivas. Esses pacientes possuem uma sensibilidade aumentada a estímulos que não estavam presentes durante o trauma inicial, e essa característica prejudica a terapia de exposição nesses indivíduos. Estudos anteriores mostraram que esse déficit apresentado pelos pacientes com o transtorno pode ser decorrente de um distúrbio apresentado pelo padrão de separação do hipocampo (LOPRESTO, SCHIPPER & HOMBERG, 2016).

1.3 MODELO ANIMAL DE MEMÓRIA AVERSIVA

Embora existam outros modelos animais relacionados com o estudo de memórias aversivas, o mais utilizado é o modelo de condicionamento ao medo. Tal modelo foi desenvolvido a partir do condicionamento proposto por Ivan Pavlov em 1927 (PAVLOV, 1927), pioneiro do estudo do condicionamento de primeira ordem, onde ocorre a associação de um estímulo condicionado com um estímulo incondicionado, e é observada a resposta condicionada do animal.

Pavlov desenvolveu o condicionamento aversivo através da associação de um estímulo neutro, chamado de estímulo condicionado (CS – do inglês *Conditioned stimulus*), com um estímulo que possui um valor biológico relevante o estímulo incondicionado (US – do inglês *Unconditioned stimulus*). Em seus experimentos iniciais, ele utilizou os cães como modelo animal, e associou um metrônomo (CS) com um ácido diluído com sabor azedo (US), colocando tal estímulo incondicionado na língua dos animais. A resposta apresentada pelo animal era de uma resposta

condicionada (CR), por exemplo: se o CS era um alimento apetitoso (pó de carne), a resposta produzida pelo animal seria a salivação; se era apresentado um estímulo aversivo (como o sabor azedo) o animal chacoalhava a cabeça, fazia movimentos de salivação, e movia a língua para expelir algo tóxico (VAN ELZAKKER et al, 2014).

Quando o estímulo condicionado neutro, é emparelhado com o estímulo incondicionado ocorre o desenvolvimento de uma resposta condicionada (CR) ao CS. O condicionamento que ocorre por meio da associação entre US – CS é chamado de condicionamento de primeira ordem (GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

Esse comportamento observado pelos animais ocorre quando um estímulo condicionado como um som, uma luz, um odor ou um ambiente específico é associado com um estímulo incondicionado (alimento ou um choque) e então é formada uma CR (como a esquivas) ao estímulo através da apresentação do CS na ausência do US.

A CR induz mudanças comportamentais como o congelamento e fisiológicas como, alterações na frequência cardíaca e respiratória e ocorrência de sobressaltos (GIUSTINO & MAREN, 2015).

Após o pareamento entre CS-US, o estímulo antes neutro (CS) é capaz de evocar o comportamento de medo que ocorre na presença do US, tornando-se um estímulo condicionado. Esse condicionamento já foi observado em diferentes filós como em moscas, caracóis, peixes, ratos, cães, macacos e seres humanos. (LEDOUX, 2000).

Através do condicionamento pavloviano, começou a se estudar a neurobiologia da memória, em particular, os mecanismos de aquisição, de armazenamento (consolidação) e representação (evocação) das memórias aversivas, de desordens de ansiedade como também de transtornos relacionados a traumas e estressores, como o TEPT.

1.4 TEPT E CONDICIONAMENTO AO MEDO

Sabe-se que o organismo assimila que um determinado estímulo condicionado prediz o estímulo incondicionado (PARSONS & RESSLER, 2013). Dessa maneira, quando um estímulo condicionado é associado com um estímulo biológico importante, neste caso, o estímulo incondicionado, é formada uma resposta condicionada.

Nos indivíduos afetados pelo TEPT, ocorre uma experimentação repetida dos sintomas relacionados com o trauma inicial, e as respostas relacionadas ao medo são mantidas por muito tempo. Nos pacientes que sofreram um trauma, considera-se como o estímulo incondicionado o estresse, ou seja, a situação traumática que foi vivenciada pelo indivíduo, sendo que a expressão do medo diante de pistas associadas ao trauma, é considerada como a resposta condicionada. Nos pacientes com TEPT esse tipo de condicionamento é muito claro, onde condições que estejam relacionadas com o estresse inicial podem tornar-se um estímulo incondicionado, e dessa forma, são capazes de alcançar as características do evento traumático inicial (WESSA e FLOR, 2007).

Em relação ao modelo animal, a exposição de um animal a um estímulo incondicionado leva à expressão de uma resposta de medo, nesse caso o comportamento de congelamento (do inglês – *freezing*) (PAMPLONA et al, 2006; ABRARI et al, 2008). O comportamento de congelamento é evidenciado pela ausência de movimentos musculares, com a presença apenas de movimentos respiratórios pelo animal que apresenta o medo (IZQUIERDO et al, 2016).

1.4.1 CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

Existe um segundo tipo de condicionamento, chamado de condicionamento de segunda ordem ou condicionamento de ordem superior, que sugere-se estar presente nos pacientes que apresentam o TEPT. Neste condicionamento ocorre a evocação ou expressão da memória aversiva em condições não diretamente associadas ao trauma.

No condicionamento de segunda ordem (Figura 1), um segundo estímulo condicionado (CS2 – odor, por exemplo) poderá ser associado ao CS1 (primeiro estímulo condicionado – contexto, por exemplo). O condicionamento de segunda ordem acontecerá quando o CS2 promover a mesma CR produzida pelo CS1, mesmo que o CS2 não tenha sido associado com o US (PASCHALL e DAVIS, 2002; PINENO et al, 2007; STICHT et al, 2015). No aspecto clínico, o condicionamento de segunda ordem é importante pois relaciona o reforço efetivo do comportamento humano utilizando os estímulos neutros, que não possuem um significado biológico natural (PINEÑO et al, 2007).

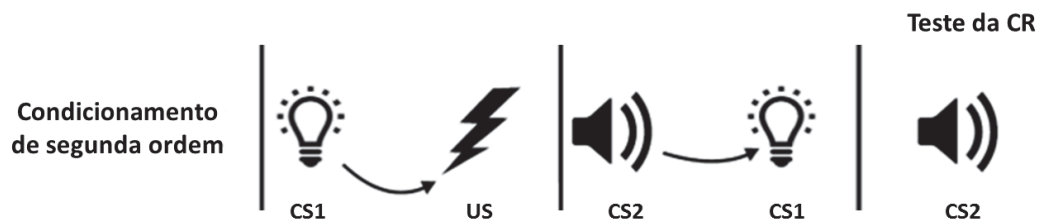


FIGURA 1: CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

A imagem acima mostra o condicionamento de segunda ordem, onde um primeiro estímulo (CS1 - LUZ) é associado com o choque (US). Em um segundo momento, um segundo estímulo (CS2 – SOM) é associado com o CS1. Em seguida é realizado o teste para verificar a resposta frente ao CS2, a fim de identificar a ocorrência do condicionamento de segunda ordem.

FONTE: TODD et al, 2016 (ADAPTADA PELA AUTORA)

Os pacientes com TEPT aprendem que pistas podem ser associadas ao trauma, mesmo não sendo pistas que estavam presentes durante o evento traumático, e dessa forma, o condicionamento de segunda ordem é um mecanismo pelo qual uma experiência traumática é gerada por meios de sinais neutros (PARKES e WESTBROOK, 2011).

Um estudo realizado por Wessa & Flor (2007) utilizou como condicionamento diferencial uma imagem específica de um trauma como US e representações gráficas como CS em pacientes com TEPT, pacientes com trauma, mas sem TEPT e indivíduos controle. Os resultados desse estudo mostraram que os pacientes com TEPT e com trauma mas sem TEPT, adquiriram um condicionamento à pista mostrada, indicando a ocorrência de um condicionamento de segunda ordem. Os indivíduos com TEPT adquiriram uma resposta aversiva quando um estímulo condicionado neutro (CS2) foi associado com o (CS1), e quando foi testada a extinção do medo nesses indivíduos, foi observado que a mesma estava prejudicada (PARKES e WESTBROOK, 2011).

Os autores sugerem que esses achados indicam que o TEPT pode ser mantido pelo condicionamento de segunda ordem quando pistas que tenham relação com o trauma sirvam de CS. Quando tal condicionamento ocorre, são geradas respostas emocionais para pistas que eram relativamente neutras, e esse mecanismo poderá impedir a extinção da memória aversiva.

Alguns estudos realizados com o condicionamento de segunda ordem utilizaram como CS o odor. Paschall e Davis em 2002 demonstraram que pistas olfativas pareadas com o choque nas patas de ratos da linhagem *Sprague Dawley* são

efetivas para potencializar a resposta do sobressalto acústico. A resposta de sobressalto consiste na apresentação repetida de um som intenso para os animais. Foi evidenciado a ocorrência do condicionamento de segunda ordem utilizando como CS1 o acetato de amila (odor de banana 5%) e uma luz como CS2. Através desse experimento os autores observaram uma potencialização da resposta do sobressalto acústico quando foi feita a apresentação da luz para os animais. Os autores também testaram a luz como CS1 e como CS2 o odor de banana (5%). Foi demonstrado que ocorreu o condicionamento de segunda ordem porém a resposta de sobressalto acústico não foi potencializada quando o odor foi apresentado para os animais. Tal resultado indica que o odor de banana pode ser utilizado como estímulo condicionado para a formação do condicionamento de segunda ordem.

Já Kroon e Carobrez em 2008 demonstraram o condicionamento de segunda ordem pela associação entre o odor de café e choque nas patas de ratos Wistar e posterior associação com um contexto não pareado com o choque. Nesse estudo foi utilizado como US um choque nas patas e como CS1 o odor de café (15 g). Para testar a expressão do condicionamento ao odor, os autores utilizaram a caixa do odor e os animais foram testados a partir da esquivada ao odor de café e ao odor neutro. Num primeiro momento os animais passaram pelo teste CS1, para verificar o *approach time* (tempo que os animais ficam próximos ao odor – distância de 7cm), *hide time* (tempo que o animal fica no compartimento escuro) e *head-out* (tempo em que o animal se estende do compartimento fechado em direção ao compartimento aberto) para o odor de café na caixa do odor. No dia seguinte, foi realizado o teste para o CS2, quando um odor neutro foi colocado no compartimento claro e foi medido os parâmetros de *approach time*, *hide time* e *head out* a fim de verificar a esquivada frente a um odor não pareado com o US. O resultado observado pelos autores foi a diminuição do *approach time*, aumento do *hide time* e aumento do *head out* quando os animais passaram pelo teste CS2, indicando que o odor neutro não pareado com o US levou ao condicionamento de segunda ordem pela esquivada dos animais na caixa do odor.

Tais estudos mostram a importância do estudo do condicionamento de segunda ordem utilizando como CS o odor, a fim de esclarecer como tal estímulo pode elicitar respostas de medo.

1.5 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

As abordagens terapêuticas para os pacientes com TEPT envolvem a terapia de exposição, e buscam diminuir as respostas aversivas na presença de estímulos relacionados ao trauma original, onde duas terapias são utilizadas na clínica: a terapia da extinção e o bloqueio da reconsolidação.

1.5.1 EXTINÇÃO

A terapia de extinção envolve a apresentação do CS por repetidas vezes na ausência do US (BOUTON et al, 2011; VANELZAKKER et al, 2014). A extinção cria uma nova memória que de certa forma, existe simultaneamente com a memória original traumática (PONNUSAMY et al, 2016). No caso de modelos animais, o comportamento de congelamento reduz gradativamente conforme a apresentação repetida ao CS. Poderia-se imaginar que o processo de extinção levaria à redução do tempo de congelamento por alterar a memória original. Porém, estudos sugerem que a extinção não modifica a memória traumática inicial, mas leva a uma nova aprendizagem que inibe transitoriamente o medo, sendo que esse novo aprendizado é dependente de um contexto específico (BOUTON et al, 2011).

Quando a memória de medo é formada e é observada a resposta condicionada do animal frente ao estímulo condicionado, pode ser realizada a extinção dessa resposta quando o CS é exposto ao animal por repetidas vezes. Porém, a resposta condicionada “extinta” pode retornar ao animal, e esse fenômeno pode ocorrer via reinstalação, renovação ou recuperação da memória (GIUSTINO & MAREN, 2015).

O fenômeno de reinstalação ocorre quando o animal é exposto novamente a um US. A recuperação espontânea da memória pode ocorrer após a passagem do tempo e a renovação da memória poderá ocorrer após a apresentação do CS fora do contexto em que foi realizada a extinção (GIUSTINO & MAREN, 2015; WICKING et al, 2016), mostrando que a extinção é dependente de um contexto específico.

Os pacientes com TEPT passam pela psicoterapia, onde é feita a exposição da memória traumática. Se a memória de medo for atualizada, a resposta de medo poderá ser alterada. A psicoterapia para o TEPT é conhecida como terapia focada ao

trauma, e existem terapias específicas como a exposição prolongada (EP), terapia de processamento cognitivo (CPT) e a terapia cognitiva comportamental focada no trauma (TF-CBT) (SMITH et al, 2017).

A EP é uma terapia recomendada pela *Veterans Health Administration and Department of Defense* (VA/DoD) e pela APA, e busca a alteração de estruturas relacionadas com o medo, onde é necessário que esta estrutura seja ativada para que novas informações sejam incorporadas. Geralmente são necessárias de 8-15 sessões para que o tratamento seja concluído. Os pacientes aprendem algumas reações comuns a traumas, exercícios de respiração e uma exposição *in vivo* e imaginária, que caracteriza a terapia de exposição. Na exposição *in vivo*, os pacientes são auxiliados a abordarem situações, pessoas e lugares que eles evitam por causa do trauma. Já na exposição imaginária, o paciente lembra de pensamentos e emoções que estão envolvidos com o trauma. Após a terapia, os pacientes narram e gravam o evento traumático para que em casa seja feita também a exposição imaginária (WATKINS et al, 2018).

A CPT também é recomendada pela APA e VA/DoD para os pacientes que possuem o TEPT. Essa terapia é mais focada no trauma, e é baseada na teoria cognitiva social, onde após um trauma, os pacientes buscam uma resposta para o evento traumático que ocorreu, e muitas vezes desenvolvem pensamentos distorcidos sobre si, sobre outras pessoas, e sobre o mundo. Muitas vezes os pacientes assimilam o evento (eu não me defendi o suficiente e então fui o culpado – por exemplo, em um assalto), ou se acomodam após um trauma (eu não consegui me prevenir frente ao assalto) ou ainda se acomodam em excesso (fui assaltado e então não posso confiar em mais ninguém). O objetivo da CPT é identificar os pensamentos distorcidos dos pacientes e modificar a visão do indivíduo em relação à acomodação (WATKINS et al, 2018).

Do mesmo modo a TP-CBT é recomendada pela APA e VA/DoD e está envolvida com técnicas relacionadas a exposição e técnicas cognitivas, como a reestruturação cognitiva. A técnica de exposição envolve a exposição imaginária, e exposição aos estímulos relacionados ao trauma *in vivo*, como também a exposição a “gatilhos emocionais” que lembrem o paciente do trauma sofrido. A técnica de reestruturação cognitiva foca nos pensamentos disfuncionais dos pacientes (WATKINS et al, 2018).

A terapia de extinção/exposição é o padrão-ouro de tratamento de distúrbios de ansiedade e para o TEPT, porém muitos pacientes têm uma extinção prejudicada, não respondem à terapia, ou após a terapia ocorre o retorno dos sintomas relacionados ao trauma (MAHAN & RESSLER, 2012; KING et al, 2018). No presente, tem-se buscado o uso de fármacos que melhorem a extinção. Lucas e equipe (2018) mostraram que a prazosina, um antagonista α_1 , quando administrada localmente na BLA (Complexo Basolateral da Amígdala) ou de forma sistêmica, antes do condicionamento ao medo, facilitou a extinção do medo em camundongos C57Bl/6N. Quando a administração foi feita antes da extinção, não foi observado uma redução do freezing dos animais.

Sendo a terapia de exposição (como a extinção da memória) o padrão ouro de tratamento para o TEPT, é essencial o estudo dos mecanismos que envolvem a aquisição desse aprendizado.

1.5.2 BLOQUEIO DA RECONSOLIDAÇÃO

O bloqueio da reconsolidação, é uma estratégia utilizada para enfraquecer diretamente a memória original em um nível menos aversivo (HAUBRICH et al, 2015). Quando o CS é apresentado novamente para um animal, após o condicionamento, a memória passa por um período de reativação, um estado lábil, onde a mesma pode ser reconsolidada, ou a reconsolidação poderá ser bloqueada com o uso de agentes farmacológicos, ou ainda poderá ocorrer a extinção dessa memória após a sua reativação (VAN ELZAKKER et al, 2014).

Um estudo mostrou que pacientes com TEPT (Wood et al, 2015) não tiveram os seus sintomas reduzidos quando utilizaram D-cicloserina, um agonista parcial do NMDA, ou Mifepristona, um antagonista glicocorticoide ou Propranolol, um bloqueador beta adrenérgico. Tais fármacos foram administrados no momento da reativação da memória traumática. Os resultados observados mostram que o bloqueio da reconsolidação não foi efetivo nos pacientes com TEPT. Tal estudo indica que os mecanismos que envolvem o bloqueio da reconsolidação não são tão simples quanto na teoria, e que a modificação de uma memória traumática é mais complexa do que se imaginava.

Já na clínica, a reconsolidação geralmente envolve a reativação da memória traumática e então essa memória é manipulada, geralmente com o uso de agentes farmacológicos. Em seguida os pacientes são testados para se ocorreu a reconsolidação da memória (AGREN, 2014). É possível realizar a reconsolidação através da psicoterapia, onde ocorre a incorporação de pistas imprevisíveis na memória traumática, para que a amígdala seja ativada e para que se inicie o processo de reconsolidação. Estudos sugerem que deve-se ativar os estados afetivos, onde emoções positivas seriam necessárias para que a memória de medo seja reconsolidada com informações seguras (SMITH et al, 2017).

É importante salientar que as psicoterapias utilizadas como a terapia de exposição e o uso de agentes farmacológicos para bloquear a reconsolidação não modificam a memória original traumática, e é fundamental a busca por novas alternativas terapêuticas, tanto fármacos que melhorem a extinção quanto fármacos mais seletivos para bloquear a reconsolidação que atuem na memória traumática e que diminuam os sintomas apresentados pelos indivíduos com TEPT.

1.6 SISTEMA OLFATÓRIO

O olfato é um sistema sensorial de grande importância em roedores, em especial os camundongos e ratos. Os roedores utilizam esse sistema sensorial para identificar seus predadores, localizar seu alimento, estabelecer hierarquia sociais, entre outros comportamentos realizados por esses animais. O uso de odores para identificação de comportamentos específicos servem para a construção de paradigmas importantes para avaliar o desenvolvimento de doenças psiquiátricas e de processos relacionados a memória (HUCKINGS, LOGAN & SANCHEZ-ANDRADE, 2013).

O sistema olfatório detecta e processa os estímulos olfatórios através dos neurônios olfatórios, que transmitem essa informação para o bulbo olfatório, e depois para a amígdala, sem passar pelo tálamo. A amígdala, por sua vez, conecta-se com o hipocampo, que tem um papel fundamental nos processos que envolvem o aprendizado e a memória (WIEMERS, SAUVAGE & WOLF, 2014).

O odor é um estímulo que possui a capacidade de ativar o sistema hipotalâmico medial, envolvido em respostas relacionadas ao medo de forma intrínseca (KROON e CARABEZ, 2008).

A conexão existente entre a amígdala e o sistema olfatório sugerem que um determinado odor tem um acesso exclusivo para a amígdala, e para o condicionamento ao medo, isso é de grande importância, pois o uso do odor como estímulo condicionado permite o melhor entendimento de como estas estruturas cerebrais contribuem para os processos relacionados com a memória (SEVELINGES, 2009).

Trabalhos anteriores com voluntários, mostraram a importância do sistema olfatório para o reconhecimento de memórias. Neste contexto, foi mostrado que: um odor funciona como pista para a evocação da memória; um odor pode aumentar a memória dependente do contexto quando comparadas a pistas visuais; as memórias ativadas por odores são mais “antigas” e mais emocionais do que as memórias ativadas por pistas verbais e as memórias aversivas reativadas por odores são mais desagradáveis e detalhadas do que as ativadas por pistas verbais (WIEMERS, SAUVAGE & WOLF, 2014).

Em vista disso, os odores servem como importantes pistas sensoriais para a evocação de memórias traumáticas, como aquelas formadas pelo condicionamento ao medo.

1.6.1 SUBSISTEMAS OLFATÓRIOS

Os roedores possuem quatro subsistemas olfatórios: o epitélio olfatório principal (MOE), o órgão vomeronasal (VNO), o órgão septal (SO) e o Gânglio de Grueneberg (GG) (HUCKINGS, LOGAN & SANCHEZ-ANDRADE, 2013).

O MOE é o maior subsistema olfatório de roedores, e é responsável pela detecção de odores neutros. Os neurônios sensoriais olfatórios projetam seus axônios para o bulbo olfatório, e através de uma sinapse com neurônios de segunda ordem, a informação segue para outras regiões corticais que estão envolvidas com a percepção e discriminação olfatória. O VNO detecta odores relacionados com o comportamento inato, como os feromônios e cairomônios, os quais passam pelo bulbo olfatório acessório, que projeta-se para o hipotálamo, através da amígdala. O SO possui

neurônios mecanossensoriais e detectam os odores através do fluxo de ar. Já o GG tem um envolvimento com o comportamento inato. Um estudo em camundongos com ablação de neurônios GG, mostrou ausência de congelamento quando os animais foram expostos a feromônios voláteis (HUCKINGS, LOGAN & SANCHEZ-ANDRADE, 2013).

Tendo em vista a conexão entre essas regiões – bulbo olfatório e amígdala - entende-se que se faz necessário o entendimento dos processos relacionados com a aquisição da memória aversiva tendo como o estímulo condicionado o odor.

1.7 FISIOPATOLOGIA DO TEPT

Estudos têm mostrado que o TEPT é uma desordem de circuito, onde várias regiões cerebrais possuem algum tipo de disfunção na sua atividade e conectividade. Uma região que está envolvida com o transtorno é o sistema límbico, estrutura que é essencial para o processamento emocional, tanto em humanos quanto nos animais, que envolve a amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (MAHAN & RESSLER, 2012). As demais áreas envolvidas são responsáveis pela detecção de ameaças e processamento de recompensas (FENSTER et al, 2018), além de sistemas de liberação de neurotransmissores, como o sistema noradrenérgico.

1.7.1 AMÍGDALA

A amígdala atua no processamento de informações emocionais e nos processos de memória (WIEMERS, SAUVAGE & WOLF, 2014) e é recrutada na circuitaria neural necessária para a aprendizagem ao medo. A amígdala possui vários núcleos de neurônios, como a BLA, que abrange os núcleos basal, basomedial e lateral da amígdala; o Núcleo Central da Amígdala (CeA), dividido no núcleo lateral e medial e células intercaladas (DUVARCI & PARE, 2014). A BLA está envolvida com a formação de memórias emocionais de longo prazo (SARDARI et al, 2014) e com a formação e consolidação de memórias de medo (DAVIES et al, 2004), como as memórias aversivas (WU et al, 2012).

Leidl e colaboradores (2018) mostraram que a BLA é uma região crítica para a consolidação do condicionamento de primeira ordem, sendo necessária a síntese proteica nesta região para o armazenamento da memória do condicionamento.

Além do papel essencial que o complexo BLA exerce tanto na formação de memórias quanto na consolidação destas, a BLA também está envolvida com o sistema de neurotransmissão noradrenérgico, pois recebe projeções do centro de neurônios responsáveis pela liberação de noradrenalina (NA) no SNC, o *locus coeruleus* (LC) (HURLEMANN et al, 2010, NASEHI et al, 2016). A NA está relacionada com a aprendizagem e o medo (BUSH et al, 2010; DEBIEC, BUSH & LEDOUX, 2011), e estudos desde o final da década de 70 tem vinculado a NA com o fortalecimento de memórias (GOLD e VAN BUSKIRK, 1978; MCINTYRE, HATFIELD & MCGAUGH, 2002).

1.7.2 SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICO

A neurotransmissão noradrenérgica têm sido associada especificamente com os paradigmas de esquiva inibitória e condicionamento ao medo (WU et al, 2012), e no sentido clínico, com a patologia da ansiedade e do medo (DEBIEC, BUSH & LEDOUX, 2011).

Um fato já conhecido é que a consolidação de memórias é influenciada pela liberação de hormônios adrenérgicos periféricos em resposta a estressores pela ativação central de receptores adrenérgicos e, tais achados indicam que a liberação de NA de forma endógena tem um papel importante sobre a consolidação de memórias (MCINTYRE, HATFIELD & MCGAUGH, 2002).

Um dos receptores para NA, o receptor α_2 adrenérgico, está localizado na membrana pré-sináptica do neurônio, e na sua ativação a liberação de NA é inibida (SAVCHENKO & BOUGHTER JR, 2011; NASEHI et al, 2016). Davies e colaboradores (2004) relataram que através da administração do agonista α_2 , dexmedetomidina, ocorrem mudanças na memória de medo. Foi observado pelos autores que não ocorreu a diminuição do tempo de congelamento de camundongos C57BL/6 quando a droga foi administrada 30 minutos antes do treino no contexto do choque. Porém foi observado que a administração da droga após o treino diminuiu significativamente o tempo de congelamento dos animais. Esses resultados contribuem para mostrar a ação evidente da noradrenalina sobre as memórias de medo.

A ioimbina é um fármaco antagonista do receptor α_2 adrenérgico (GAZARINI et al, 2014), e portanto, estimula a liberação de NA. Já foi mostrado que o uso de ioimbina pode aumentar a memória e o aprendizado (KAPLAN & MOORE, 2011), e que a administração aguda de ioimbina levou a ativação de regiões relacionadas com o medo (SAVCHENKO & BOUGHTER JR, 2011). Trabalhos anteriores também evidenciaram que a estimulação de receptores adrenérgicos α_2 diminuem a liberação da noradrenalina na amígdala, e influenciam diretamente as memórias de medo.

Fendt e equipe (1994) mostraram o papel da ioimbina e do agonista α_2 ST-91 sobre a resposta de sobressalto acústico em ratos Wistar. Foi evidenciado que, através de microinjeções de ioimbina na região central da amígdala, foi aumentada a magnitude para o sobressalto acústico. Em um experimento seguinte, foi utilizado o choque nas patas para sensibilizar o sobressalto acústico. Foi mostrado que a administração de injeções locais do ST-91 na amígdala central, diminuíram os efeitos de sensibilidade dado pelo choque nas patas dos animais. Possivelmente ocorre o aumento de noradrenalina pela ioimbina e diminuição da noradrenalina nesse local através da ação dessas drogas nos autorreceptores pré sinápticos da noradrenalina.

Existe um papel importante dos receptores adrenérgicos nos pacientes com TEPT. Esses indivíduos podem apresentar uma interrupção da ação inibitória mediada pelos receptores α_2 adrenérgicos e um aumento da atividade noradrenérgica. Tal característica pode ocorrer após o evento traumático, onde ocorre a consolidação da memória (GAZARINI et al, 2014).

Em 1993, Southwick e colaboradores investigaram os efeitos da ioimbina em pacientes com TEPT. Nesses pacientes a ioimbina induziu o aumento de sintomas relacionados com o TEPT, como pensamentos traumáticos intrusivos, tristeza e entorpecimento emocional. Esse estudo mostrou que um estresse incontrolável, produzido pela droga, tem efeitos sobre a função noradrenérgica, afetando diretamente o bem estar e tendo efeitos sobre a memória traumática do indivíduo.

Esses resultados mostram que existe um papel importante do receptor α_2 sobre a liberação de noradrenalina e conseqüente ação desta sobre as memórias de medo.

1.7.2.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO

O sistema de neurotransmissão noradrenérgico é responsável por processos de atenção e cognição e eventos relacionados a resposta ao estresse. Tal sistema é regulado por um núcleo encefálico – *locus coeruleus* (LC) – que possui neurônios que produzem noradrenalina. Os neurônios do LC realizam projeções para várias regiões encefálicas, entre elas a amígdala. O LC é responsável pela liberação de NA, e possui vários receptores adrenérgicos na sua estrutura, entre eles, o receptor α_2 e α_1 (SCHWARZ & LUO, 2015).

1.7.3 RECEPTORES ADRENÉRGICOS E BLA

A NA, após ser liberada, se liga em três tipos de receptores adrenérgicos: o receptor α_1 , α_2 e β (1-3). Estes receptores estão envolvidos em diferentes vias de sinalização. O receptor α , assim como o receptor β , é pós-sináptico, e a sua ativação ativa a fosfolipase C. (NASEHI et al, 2016).

O receptor α_2 , é um receptor pré-sináptico e, quando estimulado, leva a inibição da adenilato ciclase e ativação de canais de K^+ . Foi evidenciado que a ativação do receptor α_2 leva a inibição da atividade noradrenérgica e que a administração aguda de ioimbina (antagonista α_2) leva a ativação de neurônios em áreas relacionadas com o estresse e que são ativadas por drogas ansiogênicas, como a cafeína (SAVCHENKO & BOUGHTER JR, 2011).

Evidências mostraram que a BLA possui receptores β adrenérgicos e α adrenérgicos, e que a ativação destes receptores influencia na expressão do comportamento de medo. Sabe-se que BLA é abundante em receptores β adrenérgicos (WU et al, 2012). Foi evidenciado por Bush e colaboradores em 2010, que o bloqueio do receptor β adrenérgico, através do seu antagonista, o propranolol, interrompe a aquisição, a memória de curto e de longo prazo para o condicionamento ao medo. Porém, infusões realizadas após o treinamento, não tiveram nenhum efeito em tal memória. Já um artigo publicado por Nasehi e associados em 2016 mostrou que, o déficit do aprendizado mediado pela araquidonilciclopropilamida (ACPA), um

agonista seletivo do receptor CB1 (Receptor canabinóide 1), foi revertido pela administração de ioimbina diretamente na BLA.

Portanto, entende-se que o estudo do papel dos receptores adrenérgicos, em especial o receptor α_2 , é necessário para a compreensão do desenvolvimento e consolidação de memórias aversivas.

1.7.4 O SISTEMA NORADRENÉRGICO E O SISTEMA OLFATÓRIO

A NA possui um papel na detecção, memorização e aprendizagem do estímulo olfatório. Estudos demonstraram uma relação da NA com a plasticidade associada com a aprendizagem olfativa como a capacidade de discriminação de odores. Têm sido sugerido que a detecção de odores também pode ser mediada pela NA, através do aumento da excitabilidade das células principais (LINSTER & ESCANILLA, 2018). Sendo assim, existe uma relação entre a liberação de NA com a detecção de odores, e dada a conexão entre LC – amígdala – córtex olfatório, entende-se que o estudo desse sistema sobre a consolidação do condicionamento de segunda ordem torna-se necessário para o entendimento do desenvolvimento do TEPT.

1.8 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o papel da NA sobre a consolidação de memórias de medo, em especial o papel da ioimbina na liberação de NA, entende-se que é essencial a compreensão e o conhecimento de como tais elementos podem fortalecer uma determinada memória, em especial, uma memória aversiva. Ademais, busca-se o entendimento de como esses mecanismos podem estar envolvidos com o condicionamento de segunda ordem, de que forma poderiam auxiliar no aspecto clínico, e posteriormente no entendimento dos mecanismos neurais relacionados com a aquisição, consolidação e expressão do condicionamento de segunda ordem, que está intrinsecamente relacionado com a expressão de memórias aversivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a ocorrência do condicionamento de segunda ordem em ratos machos da linhagem Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a. Validar o condicionamento de primeira ordem ao odor de banana;
- b. Avaliar o condicionamento de segunda ordem ao odor através da exposição ao odor de banana durante a evocação da memória aversiva;
- c. Verificar a ocorrência da generalização da memória aversiva nos animais através da administração de ioimbina;
- d. Determinar se a administração sistêmica do fármaco ioimbina após o condicionamento aversivo e/ou após a sessão de evocação promove o condicionamento de segunda ordem;
- e. Analisar se o aumento da atividade simpática através da administração de ioimbina após o condicionamento de segunda ordem pode acarretar em maior expressão da resposta condicionada de congelamento;
- f. Investigar se a reexposição ao odor de banana na evocação (pareamento contexto-odor) acarreta no condicionamento de segunda ordem;
- g. Avaliar se o condicionamento de segunda ordem é formado na reconsolidação da memória através da apresentação do odor após a evocação da memória aversiva.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 482 ratos machos Wistar, com idade aproximada de 60 a 90 dias, com peso de 230g - 450g. Os animais utilizados foram obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e ficaram alojados no biotério desse setor. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (60 X 25 X 25 cm) com cepilho e com grade padrão. Foram alojados 4-6 animais por caixa, com temperatura controlada ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h). Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram iniciados após a aprovação do CEUA de número 1115.

3.2 ESTÍMULO INCONDICIONADO

Como estímulo incondicionado utilizou-se o choque nas patas dos animais. O protocolo foi baseado no estudo de Kroon e Carobrez em 2008.

TABELA 1: PROTOCOLO DO CONDICIONAMENTO AO MEDO

Familiarização	Condicionamento			
Tempo total: 5 minutos	Tempo total: 5 minutos	Protocolo:		
		1 minuto	Número de choques: 5	2 minutos
			Duração do choque: 1 segundo	
			Intensidade do choque: 0.5 mA	
Intervalo entre choques: 30 segundos				

3.3 ESTÍMULO CONDICIONADO

O estímulo condicionado utilizado foi o acetato de isoamila ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2$; P.M. 130,19), um líquido que possui um odor característico de banana. Prud'Homme e

associados em 2009, realizaram experimentos com o odor de banana, e demonstraram que tal estímulo é neutro para ratos Wistar. Os autores avaliaram a resposta comportamental (atividade locomotora e tempo de farejamento) após a exposição de ratos Wistar para o acetato de isoamila puro vs odor de comida em ratos em jejum (48h) e ratos saciados. A resposta comportamental mostrou um aumento na exploração espacial do ambiente quando foi apresentado o odor de banana e odor de comida para ambos os grupos. Em relação ao tempo de farejamento, os animais em jejum tiveram um comportamento semelhante aos animais que estavam saciados, onde não foi observado um aumento no tempo de farejamento ao odor de banana. Quando foi apresentado o odor de comida, os ratos em jejum passaram 50% do tempo explorando a fonte de odor de comida, enquanto os ratos saciados não exploraram a fonte de odor.

Para este estudo, o acetato de isoamila foi diluído em uma concentração de 5% e utilizado em um volume de 250 μ L (CANTERAS, PAVESI & CAROBREZ, 2015).

O acetato de isoamila também foi utilizado em estudos anteriores para o condicionamento olfativo de medo por Sevelinges *et al* (2004) e Prud'Homme *et al* (2009).

3.4 DROGAS

Nesse estudo foi utilizada a droga loimbina durante os experimentos comportamentais. A loimbina foi utilizada nas doses de 1 mg/kg, 2 mg/kg e 3 mg/kg, sendo diluída em salina. Foi utilizado como veículo, o soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9 %). A administração da droga e veículo foi realizada pela via intraperitoneal (IP).

3.5 APARATOS COMPORTAMENTAIS

Para o protocolo de condicionamento ao medo foi utilizada a caixa de esquiva passiva (SCIENLABOR, Brasil) (36,5cm x 29cm x 50cm). A caixa possui grades de metal, no qual é conectado um gerador de choques (SCIENLABOR, Brasil). A parede frontal da caixa é de acrílico transparente, e as demais paredes são de metal. Tal contexto utilizado foi denominado de Contexto A (Figura 2).

O teste com o odor, assim como o teste da generalização foram realizados em uma caixa acrílica com paredes transparentes (34 cm x 26 cm x 33 cm), que foi

denominada contexto C (FIGURA 3). Os aparatos comportamentais foram limpos com álcool diluído a 10% após a passagem dos animais por tais contextos.



FIGURA 2: APARATO COMPORTAMENTAL – CONTEXTO A



FIGURA 3: APARATO COMPORTAMENTAL – CONTEXTO C

3.6 EXPERIMENTOS

Os experimentos realizados ocorreram na fase clara, entre o período das 13:00 hs às 17:00 hs, em condições de habituação, condicionamento e teste com o odor. Durante a sessão de extinção da memória os experimentos aconteceram no período das 10:00 hs às 19:00 hs. Tais condições foram escolhidas a fim de minimizar os efeitos sobre o ritmo circadiano dos animais. Trabalhos já mostraram que o condicionamento ao medo contextual parece ser mais efetivo nos animais noturnos, como o rato, na sua fase inativa, a fase clara (ALBRECHT & STORK, 2017).

Antes do início de cada experimento, os animais foram colocados em uma sala para ambientação por um período de 1 hora, para minimizar possíveis estressores (movimentação das caixas, por exemplo) que poderiam influenciar no

protocolo de experimentação. A luz das salas onde os experimentos foram realizados foi controlada, com luminosidade entre 50-60 lux.

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais foram eutanasiados por anestesia (quetamina, 120 mg/kg) seguida de deslocamento cervical.

Experimento 1: Condicionamento aversivo ao odor de primeira ordem

O primeiro experimento realizado foi o de validação do condicionamento ao odor (Figura 4) , onde os animais receberam um choque nas patas, no momento em que era lhes apresentado o odor. No primeiro dia de teste, os animais passaram pelo contexto A, onde foi realizada a familiarização desses animais, a fim de que o novo ambiente fosse processado. No 2º dia de teste os animais passaram pelo condicionamento, onde foi administrado o choque nas patas e apresentado o odor de forma simultânea. O período de familiarização e condicionamento dos animais durou um tempo total de 5 minutos.

No dia após o condicionamento, os animais passaram por um contexto diferente, o contexto C, onde foi apresentado o odor. O odor foi colocado em uma gaze dobrada, em um tubo plástico de 50 mL com furos que foi colocado na parte superior da caixa. O teste durou 5 minutos e foi contabilizado o tempo de congelamento dos animais.

No 4º dia, os animais retornaram para o contexto A, onde foi realizada a sessão de extinção, com um tempo total de 30 minutos. Durante o teste também foi realizado o cálculo do tempo de congelamento dos animais. Os animais que tiveram um tempo de congelamento abaixo de 30% foram retirados da análise estatística. Tal critério foi utilizado a fim de confirmar a ausência de aprendizagem do condicionamento ao contexto nos animais. No dia seguinte, foi realizado um novo teste com o odor, a fim de observar o comportamento dos animais frente ao odor, após a sessão de extinção da memória de medo.

Este experimento serviu como base para o condicionamento seguinte, como forma de avaliar se os animais eram capazes de realizar a associação entre choque (US) e odor (CS) e apresentar o comportamento de medo.

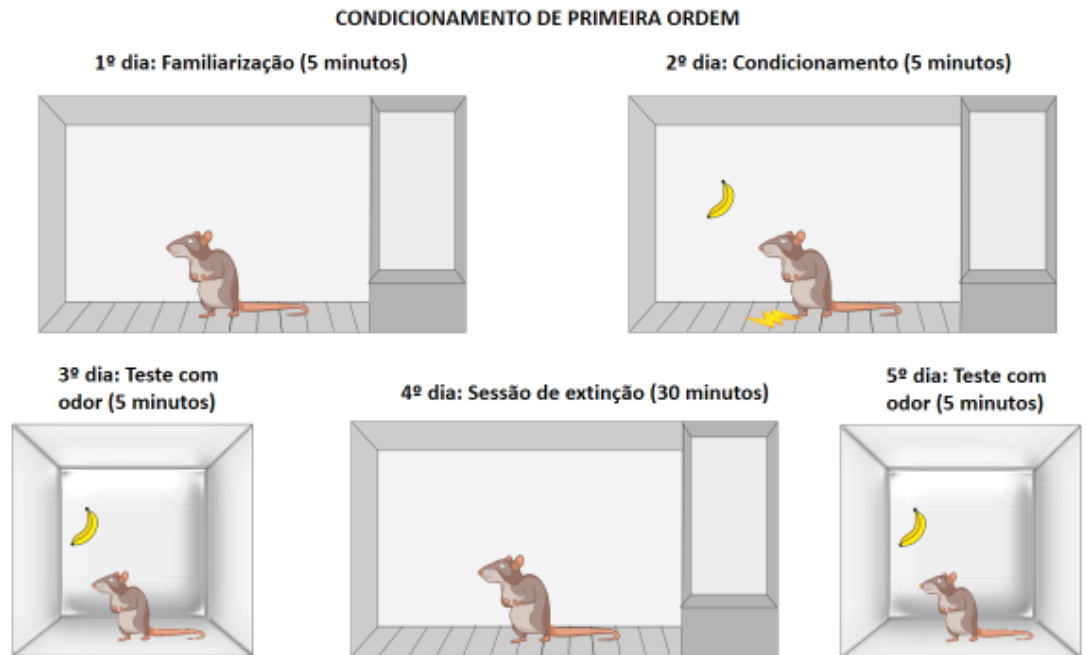


FIGURA 4: DESENHO EXPERIMENTAL DO CONDICIONAMENTO DE PRIMEIRA ORDEM

A figura acima mostra o protocolo do condicionamento de primeira ordem, onde os animais passam pela familiarização, condicionamento ao medo, teste com odor, sessão de extinção e por um reteste com o odor de banana.

Experimento 2: Avaliação do condicionamento de segunda ordem

O segundo experimento realizado contou com a apresentação do odor aos animais, um dia após o condicionamento com o choque nas patas (Figura 5).

No primeiro dia, os animais seguiram para o procedimento usual de familiarização na caixa desconhecida, o contexto A. Um dia depois, os animais foram condicionados apenas com o choque nas patas, no mesmo contexto. Ambos os testes duraram 5 minutos.

No dia seguinte, foi realizada a evocação, fase onde a memória de medo é relembrada pelo animal. Nessa fase, os animais retornaram para o contexto A, e então foi apresentado o odor, por um período de 5 minutos. A evocação dos animais no contexto A ocorreu para que fosse realizado o condicionamento de segunda ordem. No protocolo realizado, o primeiro estímulo condicionado (CS1) foi o contexto em que os animais receberam o choque, e o segundo estímulo condicionado (CS2) foi o odor.

O teste com o odor no contexto C ocorreu no dia seguinte, onde foi testado se ocorreu o condicionamento de segunda ordem. No dia da evocação foi avaliado o

congelamento dos animais, e os animais que tiveram um tempo de congelamento abaixo de 30% do tempo total do teste, foram excluídos da análise estatística. No teste com o odor também avaliou-se o congelamento dos animais.

Após uma semana, os animais foram testados novamente no contexto C com o odor, para a avaliação da persistência dessa memória. O comportamento de congelamento foi avaliado.

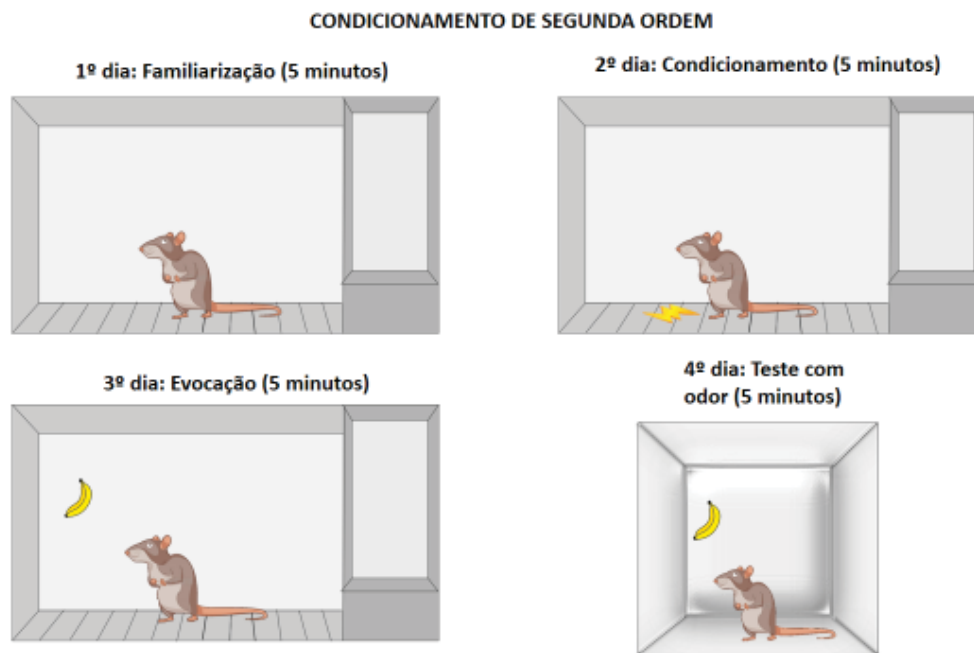


FIGURA 5: DESENHO EXPERIMENTAL DO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

A figura acima mostra o protocolo do condicionamento de segunda ordem, onde os animais passam pela familiarização, condicionamento ao medo, evocação com odor de banana e teste com odor para a verificação do condicionamento de segunda ordem.

Experimento 3a: Administração da Ioimbina e verificação da generalização

O experimento 3ª (Figura 6) foi realizado com o intuito de verificar se a ioimbina era capaz de promover o comportamento de generalização nos animais. O comportamento de generalização é observado nos indivíduos que possuem o TEPT.

A ioimbina é um fármaco antagonista dos receptores α adrenérgicos, e seus efeitos estão relacionados com o sistema simpático do organismo. Entre esses efeitos estão a alteração da pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura corporal e locomoção dos animais (ZARETSKY et al, 2015). Como a ioimbina é antagonista do

receptor $\alpha 2$ adrenérgico (GAZARINI et al, 2014), a administração desse fármaco estimula a liberação de NA.

Nesse experimento, os animais passaram pelo processo de familiarização, ao primeiro dia, e condicionamento ao medo no segundo dia. Imediatamente após o condicionamento, foi administrado para os animais pela via IP as doses de 1 mg/kg, 2 mg/kg ou 3 mg/kg de ioimbina ou veículo (salina). No dia seguinte, os animais foram colocados no contexto C, para avaliação da generalização através do tempo de congelamento dos animais.

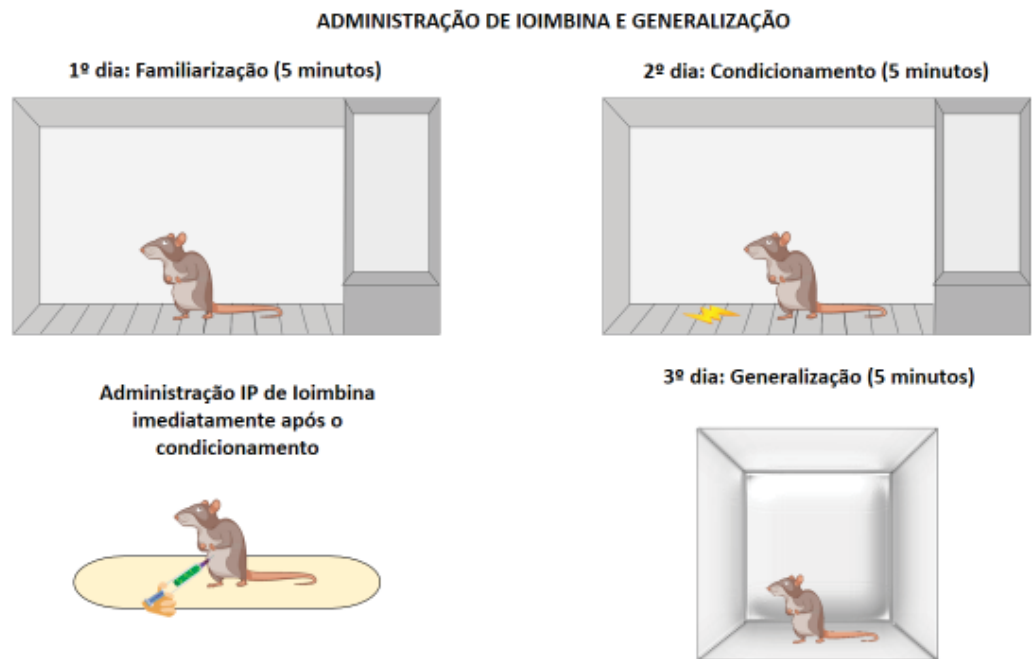


FIGURA 6: DESENHO EXPERIMENTAL DA ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA E GENERALIZAÇÃO

A figura acima mostra o protocolo do experimento 3^a. Os animais passam pela familiarização, condicionamento ao medo, onde foi feita a administração IP de ioimbina. No 3º dia, foi realizado o teste para verificar a generalização da memória de medo no contexto C.

Experimento 3b: Administração da ioimbina após o condicionamento ao medo e após a evocação da memória

O experimento 3b foi realizado para avaliar se os efeitos sistêmicos gerados pelo uso da ioimbina são capazes de facilitar a construção da memória de medo através do condicionamento de segunda ordem (Figura 7). A droga foi administrada

aos animais logo após o condicionamento de primeira ordem e logo após o condicionamento de segunda ordem (evocação com o odor). Como nos experimentos anteriores, os animais passaram pela familiarização e condicionamento. Após o condicionamento dos animais, foi administrado a ioimbina 1mg/kg ou veículo. Tal dose foi escolhida pois não levou a generalização dos animais no experimento anterior. No dia seguinte, os animais retornaram para o contexto A para a sessão de evocação com o odor, para a formação do condicionamento de 2ª ordem. Imediatamente após a sessão de evocação, os animais receberam ioimbina 1 mg/kg ou salina. No dia seguinte os animais retornaram para o contexto C para o teste com o odor, para verificação da ocorrência do condicionamento de segunda ordem pela análise do congelamento. Uma semana depois do teste com o odor, foi realizado um novo teste com o odor para investigar o tempo de duração do condicionamento de 2ª ordem.

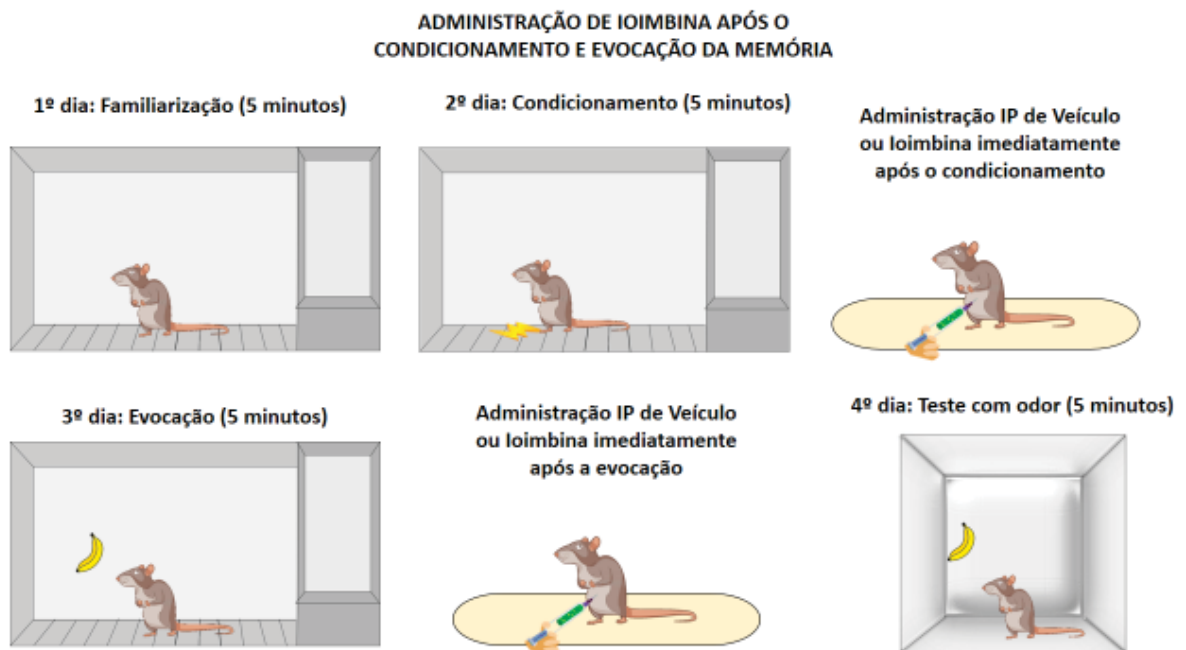


FIGURA 7 : DESENHO EXPERIMENTAL DA ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA COMO MODELO DE TEPT

A figura acima mostra o protocolo do experimento 3b. Os animais passaram pela familiarização no 1º dia e condicionamento ao medo no 2º dia, onde foi feita a administração IP de ioimbina ou veículo. No 3º dia, foi realizada a evocação, sendo administrado ioimbina ou veículo IP. No último dia foi feito o teste com odor no contexto C.

Experimento 3c: Administração de ioimbina após a evocação da memória como modelo de condicionamento de segunda ordem

O experimento 3c foi realizado com o intuito de promover o condicionamento de segunda ordem nos animais, através de uma maior liberação sistêmica de NA (Figura 8). O protocolo de condicionamento foi semelhante ao experimento 3b, com a diferença que a administração de ioimbina foi feita nas doses de 2 mg/kg e 3 mg/kg após a evocação dos animais no contexto A. No primeiro dia os animais passaram pela familiarização no contexto A, e um dia depois, pelo condicionamento no mesmo contexto. No 3º dia, os animais retornaram para tal contexto, e em um teste de 5 minutos, foi apresentado o odor de banana para os animais, para a ocorrência do condicionamento de segunda ordem. Na evocação, os animais foram distribuídos em dois grupos: sem odor e com odor, para verificação da ocorrência da generalização no contexto C. Imediatamente após o fim do teste, foi administrado para os animais, veículo ou ioimbina 2 mg/kg ou ioimbina 3 mg/kg. No dia seguinte, os animais foram testados para a observação do comportamento de congelamento no contexto C, com a presença do odor. Após 7 dias, os animais foram testados novamente no contexto C.

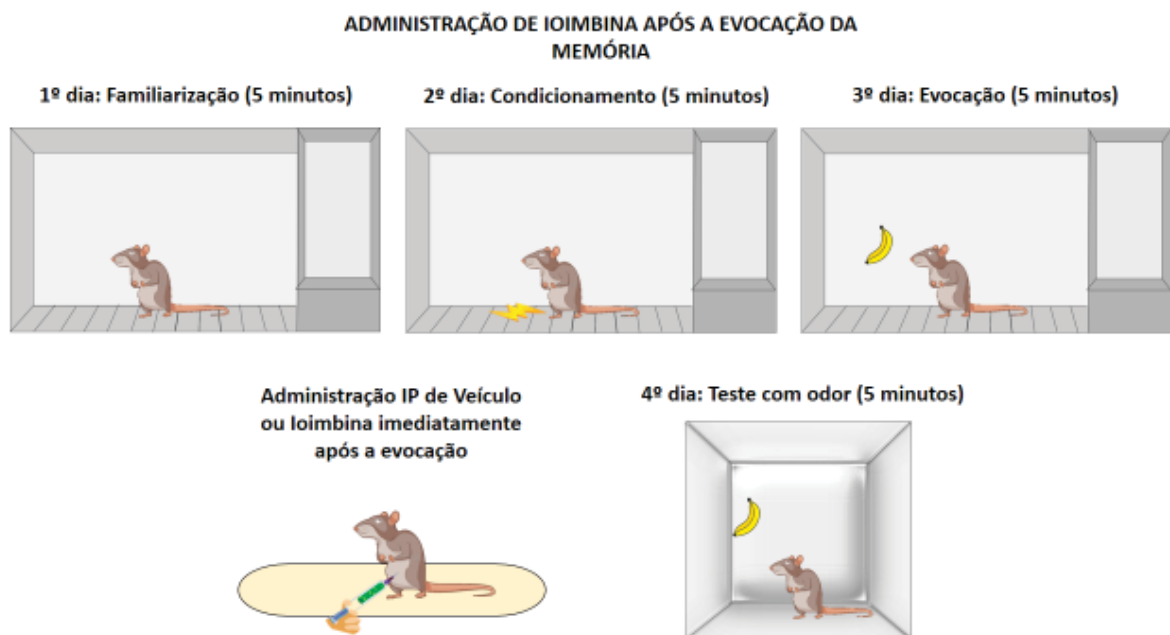


FIGURA 8: DESENHO EXPERIMENTAL DA ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA

A figura acima mostra o protocolo do experimento 3d. Os animais passaram pela familiarização no 1º dia e condicionamento ao medo no 2º dia. No 3º dia, foi realizada a evocação, sendo administrado ioimbina ou veículo IP. No último dia foi feito o teste com odor no contexto C.

Experimento 3d: Investigação da reexposição ao odor na evocação como modelo de condicionamento de segunda ordem

O experimento 3d foi realizado com o objetivo de levar aos animais ao condicionamento de segunda ordem através de uma segunda evocação com o odor (FIGURA 9). Os animais passaram pelo mesmo protocolo de condicionamento, onde no 1º dia eles foram familiarizados no contexto A, seguido do condicionamento com o choque nas patas no 2º dia. Os animais foram distribuídos em 2 grupos, os que receberam ou não o odor na evocação. No 3º dia, os animais passaram pela 1ª evocação com ou sem o odor e no dia seguinte, os animais passaram pela 2ª evocação novamente com ou sem o odor, para que uma nova exposição ao odor levasse ao condicionamento de segunda ordem. Assim como nos experimentos anteriores, os animais que tiveram um *freezing* abaixo de 30% foram retirados da análise, tanto na 1ª evocação como no segundo dia de evocação. No último dia, os animais foram testados com o odor no contexto C.

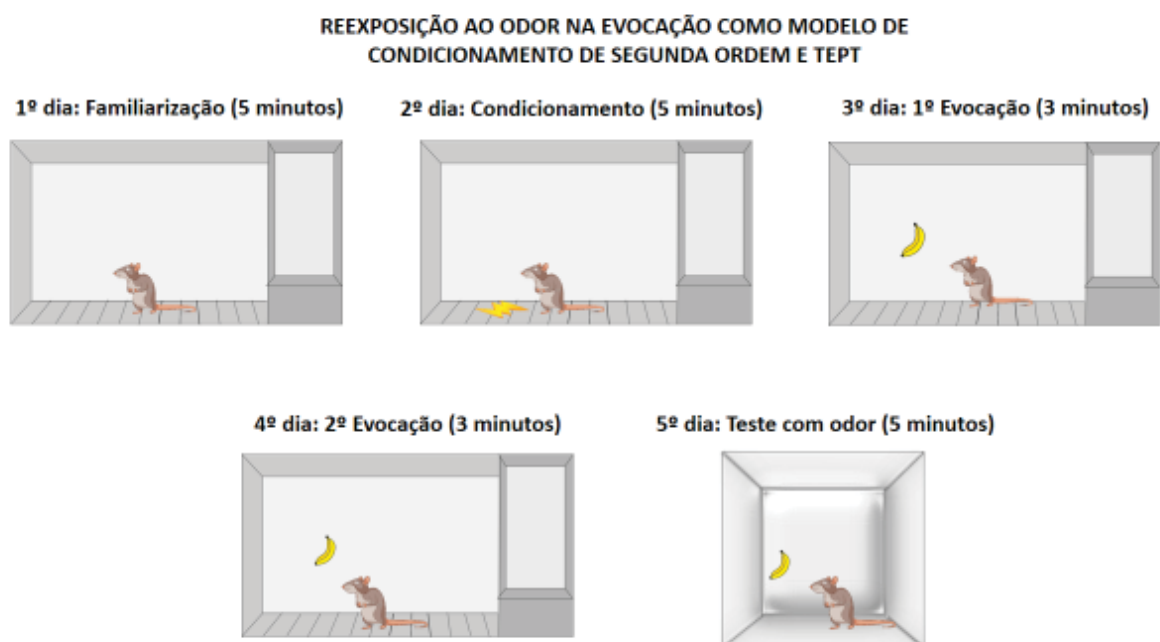


FIGURA 9: DESENHO EXPERIMENTAL DA REEXPOSIÇÃO AO ODOR COMO MODELO DO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM E DO TEPT

A figura acima mostra o protocolo do experimento 3d. Os animais passaram pela familiarização no 1º dia e condicionamento ao medo no 2º dia. No 3º dia e no 4º dia, foi realizada a evocação com o odor de banana. No último dia foi feito o teste com odor no contexto C.

Experimento 3e: Apresentação do odor na reconsolidação da memória como um modelo de condicionamento de segunda ordem

O experimento 3e teve como objetivo levar ao condicionamento de segunda ordem através da apresentação do odor em um diferente contexto após a evocação da memória no contexto A (Figura 10). No 1º dia os animais passaram pela familiarização, seguido do condicionamento no 2º dia. No 3º dia foi feita a evocação de 3 minutos no contexto A, seguido da apresentação do odor em um ambiente novo: gaiola de 28x17x14 cm com cepilho limpo. Após a passagem dos animais na evocação, eles foram colocados sozinhos por 1 minuto no ambiente novo, e foi apresentado o odor. Os animais que tiveram um tempo de congelamento abaixo de 30% durante a evocação foram retirados da análise.

No 4º dia foi realizado o teste com o odor no contexto C e foi avaliado o tempo de congelamento dos animais.

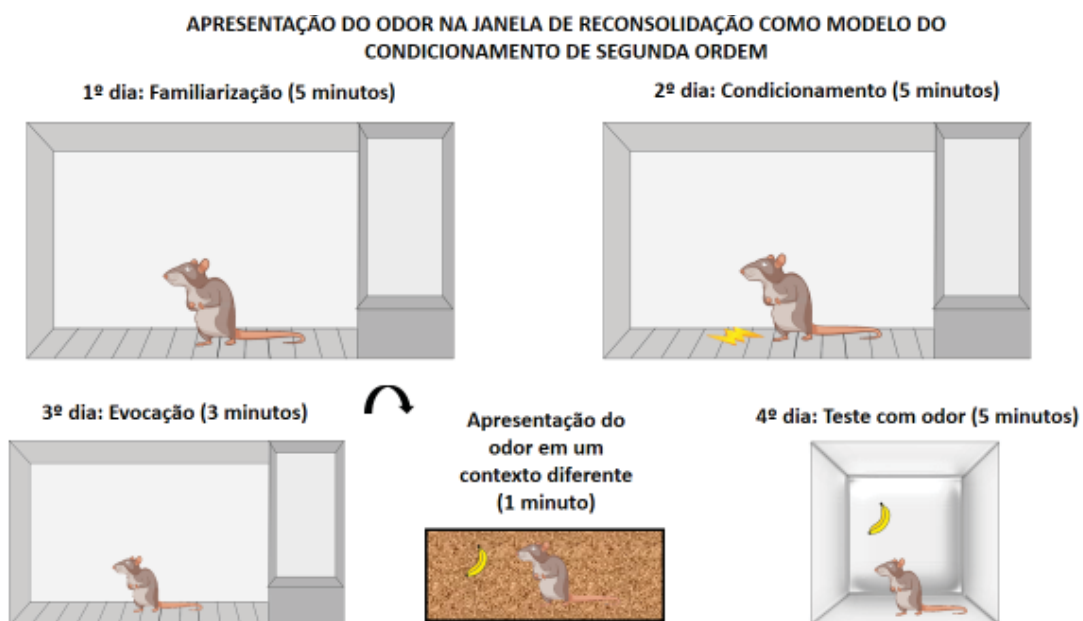


FIGURA 10: DESENHO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3E

A figura acima mostra o protocolo do experimento 3e. Os animais passaram pela familiarização no 1º dia e condicionamento ao medo no 2º dia. No 3º dia, foi realizada a evocação, e apresentação do odor em um contexto diferente por 1 minuto. No 4º dia foi feito o teste com odor no contexto C.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O dado obtido dos experimentos comportamentais foi o tempo de congelamento dos animais, obtido em segundos (s). Este dado foi transformado em porcentagem de tempo [%= tempo de congelamento x 100/300 seg (5 minutos) ou 1800 seg (30 minutos)], e foi expresso nos gráficos através de média ± erro padrão da média (EPM). Na análise estatística foram utilizados os testes: ANOVA – Análise de Variância de uma via (*one-way*), ANOVA – Análise de Variância de duas vias (*two way*), ANOVA – Análise de Variância de medidas repetidas e o teste t de Student independente. Foi utilizado o teste *post hoc* (Newman-Keuls) para análises posteriores, quando a ANOVA foi significativa. O nível de significância utilizado foi de 5%. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *Statistica* 12. Os gráficos foram feitos com o software GraphPad Prism 7.00.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 1: VALIDAÇÃO DO CONDICIONAMENTO AO ODOR

O experimento 1 foi realizado para a verificação do condicionamento entre o choque (US) e odor (CS) nos animais. O resultado observado foi a associação entre o choque e odor, pelo teste do odor no contexto não pareado ao condicionamento (Figura 12). A ANOVA de duas vias mostrou a ausência de interação entre o fator choque e odor [$F(1,16) = 3,6274$, $p=0,07497$]. Porém o houve efeito significativo para o fator choque [$F(1,16) = 11,849$, $p=0,00335$] enquanto o fator odor não mostrou diferença significativa [$F(1,16) = 4,0788$, $p=0,06050$]. A análise *post hoc* pelo teste Newman-Keuls indicou que o grupo que recebeu o choque com o odor mostrou um congelamento no contexto C maior do que o grupo que recebeu o choque sem o odor ($p=0,013671$) sendo que o comportamento de medo foi maior também em comparação com os animais que não receberam o choque, com a presença do odor e sem o odor ($p= 0,00452$ e $p= 0,00690$, respectivamente). Esse resultado mostra que ocorreu o condicionamento dos animais que receberam o choque e o odor. A falta de interação entre os fatores indica uma tendência à generalização nos animais expostos ao choque sem odor, mas que não foi estatisticamente significativa no *post hoc*.

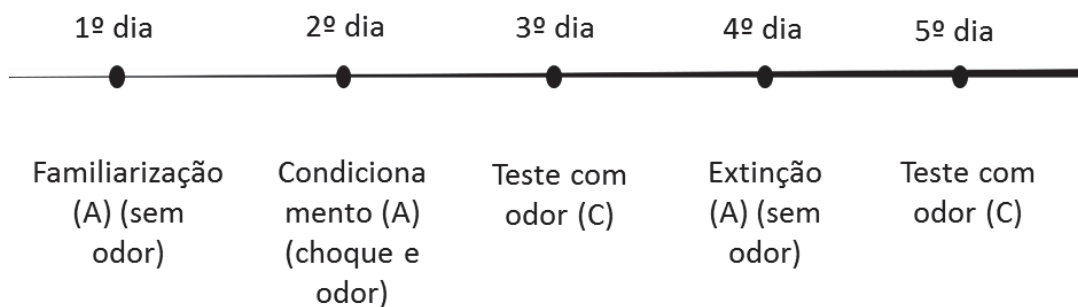


FIGURA 11: DELINEAMENTO EXPERIMENTO DO EXPERIMENTO 1

Condicionamento de primeira ordem (Contexto C)

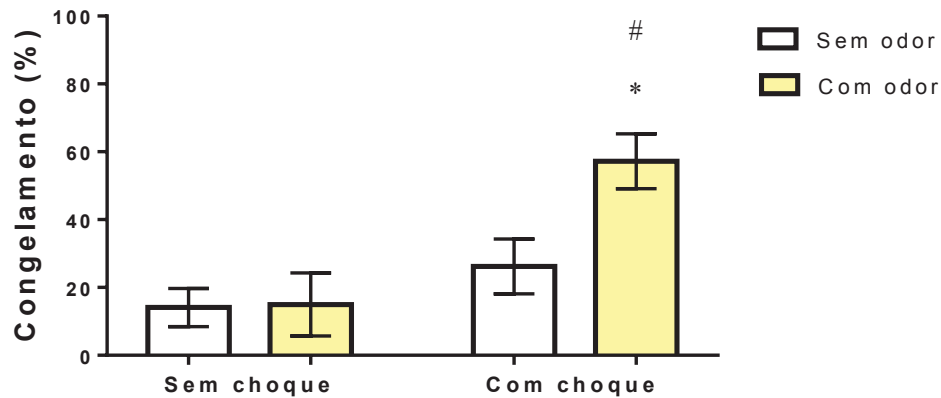


FIGURA 11: GRÁFICO DO CONDICIONAMENTO DE PRIMEIRA ORDEM.

O gráfico mostra o tempo de congelamento dos animais que foram condicionados ao odor. O tempo de congelamento foi obtido em segundos, mas expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: grupo **sem choque sem odor** (5), **grupo sem choque com odor** (5), **grupo com choque sem odor** (5) e **grupo com choque com odor** (5). * $p < 0,05$ em comparação entre o **grupo com choque com odor** e **grupo com choque sem odor**. # $p < 0,05$ em comparação entre o grupo com choque com odor com o grupo sem choque e sem odor.

Os resultados obtidos indicam que ocorreu o condicionamento ao odor nos animais. Evidências já mostraram que existem conexões entre a amígdala e o córtex olfatório (WIEMERS, SAUVAGE & WOLF, 2014). O resultado mostrado por esse experimento indica que através dessa conexão, as informações sensoriais são processadas e o odor atua como uma pista para que seja expresso o comportamento de medo (congelamento) pelos animais durante a exposição dos mesmos ao odor em um contexto diferente daquele em que a memória aversiva foi originada.

Após o protocolo de condicionamento ao odor, os animais passaram pela sessão de extinção do medo condicionado. Nenhum animal foi retirado da análise estatística, pois não foi observado um congelamento abaixo de 30% durante o primeira bloco (**min 1-6**) da extinção.

Na sessão de extinção, os animais foram expostos novamente ao contexto A, porém não lhes foi apresentado o CS (odor). Esse protocolo de extinção sem a apresentação do CS teve como objetivo a verificar se a “extinção seletiva” do contexto poderia reduzir a resposta condicionada de medo ao odor para que no experimento

seguinte fosse verificado se a extinção do condicionamento de primeira ordem poderia afetar a resposta condicionada do condicionamento de segunda ordem.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação entre o fator choque e odor [$F(1, 16) = 7,5641$, $p = 0,01423$] e efeito dos fatores choque e odor [$F(1, 16) = 61,411$, $p = 0,00000$ e $F(1, 16) = 6,9115$, $p = 0,01823$, respectivamente]. O tempo de congelamento dos animais que passaram pelo choque sem odor diminuiu ao longo da extinção (Fig. 13), enquanto que o mesmo não foi observado nos animais que passaram pelo choque com o odor. Os animais que não receberam o choque apresentaram um tempo de congelamento menor, o que indica que o odor não se mostrou capaz de induzir congelamento em animais naïve.

A análise *post hoc* indicou que o grupo choque com odor teve uma extinção prejudicada pela extinção seletiva apenas do contexto. Esse dado pôde ser visto pela ausência de diferenças entre o último bloco de extinção do medo (min 25-30) em comparação com o primeiro bloco de extinção (min 1-6) ($p > 0,05$).

A comparação entre os blocos 1-5 da extinção (min 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30) entre os dois grupos condicionados mostrou diferenças em alguns blocos da extinção. O min 1-6 e o min 7-12 não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$), indicando que no início da sessão de extinção, ambos os grupos tem um tempo de congelamento alto, e tem uma expressão do medo no contexto onde foi realizado o condicionamento. Houve diferenças entre o min 13-18, 19-24 e 25-30 ($p = 0,01193$, $p = 0,00449$ e $p = 0,03820$), com menor tempo de congelamento no o grupo que recebeu o choque sem o odor. Isso não foi observado pelo grupo choque com odor, que teve um tempo de congelamento alto ao final da extinção.

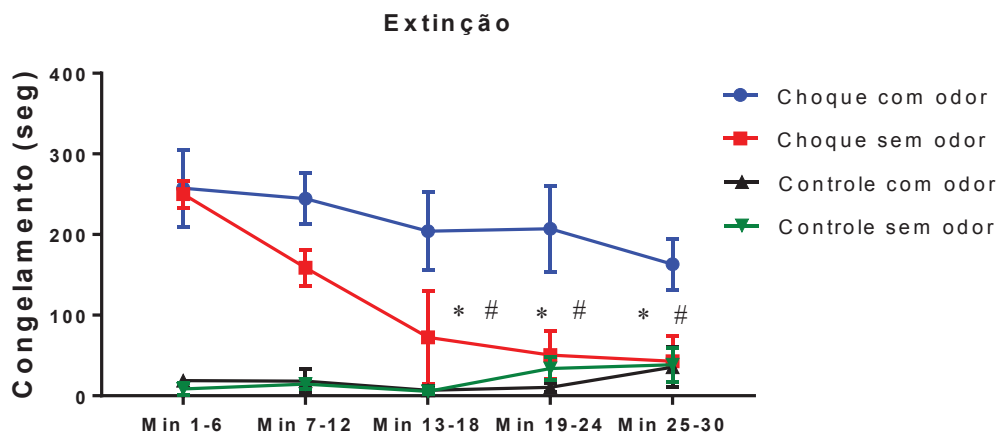


FIGURA 13: GRÁFICO DA SESSÃO DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA.

O gráfico acima mostra o tempo de congelamento dos animais que passaram pela sessão de extinção após o condicionamento ao odor. O tempo de congelamento foi expresso em segundos. O n de cada grupo foi, respectivamente: grupo **sem choque sem odor** (5), **grupo sem choque com odor** (5), **grupo com choque sem odor** (5) e **grupo com choque com odor** (5). * $p < 0,05$ representa a diferença no congelamento entre o **grupo choque com odor e choque sem odor nos minutos 13-18, 19-24 e 25-30**. # $p < 0,05$ mostra a diferença observada pela comparação dos minutos **1-6 vs 13-18, 1-6 vs 19-24 e 1-6 vs 25-30 do grupo choque sem odor**.

Percebe-se que a extinção seletiva não foi suficiente para extinguir o contexto da expressão de memória de medo, ou seja, é necessário a presença tanto do contexto como de outros estímulos que estiveram presentes durante a aquisição da memória de medo original, para que ocorra uma extinção bem sucedida.

A extinção é caracterizada pela redução ou pela perda da resposta condicionada através da apresentação do CS que foi pareado com o US (STORSVSE, McNALLY & RICHARDSON, 2010; FENSTER et al, 2018). No entanto, a redução ou perda da resposta condicionada, nem sempre ocorre de forma permanente, e os fenômenos de renovação e reinstalação podem ocorrer com a memória de medo. Alguns autores discutem sobre a possibilidade de que as apresentações do CS poderiam levar à formação de uma associação CS-*no* US, que competiria com a associação entre US-CS (STORSVSE, McNALLY & RICHARDSON, 2010).

Rescorla em 1973 elaborou um procedimento denominado “Habituação ao US”, onde a apresentação repetida do US (som intenso de 105 dB) levou à diminuição da resposta ao CS durante o teste. Tal procedimento pode ser comparado ao que foi realizado no presente estudo, onde a apresentação apenas do US (choque) foi realizada nos animais. No trabalho de Storsvse, McNally & Richardson (2010), a habituação ao US levou a redução do *freezing* ao CS tanto administrada antes do condicionamento ao medo, quanto após o condicionamento ao medo.

Porém neste estudo não foi observado o procedimento da habituação ao US, pois no dia do teste com o odor após a extinção, os animais que receberam o choque e o odor mantêm um comportamento de *freezing* elevado em relação aos animais que receberam apenas o choque.

Os resultados obtidos no dia de teste com o odor após a extinção (Figura 14) mostraram diferenças entre os grupos amostrais através da ANOVA de duas vias (interação choque e odor [F (1,16)= 5,4536, **p=0,03288**]; odor [F (1,16)= 8,1034, **p=0,01166**]; choque [F (1,16) =3,4819, **p=0,08048**]. O *post hoc* indicou que o grupo

choque com odor apresentou maior tempo de congelamento que o grupo choque sem odor ($p=0,01024$) indicando que o condicionamento aversivo ao odor se manteve. Esse resultado mostra que a extinção seletiva do contexto não afetou a resposta condicionada ao odor. De certa forma tal resultado pode estar relacionado com o comportamento dos animais do grupo choque com odor durante a extinção, pois esses animais não tiveram uma redução do tempo de congelamento, mostrando que a sessão de extinção seletiva do contexto não influenciou no condicionamento ao odor.

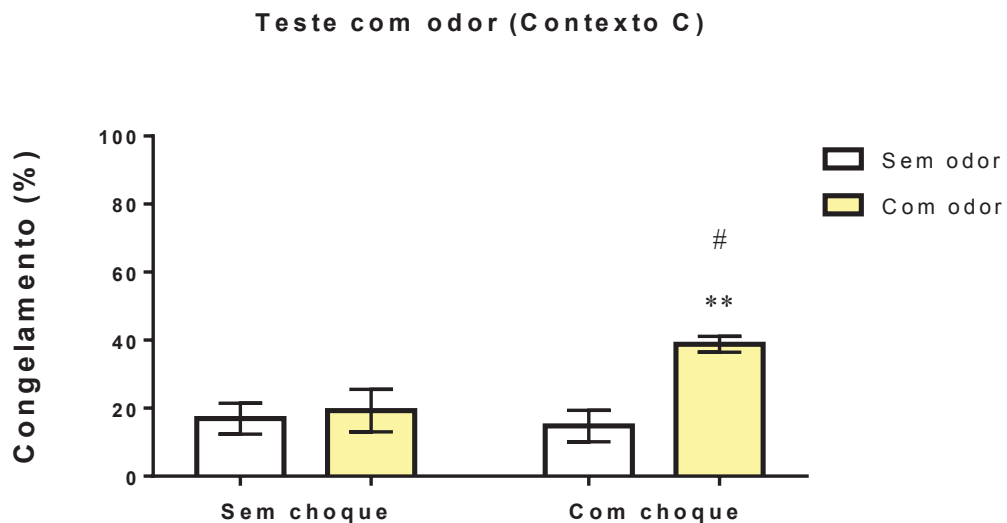


FIGURA 14: GRÁFICO DO TESTE COM ODOR APÓS A SESSÃO DE EXTINÇÃO.

O gráfico acima mostra o tempo de congelamento dos animais após a sessão de extinção. O tempo de congelamento foi obtido em segundos e expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: grupo **sem choque sem odor** (5), **grupo sem choque com odor** (5), **grupo com choque sem odor** (5) e **grupo com choque com odor** (5). O símbolo ** indica a diferença significativa entre o **grupo com choque com odor** e **grupo com choque sem odor**. # $p<0,05$ indica a diferença significativa entre o **grupo com choque com odor** e **os outros grupos amostrais**. ** $p<0,01$ na comparação entre o **grupo choque com odor** e **grupos sem choque com e sem odor**.

EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

O experimento 2 foi realizado para verificar se os animais eram capazes de aprender a associação entre a resposta condicionada de medo (devido ao pareamento entre choque (US) e contexto (CS1) com o odor (CS2). Assim, os animais condicionados ao contexto tiveram a memória aversiva evocada na presença do odor e posteriormente foram expostos ao odor em um novo contexto (Contexto C + odor), a fim de validar o condicionamento de segunda ordem. O resultado observado foi a inexistência do condicionamento de segunda ordem nos animais (Figura 16 B e C).

O gráfico 16-A mostra a evocação dos animais no contexto A, no período que foi apresentado o odor para os animais. Observa-se que os animais tiveram um congelamento de cerca de 60-70% do tempo total na evocação, o que indica que o condicionamento ao contexto foi eficaz nos animais. Esse resultado exclui a possibilidade de que o condicionamento de segunda ordem não ocorreu por uma possível falha no condicionamento ao medo. Nessa etapa foram retirados da análise estatística 10% dos animais que tiveram um congelamento abaixo de 30%.

O tempo de congelamento dos animais durante o teste com o odor no contexto C está indicado no gráfico B. Utilizando o teste t de Student para a comparação entre o grupo que recebeu o odor no momento da evocação e o grupo que não recebeu o odor na evocação, foi observado que o condicionamento de segunda ordem não ocorreu nos animais ($t=-1,31294$: $p>0,05$).

Os mesmos animais que foram testados com o odor, passaram por um teste após 7 dias, para verificar que o condicionamento de segunda ordem era capaz de ser formado após 7 dias do condicionamento. O resultado apontado no gráfico C mostrou que, após o período de 7 dias do condicionamento, tal associação não é formada nos animais (Teste t de Student: $t=0,62214$: $p>0,05$).

O resultado deste experimento mostrou que o condicionamento de segunda ordem não ocorreu nos animais após a associação entre o choque e contexto, e contexto e odor.

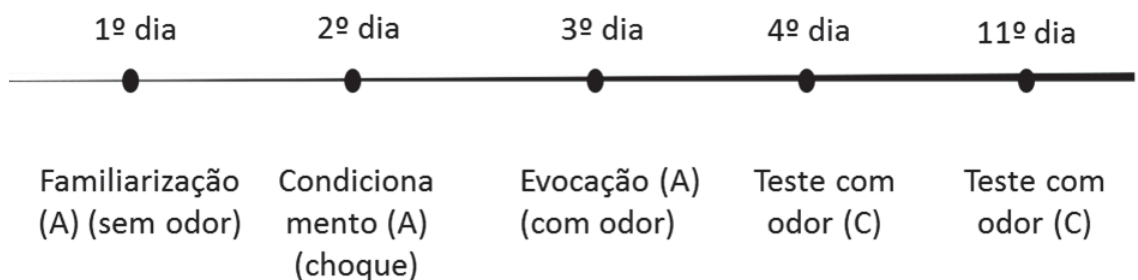


FIGURA 15: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 2

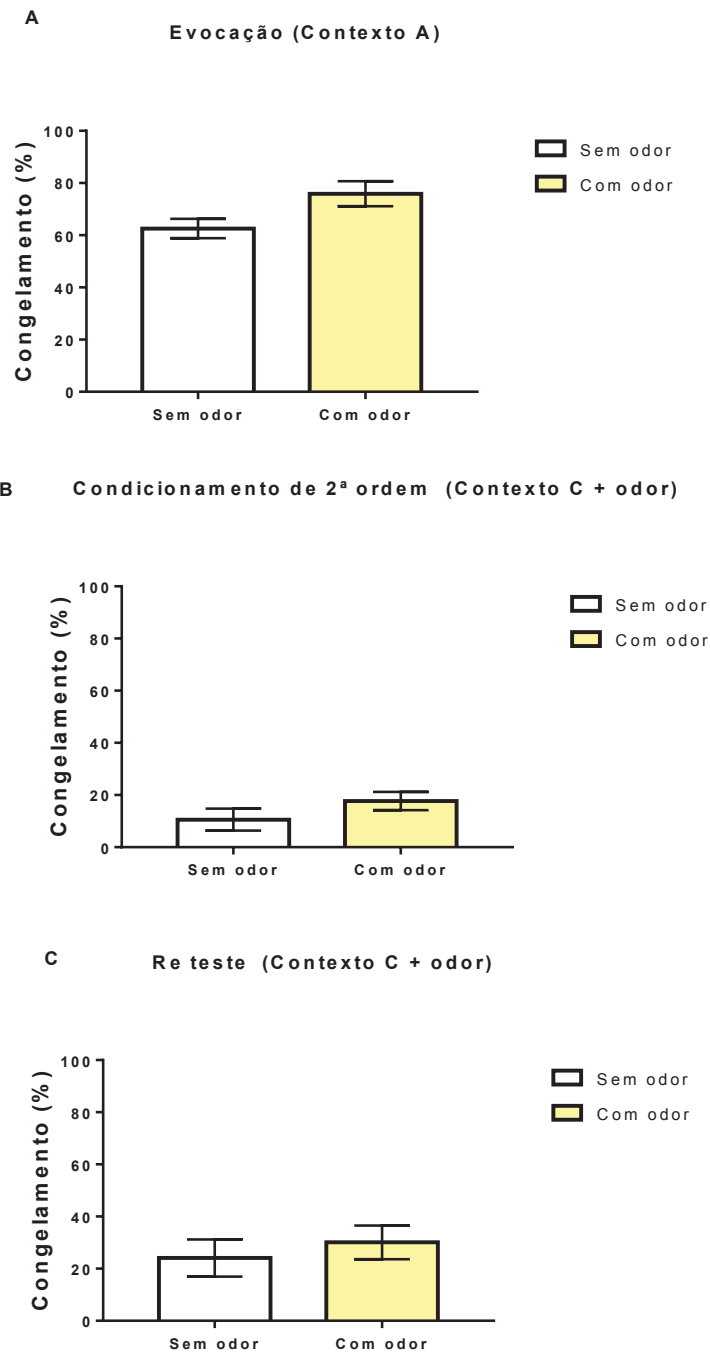


FIGURA 16: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 2.

Gráfico A: Tempo de congelamento dos animais no dia da evocação no contexto A, sem odor e com odor. O tempo de congelamento foi obtido em segundos expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **grupo com choque sem odor (9) grupo com choque com odor (10)**;

Gráfico B: Tempo de congelamento dos animais no dia de teste com o odor, para a verificação do condicionamento de segunda ordem. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **grupo com choque sem odor (9) grupo com choque com odor (10)**;

Gráfico C: Tempo de congelamento dos animais no teste com o odor após 7 dias do condicionamento de segunda ordem, para a avaliação da persistência do condicionamento de segunda ordem. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **grupo com choque sem odor** (8) **grupo com choque com odor** (10).

O condicionamento de segunda ordem de fato é tido como mais frágil do que o condicionamento de primeira ordem (GEWIRTZ & DAVIS, 2000). Além disso, o condicionamento de segunda ordem parece ser transitório, onde é observado um declínio de aprendizagem após alguns treinos realizados (GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

Embora no presente estudo não foi possível validar o condicionamento de segunda ordem, outros autores (Kroon e Carobrez, 2008), foram capazes de mostrar a ocorrência do condicionamento de segunda ordem, com um protocolo de condicionamento semelhante ao que foi utilizado neste trabalho.

EXPERIMENTO 3^a: A ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA NA FASE DE CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA LEVA A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

O experimento 3^a foi realizado para verificar a dose de ioimbina que leva à generalização da memória aversiva (expressão de congelamento no contexto C).

O primeiro resultado desse experimento é representado pelo gráfico 18-A, no qual está indicado a % de congelamento dos animais no momento da evocação. O resultado mostra que os animais tiveram um condicionamento bem sucedido, onde os grupos amostrais – veículo, ioimbina 1 mg/kg, ioimbina 2 mg/kg e ioimbina 3 mg/kg - tiveram um congelamento de cerca de 70-80%, sem diferença entre os grupos. Este resultado indica que os animais foram condicionados ao contexto, pois os mesmos tem um aumento na expressão do comportamento de medo. Nessa fase 10% dos animais foram retirados de cada grupo amostral, pois tiveram um tempo de congelamento abaixo de 30% durante a evocação.

O gráfico seguinte, mostrou a ocorrência da generalização nos animais através da dose de 3 mg/kg. A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os grupos [$F(3,42) = 3,1836$, $p = 0,03347$] (gráfico 18-B). Na análise *post hoc* foi observada uma diferença significativa entre o grupo ioimbina 3 mg/kg e o grupo veículo ($p = 0,02631$). Esse resultado indica que a dose de 3 mg/kg levou a generalização dos animais no contexto C. As doses de 2 mg/kg e 1 mg/kg não foram

estatisticamente diferentes do veículo ($p > 0,05$, respectivamente) e não levaram os animais a generalização no contexto C.

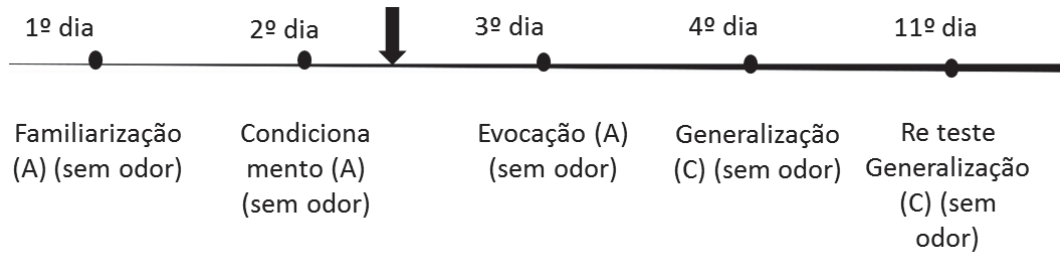


FIGURA 17: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3ª

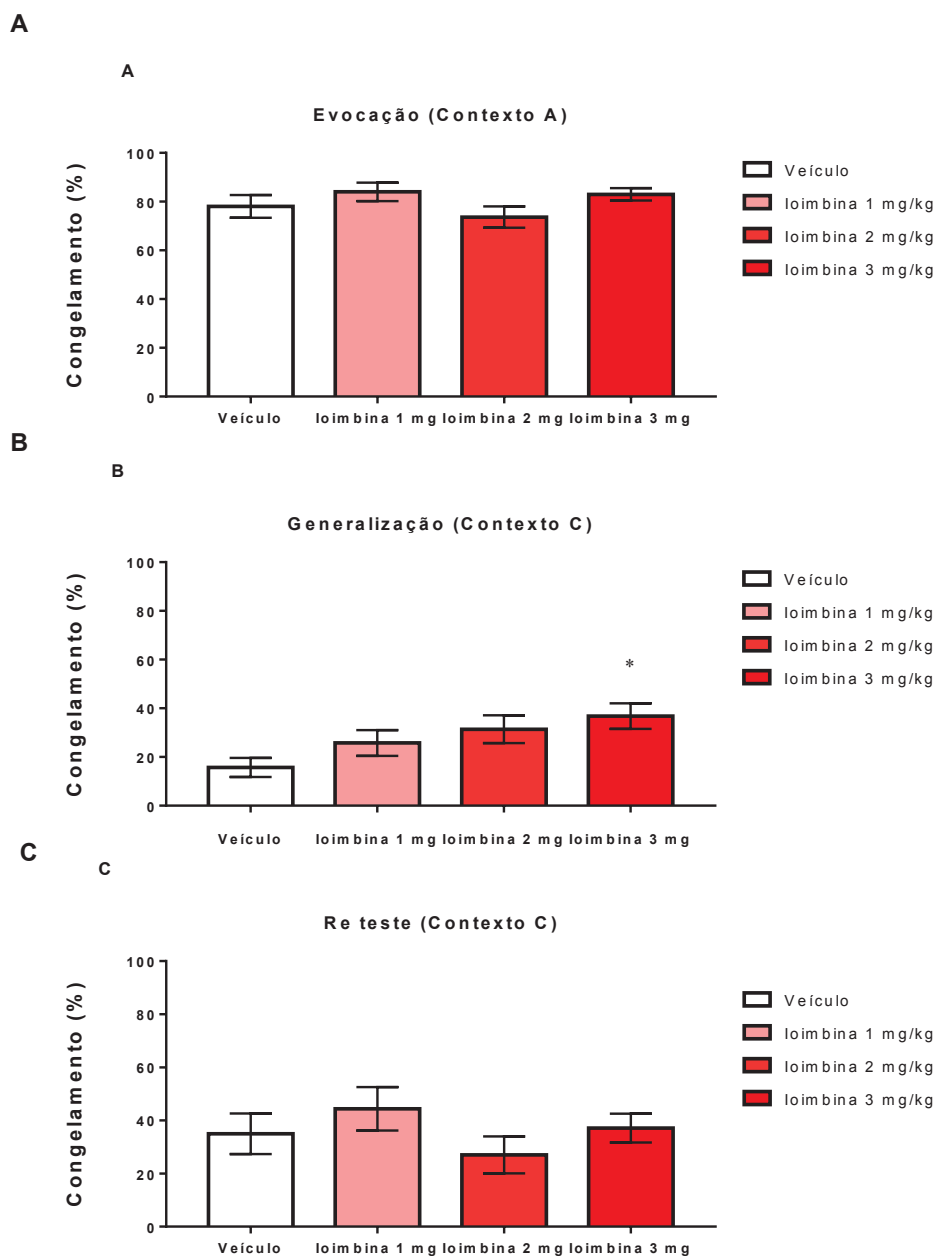


FIGURA 18: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3ª.

Gráfico A: Tempo de congelamento dos animais na evocação no contexto A um dia após a injeção IP de ioimbina imediatamente após o condicionamento dos animais. O tempo de congelamento foi obtido em segundos expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **veículo** (12), **ioimbina 1 mg/kg** (12), **ioimbina 2 mg/kg** (11) e **ioimbina 3 mg/kg** (11);

Gráfico B: Tempo de congelamento dos animais no teste para a generalização no contexto C um dia após a injeção IP de ioimbina imediatamente após o condicionamento de primeira ordem. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **veículo** (12), **ioimbina 1 mg/kg** (12), **ioimbina 2 mg/kg** (11) e **ioimbina 3 mg/kg** (11). * $p < 0,05$ na comparação entre o **grupo ioimbina 3mg e o grupo veículo**;

Gráfico C: Tempo de congelamento dos animais no contexto C após 7 dias do teste no contexto C. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **veículo** (11), **ioimbina 1 mg/kg** (11), **ioimbina 2 mg/kg** (11) e **ioimbina 3 mg** (11).

Gazarini e colaboradores (2014) mostraram que a dose de ioimbina de 1 mg/kg, aplicada imediatamente após o condicionamento dos animais, na fase da consolidação da memória, levou a generalização dos animais em um contexto diferente daquele em que os animais receberam o condicionamento.

No presente estudo não foi observado a generalização com a dose de 1 mg/kg. No trabalho de Gazarini e colaboradores em 2014 o protocolo de condicionamento utilizado foi choque de 0,7 mA com duração de 3 seg, sendo que no presente estudo, utilizou-se um choque de 0,5 mA com duração de 1 seg. Acredita-se que em razão das diferenças entre os protocolos, onde um choque de menor intensidade e de menor duração foi administrado, foi necessário uma dose maior da droga (3 mg/kg), e conseqüente, maior liberação de NA, para que a memória de medo generalizado fosse formada. As diferenças observadas podem ter ocorrido por conta das diferenças observadas em relação a procedência dos animais utilizados, o peso dos animais, entre outras características.

A dose de 3 mg/kg levou a generalização, comprovando que a ativação adrenérgica pela ioimbina levou à formação de uma memória generalizada, ou seja, existiu uma ativação de sintomas (medo) relacionado à memória original em um ambiente diferente daquele em que o condicionamento ao medo ocorreu.

Sabe-se que o uso de ioimbina pode aumentar a memória e o aprendizado (KAPLAN & MOORE, 2011). Em estudos anteriores mostrou-se que a administração aguda de ioimbina também levou à ativação de regiões relacionadas com o medo (SAVCHENKO & BOUGHTER JR, 2011).

Alguns efeitos fisiológicos sistêmicos estão relacionados com a administração de ioimbina, principalmente com o sistema simpático no organismo, como o aumento da pressão arterial (PA). Em uma condição de vasoconstrição pelo aumento da PA, os animais poderiam ter um comportamento de congelamento em razão da ativação de componentes simpáticos. No entanto foi demonstrado por Hubbard et al (1988), que através do uso intravenoso de ioimbina em doses diferentes (0,3, 1 e 3 mg/kg) em animais da linhagem *Sprague dawley*, ocorre uma rápida distribuição de ioimbina no cérebro que dura até um período de 8 horas, e que a concentração sérica dura até cerca de 16 horas. Como os testes são realizados 24 h após a aplicação de ioimbina nos animais, acredita-se que os resultados observados não ocorreram em razão de um possível congelamento dos animais pelos efeitos sistêmicos da droga *per se*, mas pela ativação central de receptores α adrenérgicos, conseqüentemente influenciando na consolidação da memória de medo, dado pelo condicionamento de primeira ordem e formando a memória de medo generalizada.

Os mesmos animais que passaram pela generalização com ioimbina foram testados no contexto C novamente após 7 dias (Figura 18-C). Os resultados encontrados mostraram que após 7 dias, a generalização observada pelos animais que receberam a dose de 3 mg/kg de ioimbina não ocorreu, mostrando que a generalização ocasionada pela dose de ioimbina 3 mg/kg tem uma duração curta. A análise estatística (ANOVA de uma via – fator tratamento), não mostrou um resultado significativo [$F(3,40) = 1,0093$, $p > 0,05$]. Foi realizada também a ANOVA de medidas repetidas, comparando o tempo de congelamento da generalização com o reteste [tratamento: $F(6, 78) = 2,1083$, $p > 0,05$], indicando uma tendência à generalização em todos os grupos.

O resultado mostra que a generalização demonstrada inicialmente pela dose de 3 mg/kg no contexto C não ocorreu nos animais após o período de 7 dias. O grupo que recebeu a dose de 3mg/kg não demonstrou um aumento do comportamento de congelamento no contexto C, como foi apresentado inicialmente na análise da generalização após a administração de ioimbina. Percebe-se que o grupo que recebeu a dose de ioimbina de 1 mg/kg apresenta uma propensão ao aumento do comportamento de congelamento, porém, o resultado não é significativo. O grupo que recebeu a dose de 2 mg/kg aparenta estar com uma diminuição do tempo de congelamento em tal contexto, porém, tal diminuição também não foi significativa. Tais resultados demonstram que o efeito produzido pela ioimbina é de curta duração, mas

que a droga promove a generalização dos animais em um contexto não pareado com o contexto em que ocorreu o condicionamento com o choque, mostrando que possivelmente a ioimbina influenciou na consolidação da memória, levando à formação de uma memória generalizada.

Visto que a dose de 1 mg/kg não leva à generalização, essa dose foi escolhida para o experimento seguinte.

EXPERIMENTO 3B: A ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA APÓS O CONDICIONAMENTO E A EVOCAÇÃO COM O ODOR NÃO LEVA AO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

O experimento 3b foi realizado com o intuito de verificar se a dose de ioimbina 1 mg/kg era capaz de fortalecer a formação de uma memória aversiva pelo condicionamento com dois estímulos diferentes, o condicionamento de segunda ordem.

O resultado obtido mostra que a ioimbina na dose de 1 mg/kg não foi capaz de levar a formação da memória aversiva pelo condicionamento de segunda ordem. O protocolo desse experimento teve como objetivo principal induzir uma liberação de NA no momento da consolidação da memória de medo, dada pela administração de ioimbina após o condicionamento com o choque e após o condicionamento de segunda ordem, pela administração de ioimbina após a evocação dos animais com o odor de banana. Para isso, os animais foram distribuídos em quatro grupos amostrais: **veículo-veículo, veículo-ioimbina, ioimbina-veículo, ioimbina-ioimbina.**

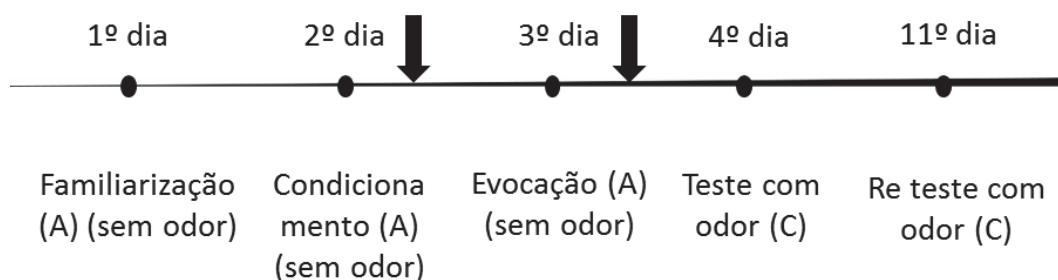
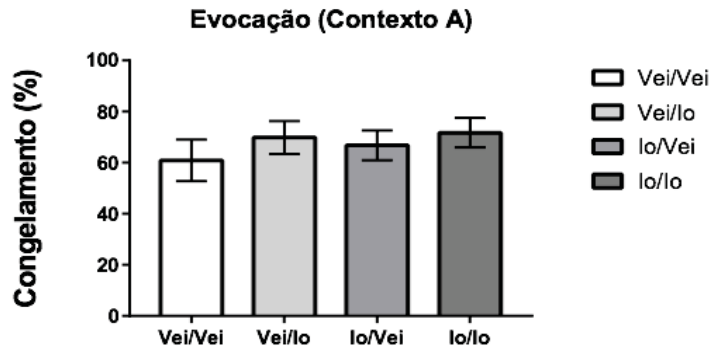
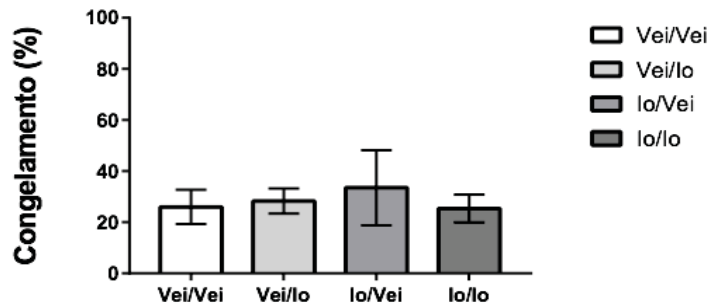


FIGURA 19: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3B

A**B**

Condicionamento de 2ª ordem (Contexto C + odor)

**C**

Re teste (Contexto C + odor)

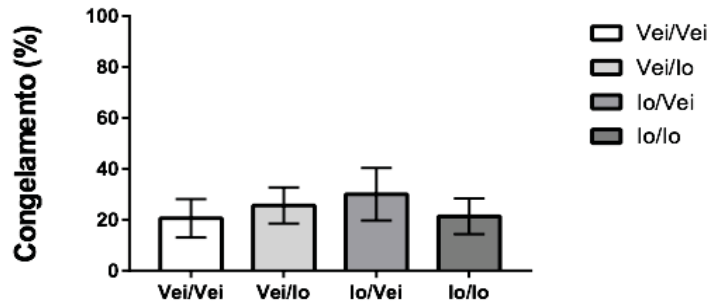


FIGURA 20: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3B.

Gráfico A: Tempo de congelamento dos animais durante a evocação, no contexto A após a injeção IP de veículo ou ioimbina. O tempo de congelamento foi obtido em segundos e expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **veii/veii** (8), **veii/io** (9), **io/veii** (9) e **io/io** (9);

Gráfico B: Tempo de congelamento dos animais durante o teste no contexto C após a injeção IP de veículo ou ioimbina. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **veii/veii** (8), **veii/io** (9), **io/veii** (9) e **io/io** (9);

Gráfico C: Tempo de congelamento dos animais 7 dias após o teste no contexto C. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: **veii/veii** (8), **veii/io** (9), **io/veii** (9) e **io/io** (9).

O primeiro resultado obtido (Figura 20 - A) mostra que todos os grupos amostrais, durante a evocação com o odor por 5 minutos, tiveram um comportamento de congelamento com uma duração de cerca de 60-70% do tempo total do teste. Esse resultado indica que o condicionamento foi bem sucedido, e que os animais tiveram um condicionamento ao contexto, ou seja, no retorno ao contexto/ambiente em que a memória traumática foi originada, foi demonstrado um comportamento de medo pelos animais. Nenhum animal foi retirado da análise estatística durante a evocação por não apresentar um congelamento abaixo de 30% do tempo do teste.

Esse resultado mostra que a ausência de formação da memória aversiva pelo condicionamento de segunda ordem não ocorreu pela possível falha no condicionamento dos animais.

O segundo gráfico (Figura 20 – B) indica que no momento do teste com o odor, não foi observada nenhuma diferença significativa no comportamento de congelamento entre os grupos que receberam veículo ou ioimbina depois do condicionamento ou da evocação. Através desse resultado pode-se observar que com a administração de ioimbina não levou ao aumento do congelamento e consequente formação do condicionamento de segunda ordem.

Esperava-se que o grupo que recebeu ioimbina após o condicionamento e/ou após a evocação, expressasse um comportamento de medo elevado em comparação aos outros grupos amostrais. Porém, todos os grupos apresentaram tempo de congelamento semelhante entre si no contexto com o odor. A ANOVA de duas vias não foi significativa (interação: $[F(1, 31) = 4,6817, p > 0,05]$; tratamento após o choque $[F(1,31) = 5,4822, p > 0,05]$; tratamento após o odor $[F(1, 31) = 0,2591, p > 0,05]$ (Figura 20-B).

Já o resultado do reteste (Figura 20 – C) mostra o nível de congelamento dos animais 7 dias após o teste com o odor no contexto C que foram testados nesse contexto novamente para verificar se após 7 dias a memória aversiva do condicionamento de segunda ordem seria formada. O resultado encontrado foi que o grupo que recebeu io-vei parece ter um aumento no comportamento de congelamento em comparação com o grupo vei-vei, vei-io e io-io, mas o resultado não foi significativo (Anova de duas vias: interação: $[F(1, 31) = 7,70253, p > 0,05]$; tratamento após o choque: $[F(1, 31) = 10,100, p > 0,05]$; tratamento após o odor: $[F(1, 31) = 0,2591, p > 0,05]$.

O experimento realizado mostrou que a dose de 1 mg/kg de ioimbina administrada após o condicionamento, após a evocação ou em ambos os momentos não foi capaz de formar o condicionamento de segunda ordem nos animais.

EXPERIMENTO 3C: A ADMINISTRAÇÃO DE IOIMBINA APÓS A EVOCÇÃO NÃO INDUZ O CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

O experimento 3c foi realizado com o intuito de administrar doses mais altas de ioimbina a fim de facilitar a formação da memória aversiva através do condicionamento de segunda ordem. Nesse experimento foi administrado veículo, ioimbina na dose de 2 mg/kg ou 3 mg/kg após a evocação com ou sem o odor de banana.

O gráfico 22-A indica a % de congelamento durante a evocação no contexto A. A % de congelamento ficou entre 50-70%, e pôde se reconhecer a validade do condicionamento ao medo. Nesta etapa foram retirados da análise estatística os animais que tiveram um tempo de congelamento abaixo de 30% durante o teste (grupo sem odor: veículo (10%), ioimbina 2 mg/kg (50%) e ioimbina 3 mg/kg (20%); grupo com odor: veículo (30%), ioimbina 2 mg/kg (30%) e ioimbina 3 mg/kg (30%)).

O gráfico 22-B mostra a % de congelamento no teste com o odor no contexto C, no dia seguinte após a administração de veículo, ioimbina 2 mg/kg ou 3 mg/kg depois da evocação.

A administração de doses mais altas de ioimbina não foi capaz de levar à formação do condicionamento de segunda ordem nos animais, como foi evidenciado por esse experimento. De acordo com o gráfico 22-B, percebe-se que o grupo que recebeu o odor na evocação não condicionou ao odor no contexto C. Na relação entre ps animais que receberam o veículo com os animais que receberam ioimbina 2 mg/kg ou 3 mg/kg, percebe-se que houve um pequeno aumento no tempo de congelamento, mas tal aumento não foi estatisticamente comprovado (ANOVA de duas vias: interação [F (2, 24)= 1,1250, $p>0,05$]; tratamento [F (2, 24)= 2,3780, $p>0,05$]; odor [F (1, 30)= 0,41422, $p>0,05$]). Já o grupo que recebeu ioimbina 2 mg/kg e que não recebeu o odor na evocação, teve aparente aumento no tempo de congelamento (congelamento em torno de 40%), mas não foi estatisticamente significativo.

Esperava-se que o grupo que recebeu o odor na evocação, e que recebeu as doses mais altas de ioimbina tivesse um aumento considerável do comportamento de congelamento, em razão das evidências que mostram que a liberação de NA

influencia no fortalecimento de memórias aversivas. No entanto, o resultado observado mostrou que não existe uma relação da liberação sistêmica de NA pelo uso do fármaco ioimbina sobre a formação do condicionamento de segunda ordem.

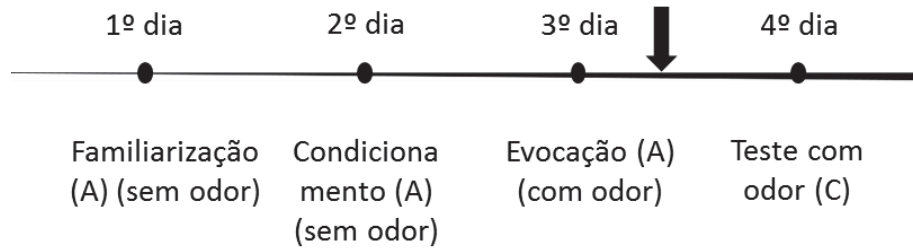
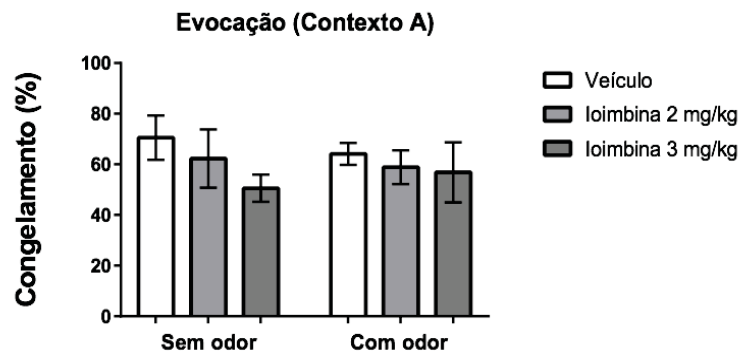


FIGURA 21: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3C

A



B

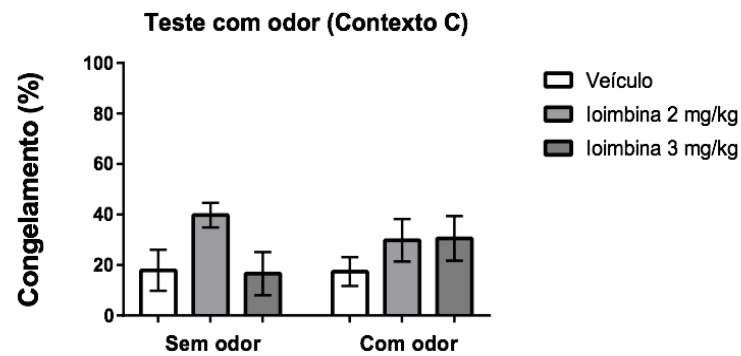


FIGURA 22: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3C.

Gráfico A: Tempo de congelamento dos animais durante a evocação, no contexto A após o condicionamento dos animais. O tempo de congelamento foi obtido em segundos e expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: sem odor: **vei** (6), **ioimbina 2mg/kg** (4), e **ioimbina 3 mg/kg** (5); com odor: **vei** (5), **ioimbina 2mg/kg** (5), e **ioimbina 3 mg/kg** (5);

Gráfico B: Tempo de congelamento dos animais durante o teste no contexto C após a injeção IP de veículo ou ioimbina e apresentação ou não do odor durante a evocação. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: sem odor: sem odor: **vei** (6),

ioimbina 2mg/kg (4), e ioimbina 3 mg/kg (5); com odor: vei (5), ioimbina 2mg/kg (5), e ioimbina 3 mg/kg (5).

Os resultados desse experimento mostram que não existe uma relação na formação do condicionamento de segunda ordem pela liberação de NA sistêmica e ação consequente sobre a região da BLA. Sabe-se que a NA possui uma influência sobre a consolidação e fortalecimento de memórias de medo, contudo, a dose de 2 mg/kg e de 3 mg/kg não foram capazes de facilitar a formação de tal condicionamento.

EXPERIMENTO 3D: A REEXPOSIÇÃO DO ODOR NA EVOCAÇÃO NÃO LEVA AO CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

O experimento 3d teve como objetivo a reexposição ao odor na evocação com a finalidade de ocorrência do condicionamento de segunda ordem nos animais.

Os gráficos 24 A e B mostram o tempo de congelamento nas sessões de evocação dos animais. Pode-se perceber uma igualdade nos dois dias de apresentação do odor em relação ao tempo de congelamento dos animais, mostrando que não ocorreram falhas no condicionamento. Foram retirados da análise estatística os animais que tiveram um congelamento abaixo de 30% durante o teste (grupo com odor (40%); grupo sem odor (10%)).

O gráfico 24-C indica o tempo de congelamento dos animais no contexto C com a presença do odor. O teste t de Student ($t = 1,21642$; $p > 0,05$) mostrou que o grupo com odor não foi diferente do grupo sem odor, demonstrando a inexistência do condicionamento de segunda ordem.

O resultado observado mostra que a reexposição ao odor durante a evocação não leva ao condicionamento de segunda ordem. Esperava-se que a reexposição dos animais ao odor facilitasse a formação do condicionamento de segunda ordem.

Desta forma, o condicionamento de segunda ordem não é formado após a obtenção de uma memória traumática e reexposição ao contexto no qual a memória foi formada através da apresentação de um odor no momento em que o animal está expressando o congelamento. Portanto, não ocorre uma “atualização” da memória traumática com novas informações que levem ao condicionamento de segunda ordem.

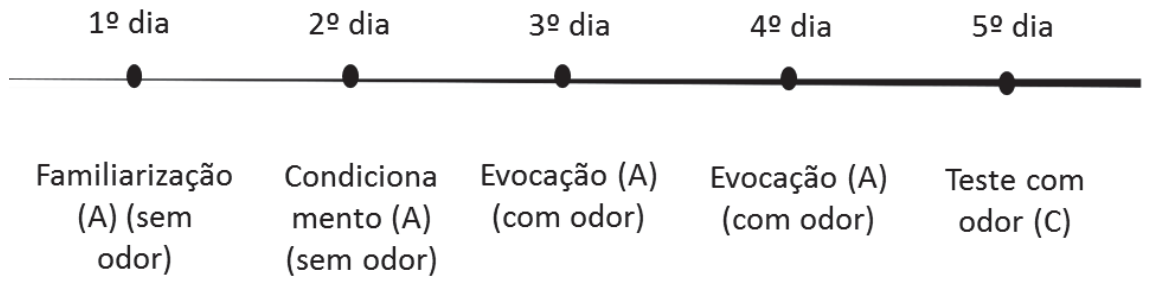
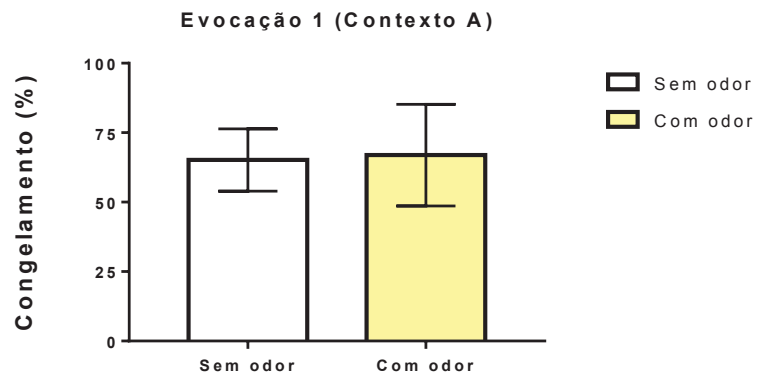
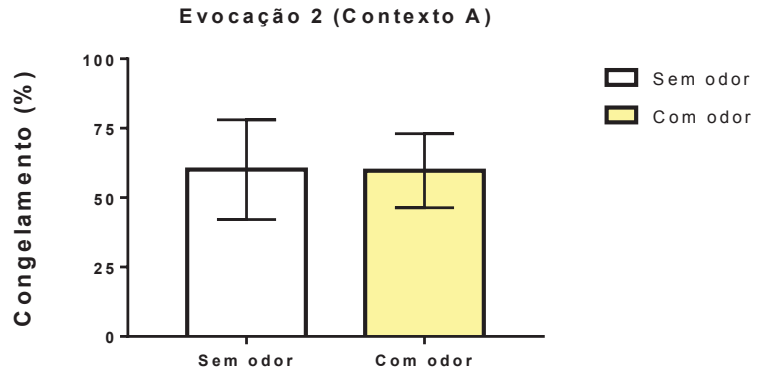


FIGURA 23: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3D

A



B



Condicionamento de 2ª ordem (Contexto C com odor)

C

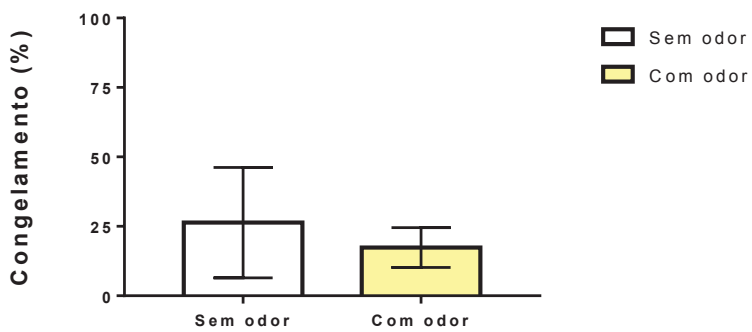


FIGURA 24: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3C.

Gráfico A: Tempo de congelamento dos animais durante a primeira evocação, no contexto A após o condicionamento dos animais. O tempo de congelamento foi obtido em segundos e expresso em porcentagem (%). O n e cada grupo foi, respectivamente: sem odor (12); com odor (11);

Gráfico B: Tempo de congelamento dos animais durante a segunda evocação, no contexto A após o condicionamento dos animais. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: sem odor (11); com odor (11);

Gráfico C: Tempo de congelamento dos animais no teste com o odor no contexto C. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: sem odor (11); com odor (8).

Um aspecto importante que envolve o condicionamento ao medo é o contra condicionamento. O contra condicionamento acontece quando um comportamento que é indesejável ou aversivo pode ser extinto quando é ensinado um comportamento diferente para o animal. Desse modo, o novo comportamento ensinado para o animal compete com a execução do comportamento que está relacionado a algo indesejável, negativo ou aversivo (POGGIAGLIOLMI, 2017). No contra condicionamento, o estímulo que é aversivo é pareado com um estímulo condicionado positivo (NEWALL et al, 2017).

O resultado observado no experimento 3d pode ter relação com o contra condicionamento, pelo fato de no momento da evocação, quando o animal está expressando o congelamento está sendo introduzida uma nova informação (o odor) e esta nova informação sendo neutra, poderia estar influenciando na execução do comportamento de congelamento no dia seguinte (teste com o odor).

O contra condicionamento pode ser observado na clínica, e estudos já mostraram resultados positivos através desse protocolo. Raes e Readt (2012) realizaram um estudo com voluntários que receberam o condicionamento com uma imagem de rosto humano com estímulo condicionado e um ruído branco desagradável como estímulo incondicionado. Tais voluntários receberam o contra condicionamento com um som neutro e com um som positivo (risada de bebê). Os resultados mostraram que o contra condicionamento reduziu as respostas avaliativas dos voluntários frente a tarefa de *priming* afetivo.

Um estudo realizado por Newall et al em 2017 mostrou que o contra condicionamento é mais efetivo do que a extinção para diminuir o medo em crianças. Nesse estudo as crianças foram expostas a figuras de dois animais, onde um deles foi pareado com uma figura de um rosto humano assustador (CS+) e a outra imagem

não recebeu nenhum estímulo adicional (CS-). As crianças participaram do grupo do contra condicionamento (animal + rosto feliz), extinção (apenas o animal) ou controle (nenhum procedimento para reduzir o medo). As crianças que passaram pelo procedimento do contra condicionamento expressaram uma redução do medo frente ao CS+ (teste pelo questionário FBQ – *Fear Belief Questionnaire*).

Os resultados obtidos indicam que o contra cmondicionamento pode ter ocorrido, embora o odor seja neutro, e portanto o comportamento de congelamento dos animais no dia do teste com odor pode ter diminuído em razão da reexposição do odor no momento da evocação.

Em razão dos resultados desse experimento, foi realizado o experimento 3e, administrando o odor na reconsolidação da memória, a fim de evitar o contra condicionamento.

EXPERIMENTO 3E: A EXPOSIÇÃO DO ODOR NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NÃO PROMOVE O CONDICIONAMENTO DE SEGUNDA ORDEM

O experimento 3e foi realizado para verificar se a exposição do odor imediatamente após a evocação (janela de reconsolidação), em um novo contexto, era capaz de promover o condicionamento de segunda ordem nos animais.

O gráfico abaixo (Figura 26 – A) mostra o congelamento dos animais durante a evocação. Pode-se perceber que o congelamento do grupo que não recebeu o odor na evocação em comparação com o grupo que recebeu o odor encontra-se semelhante, em torno de 60-70%. Dessa forma, acredita-se que o condicionamento ao medo ocorreu nos animais. Foram retirados 10% dos animais do grupo com odor da análise estatística, pois tais animais demonstraram uma expressão de congelamento abaixo de 30% do tempo de teste.

O gráfico 26-B mostra o tempo de congelamento dos animais após a evocação e apresentação do odor, no 4º dia de teste. O teste t de Student não indicou a ocorrência do condicionamento de segunda ordem, através da comparação dos grupos sem odor e com odor ($t=1,25751$; $p>0,05$).

Esperava-se que os animais do grupo com odor tivessem um aumento do tempo de congelamento no teste com odor para que o condicionamento de segunda ordem fosse formado, porém esse resultado não foi observado. Além disso, pode ser notado que o tempo de congelamento dos animais sem odor é alto, podendo ter ocorrido generalização da resposta aversiva no grupo controle.

O resultado indicou que o condicionamento de segunda ordem não é formado durante a janela de reconsolidação da memória.

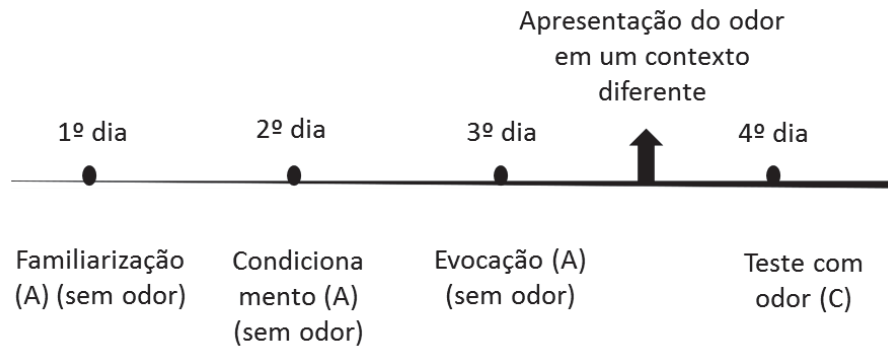


FIGURA 25: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3E

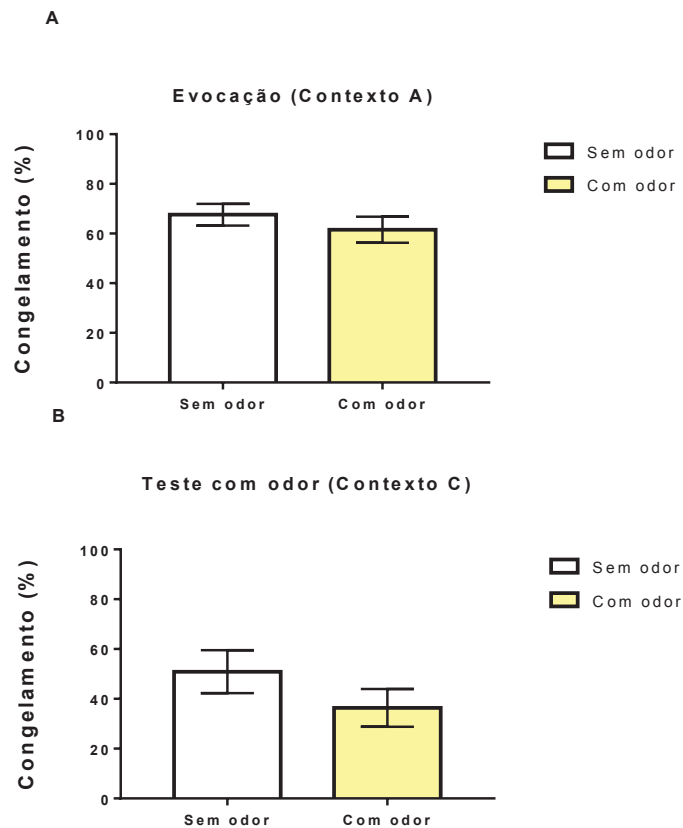


FIGURA 26: GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 3E.

Gráfico A: Tempo de congelamento dos animais durante a evocação, no contexto A após o condicionamento dos animais. O tempo de congelamento foi obtido em segundos e expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: sem odor (10); com odor (9);

Gráfico B: Tempo de congelamento dos animais durante o teste com o odor no contexto C. O tempo de congelamento foi expresso em porcentagem (%). O n de cada grupo foi, respectivamente: sem odor (10); com odor (9);

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Através desse trabalho foi possível constatar a complexidade envolvida com o desenvolvimento do modelo animal do condicionamento de segunda ordem, utilizando com estímulo condicionado o odor de banana, e como estímulo incondicionado o choque nas patas de ratos Wistar. O desenvolvimento desse modelo deve incluir características observadas na clínica, a fim de que as características que envolvem os pacientes com o TEPT sejam esclarecidas, a fim do entendimento de como tal transtorno é mantido por um período de tempo tão longo. É primordial que o condicionamento de segunda ordem possa ser elucidado, pois existem várias características que ainda não foram esclarecidas, como por exemplo, quais neurotransmissores estão envolvidos com o desenvolvimento/formação do condicionamento de segunda ordem. Através desse estudo, pode-se verificar que a administração sistêmica de ioimbina e consequente ação da droga no sistema nervoso central, não levou à formação do condicionamento de segunda ordem, quando administrada após o condicionamento ao medo e/ou após a evocação, em diferentes doses. Apesar de ter ocorrido generalização da memória aversiva no grupo controle em alguns experimentos, os resultados encontrados no presente estudo indicam que a reexposição do odor na evocação da memória e a apresentação de um novo estímulo durante a janela de reconsolidação não foram suficientes para levar à formação do condicionamento de segunda ordem, indicando possíveis mecanismos distintos entre a reconsolidação e a consolidação do condicionamento de segunda ordem.

REFERÊNCIAS

- ABRARI, K. et al. Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: dependence upon training intensity. **Neurobiology of learning and memory**. v. 89, n. 2, p. 178–84, fev, 2008.
- AGREN, T. Human reconsolidation: A reactivation and update. **Brain Research Bulletin**, v. 105, p. 70-82, jun, 2014.
- ALBERINI, M. C. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the scepticism. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 89, n. 3, p. 234–246, mar, 2008.
- ALBERINI, M. C. The role of reconsolidation and the dynamic process of long term memory formation and storage. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 5, p. 01-10, mar, 2011.
- ALBRECHT, A.; STORK, O. Circadian rhythms in fear conditioning: An Overview of Behavioral, Brain System, and Molecular Interactions. **Neural Plasticity**. v. 2017, p. 1-12, 2017.
- BOUTTON, M. E. et al. Renewal after the extinction of free operant behavior. **Learning & Behavior**. v. 39, n.1, p. 57-67, mar, 2011.
- BUSH, D. E. A. et al. Beta-adrenergic receptors in the lateral nucleus of the amygdala contribute to the acquisition but not the consolidation of auditory fear conditioning. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**. v. 4, p. 1-7, 2010.
- BLISS, T. V. P. & LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*. v. 232, p. 331-356, 1973.
- CANTERAS, N. S.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A. P. Olfactory instruction for fear: neural system analysis. **Frontiers in Neuroscience**. v. 9, n. 276, p. 1-10, ago, 2015.
- DAVIES, M. F. et al. Activation of α 2 adrenergic receptors suppresses fear conditioning: expression of c-fos and phosphorylated CREB in mouse amygdala. **Neuropsychopharmacology**. v. 29, n. 2, p. 229-239, out, 2003.
- DęBIEC, J.; BUSH, D. E. A.; LEDOUX, J. E. Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats - a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. **Depression And Anxiety**. v. 28, n. 3, p. 186-193, mar, 2011.

DUVARCI, S. & PARE, D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. **Neuron**. v. 82, n. 5, p. 966-980, jun, 2014.

FENDT, M., KOCH, M.D., SCHNITZLER, H. Amygdaloid noradrenaline is involved in the sensitization of the acoustic startle response in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 48, n. 2, p. 307-314, 1994.

FENSTER, R. J. et al. Brain circuit dysfunction in post- traumatic stress disorder: from mouse to man. **Nature Reviews: Neuroscience**. v. 19, p. 535-551, set, 2018.

GAZARINI, L. et al. PTSD-Like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**. v. 18, n. 1, p. 1-9, out, 2014.

GEWIRTZ, J. C. & DAVIS, M. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learning and Memory**. v. 7, p. 257–266, 2000.

GIUSTINO, T. F.; MAREN, S. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**. v. 9, p. 1-20, nov, 2015.

GOLD, P. E. & VAN BUSKIRK, R. Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. **Behavioural Biology**. v. 23, p. 509-520, 1978.

GONCZAROWSKA, N. **Efeitos da modulação do sistema endocanabinoide na interação social e extinção da memória aversiva em macacos-prego (Sapajus spp)**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

HAUBRICH, J. et al. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. **Neuropsychopharmacology**. v. 40, p. 315–326, jul, 2015.

HUBBARD, J. W. et al. The pharmacokinetic properties of yohimbine in the conscious rat. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 337. p. 583-587, 1988.

HUCKINS, L. M.; LOGAN, D. W.; SÁNCHEZ-ANDRADE, G. Olfaction and olfactory-mediated behaviour in psychiatric disease models. **Cell and Tissue Research**. v. 354, p. 69–80, 2013.

HURLEMANN, R. et al. Human amygdala reactivity is diminished by the β -noradrenergic antagonist propranolol. **Psychological Medicine**. v. 40, n. 11, p. 1839-1848, jan, 2010.

IZQUIERDO, Ivan et al. Protein synthesis and memory. **Encyclopedia Of Psychopharmacology**. p. 1-4, 2013.

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

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

KING, G. et al. A precision medicine approach to pharmacological adjuncts to extinction: a call to broaden research. **Psychopharmacology**. p. 1-19, ago, 2018.

KROON, J. A. V.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 91, p. 32-40, 2009.

LALUMIERE, R.T.; MCGAUGH, J. L.; MCINTYRE, C.K. Emotional modulation of learning and memory: pharmacological implications. **Pharmacological Reviews**. v. 69, n. 3, p. 236-255, abr, 2017.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**. n. 23, p. 155-184, 2000.

LEIDL, D. M. et al. Protein synthesis in the basolateral amygdala complex is required for consolidation of a first-order fear memory, but not for consolidation of a higher-order fear memory. **Neurobiology Of Learning And Memory**. v. 153, p. 153-165, set, 2018.

LINSTER, C.; ESCANILLA, O. Noradrenergic effects on olfactory perception and learning. **Brain Research**. p. 1-6, mar, 2018.

LOPRESTO, D.; SCHIPPER, P.; HOMBERG, J. R. Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 60, p. 31-42, jan, 2016.

LUCAS, E. K. et al. Prazosin during fear conditioning facilitates subsequent extinction in male C57Bl/6N mice. **Psychopharmacology**. p. 1-7, ago, 2018.

MAHAN, A. L.; RESSLER, K. J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends In Neurosciences**. v. 35, n. 1, p. 24-35, jan. 2012.

MCGAUGH, J. L. Memory--a Century of Consolidation. **Science**. v. 287, n. 5451, p. 248-251, jan, 2000.

MCGAUGH, J. L.. Making lasting memories: Remembering the significant. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**. v. 110, n. 2, p. 10402-10407, jun, 2013.

MCINTYRE, C. K.; HATFIELD, T.; MCGAUGH, J. L. Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. **European Journal of Neuroscience**. v. 16, n. 7, p. 1223-1226, out, 2002.

MOURA, C. M. **A consolidação prévia de informação conflitante e não aversiva é necessária para a reconsolidação da memória de esquia inibitória no hipocampo**. 40 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

NASEHI, M. et al. Modulation of cannabinoid signaling by amygdala $\alpha 2$ - adrenergic system in fear conditioning. **Behavioural Brain Research**. v. 300, p. 114-122, mar, 2016.

NEWALL, C. et al. The relative effectiveness of extinction and counter-conditioning in diminishing children's fear. **Behaviour Research And Therapy**. v. 95, p. 42-49, ago, 2017.

NICOLL, R. A. A Brief History of Long-Term Potentiation. **Neuron**. v. 93, n. 2, p. 281-290, jan, 2017.

PAMPLONA, F. A. et al. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. **Psychopharmacology**. v. 188, n. 4, p. 641–649, nov, 2006.

PARKES, S. L.; WESTBROOK, R. F. Role of the basolateral amygdala and NMDA receptors in higher-order conditioned fear. **Reviews Neuroscience**. vol. 22, n. 3, p. 317-333, 2011.

PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nature Neuroscience**. v. 16, n. 2, p. 146-153, jan, 2013.

PASCHALL, G. Y., DAVIS, M. Second-order olfactory-mediated fear-potentiated startle. **Learning and Memory**. v.9, p. 395-401, 2002.

PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes. **Oxford University Press**. 1927.

PINENO, O. et al. Second-order conditioning during a compound extinction treatment. **Learning and Motivation**. v. 38, p. 172–192, 2006.

POGGIAGLIOLMI, S. Desensitization and counterconditioning. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n. 3, p. 433-442, mai, 2018.

PONNUSAMY, R. et al. Retrieval and reconsolidation accounts of fear extinction. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**. v. 10, p. 1-11, mai, 2016.

PRUD'HOMME, M. J. et al. Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. **Neuroscience**. v. 162, n.4, p. 1287-1298, mai, 2009.

RAES, K. A. & RAEDT, R. The effect of counterconditioning on evaluative responses and harm expectancy in a fear conditioning paradigm. **Behavior Therapy**. v. 43, p. 757–767, 2012.

RESCORLA, R. Effect of US habituation following conditioning. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v. 82. n. 1, 1973.

SARDARI, M. et al. Basolateral amygdala GABA-A receptors mediate stress-induced memory retrieval impairment in rats. **The International Journal Of Neuropsychopharmacology**. v. 17, n. 04, p. 603-612, nov, 2013.

SAVCHENKO, V. L.; BOUGHTER, J. D. Regulation of neuronal activation by alpha2A adrenergic receptor agonist. **Neurotoxicity Research**. v. 20, n. 3, p. 226-239, dez, 2010.

SBARDELLOTO, G. et al. Transtorno de estresse pós-traumático: evolução dos critérios diagnósticos e prevalência. **Psico-USF**. v. 16, n. 1, p. 67-73, jan-abr, 2011.

SCHWARZ, L. A.; LUO, L. Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. **Current Biology**. v. 25, n. 21, p. 1051-1056, nov, 2015.

SEVELINGES, Y. et al. Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. **Learning and Memory**. v. 11, p. 761-769, 2004.

SEVELINGES, Y.; DESGRANGES, B.; FERREIRA, G. The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory. **Learning and Memory**. v. 16, n. 4, p. 235-242, mar, 2009.

SILVA, T. **Efeito da administração de tamoxifeno na reconsolidação da memória aversiva no condicionamento do medo contextual em ratos**. 47 f.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

SMITH, N. B. et al. Fear extinction and memory reconsolidation as critical components in behavioral treatment for posttraumatic stress disorder and potential augmentation of these processes. **Neuroscience Letters**, v. 649, p. 170-175, mai, 2017.

SOUTHWICK, Steven M. et al. Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 266-274, abr, 1993.

STICHT, M. A. et al. Second-order conditioning of LiCl-induced gaping with flavor and contextual cues. **Learning & Behavioral**. v. 43, p. 95-100, dez, 2015.

STORSVE, A. B.; MCNALLY, G. P.; RICHARDSON, R. US habituation, like CS extinction, produces a decrement in conditioned fear responding that is NMDA dependent and subject to renewal and reinstatement. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 93, n. 4, p. 463-471, mai, 2010.

TODD, T. P. et al. Higher-order conditioning and the retrosplenial cortex. **Neurobiology Of Learning And Memory**. v. 133, p. 257-264, set, 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.

VOLIANSKIS, A. et al. Long-term potentiation and the role of N -methyl- d -aspartate receptors. **Brain Research**. v. 1621, p. 5-16, set, 2015.

WATKINS, L. E.; SPRANG, K. R.; ROTHBAUM, B. O. Treating PTSD: A review of evidence-based psychotherapy interventions. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 1-9, nov, 2018.

WESSA, M.; FLOR, H. Failure of extinction of fear responses in posttraumatic stress disorder: evidence from second-order conditioning. **The American Journal of Psychiatry**. v.164, n. 11, p. 1684–1692, nov, 2007.

WICKING, M. et al. Deficient fear extinction memory in posttraumatic stress disorder. **Neurobiology Of Learning And Memory**. v. 136, p. 116-126, dez, 2016.

WIEMERS, U. S.; SAUVAGE, M. M.; WOLF, O. T. Odors as effective retrieval cues for stressful episodes. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 112, p. 230-236, jul, 2014.

WOOD, N. E. et al. Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: Three negative psychophysiological studies. **Psychiatry Research**, v. 225, n. 1-2, p. 31-39, jan, 2015.

WU, Y. et al. Differential effect of beta-adrenergic receptor antagonism in basolateral amygdala on reconsolidation of aversive and appetitive memories associated with morphine in rats. **Addiction Biology**. v. 19, n. 1, p. 5-15, mar, 2012.

ZARETSKY, D. V. et al. Yohimbine is a 5-HT_{1A} agonist in rats in doses exceeding 1 mg/kg. **Neuroscience Letters**. v. 606, n. 8, p. 215-219, out, 2015.