

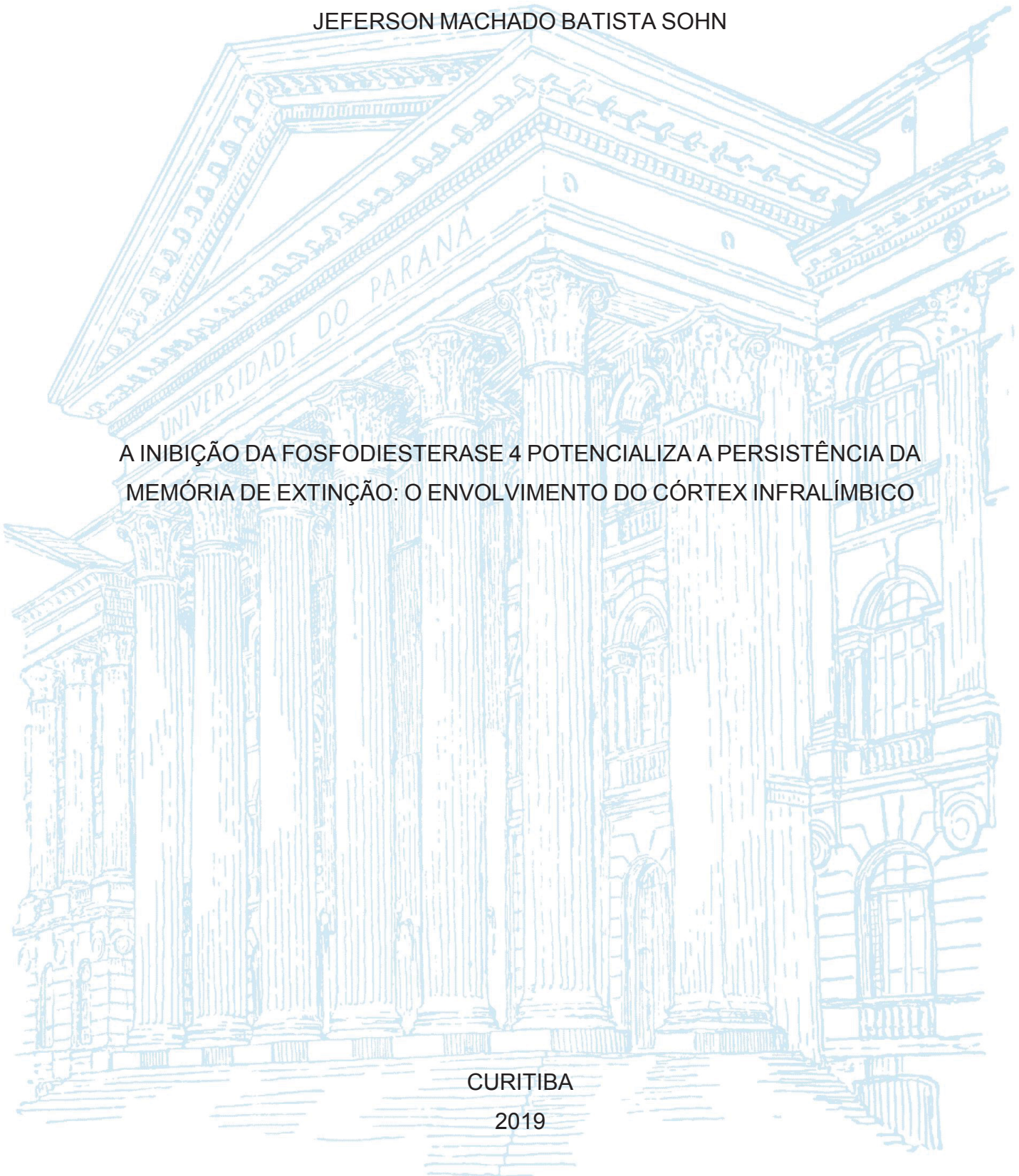
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JEFERSON MACHADO BATISTA SOHN

A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 4 POTENCIALIZA A PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE EXTINÇÃO: O ENVOLVIMENTO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO

CURITIBA

2019



JEFERSON MACHADO BATISTA SOHN

A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 4 POTENCIALIZA A PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE EXTINÇÃO: O ENVOLVIMENTO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina A. Jark Stern.

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Sohn, Jeferson Machado Batista

A inibição da fosfodiesterase 4 potencializa a persistência da memória de extinção: o envolvimento do córtex infralímbico. / Jeferson Machado Batista Sohn. – Curitiba, 2019.

83 p.: il.

Orientador: Cristina A. Jark Stern

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Memória 2. Inibidores da Fosfodiesterase 4 3. Medo I. Título II. Stern, Cristina A. J. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.8521



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JEFERSON MACHADO BATISTA SOHN** intitulada: **A inibição da fosfodiesterase 4 potencializa a persistência da memória de extinção: o envolvimento do córtex Infralímbico**, após terem inquirido o aluno 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, 12 de Julho de 2019.

Cristina Stern

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

Leandro Jose Bertoglio

LEANDRO JOSE BERTOGLIO

Avaliador Externo (UFSC)

Bruno J. Martynhak

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho a minha avó, Terezinha, pois, graças a sua paciência e atenção eu cheguei até aqui. Foi o incentivo dela, que me fez encontrar a área de saúde como carreira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nunca me abandonou nos momentos difíceis. Ele teve papel essencial na realização dessa pesquisa.

Sou muito grato à Prof^a Dra. Cristina Stern pela orientação e auxílio, que /foram fundamentais em todas as etapas do mestrado.

Aos meus colegas de laboratório, que me ajudaram em todos os momentos em especial a Ana Maria, um apoio contínuo, a Suzen, que foi meu braço direito durante a execução dos experimentos, ao Thiago, que sempre prestou todo o suporte necessário, às ICs: Bia, Bruna, Thaís e Mariana invariavelmente prontas para ajudar.

Ao prof. Dr. Jos Prickaerts, pela doação do Roflumilaste, droga fundamental para a realização dos experimentos.

Ao prof. Dr. Aleksander Zampronio pela doação do H89, fundamental para compreender os mecanismos do fármaco.

A prof^a Dra. Rubia de Oliveira e a Jéssica Bonato, pela execução das análises western blot, que auxiliaram na compreensão dos efeitos encontrados.

Agradeço a CAPES e a NUFFIC pelo apoio financeiro ao projeto e pela concessão das bolsas de estudo que foram fundamentais para a conclusão do projeto.

Agradeço a minha família por todo o carinho e orientação até aqui. Aos meus pais, que sempre me guiaram para os melhores caminhos e sempre incentivaram o melhor de mim. Aos meus irmãos, que sempre estão do meu lado. A Paula, meu porto seguro, que sempre me deu todo o suporte. Ao Jake, por sempre ser uma fonte de alegria independente da situação. Aos meus sogros, por acreditar no meu potencial e pelo apoio. E a todos os outros membros da família que sempre estiveram ao meu lado e sempre acreditam nos meus planos, a todos, muito obrigados por tudo.

Agradeço também aos meus animais de laboratório, pois, sem eles, este trabalho não seria possível.

“Deixe o mundo um pouco melhor do que encontrou”

(Baden Powell)

RESUMO

O transtorno de estresse pós-traumático é uma doença psiquiátrica desenvolvida a partir de um evento traumático. Um possível tratamento é a terapia de exposição prolongada, a qual está associada com a formação da memória de extinção. A extinção da memória de medo dependente da consolidação, um fenômeno dependente de síntese proteica e de vias de sinalização como a do 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC)/proteína quinase A (PKA)/proteína de ligação do elemento responsivo ao AMPC (CREB)/fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Além disso, uma das regiões fundamentais para a formação da extinção é o córtex infralímbico (IL). Neste cenário, o roflumilaste (ROF), inibidor seletivo da fosfodiesterase 4 pode amplificar a sinalização desta via. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar se a administração de ROF durante as etapas do aprendizado da extinção poderia melhorar sua persistência. Para isso, utilizou-se ratos Wistar inicialmente submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de transição claro escuro (TCE) 20 min após a administração do ROF (0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg), para avaliar comportamentos associados à ansiedade. Em seguida, grupos independentes de animais foram submetidos ao protocolo de condicionamento e extinção da memória de medo contextual. Esses grupos receberam ROF (0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg) 20 min antes ou 5 min, 3 h e 6 h após a sessão de extinção. Além disso, o ROF (9 ng/0.2 µl) também foi diretamente infundido no IL 5 min e 3 h após a extinção. Foi utilizado também o H89 (10 µM; inibidor de PKA) no IL após 3 h. Um grupo adicional recebeu veículo ou ROF (0,03 mg/kg; i.p.) as 3 h após a extinção e foram eutanasiados 11 dias após a extinção e o IL foi dissecado para análises da expressão de BDNF, proteína de densidade sináptica (PSD95) e Sinaptofisina por Western Blot. Os resultados encontrados mostram que o ROF não alterou o comportamento de ansiedade e exploratório dos animais. A administração na aquisição da extinção apontou um efeito de melhora da extinção durante a sessão com a dose intermediária (0,03 mg/kg), enquanto a maior dose (0,1 mg/kg) apresentou piora na expressão da extinção no dia seguinte, mas esses efeitos não foram duradouros. Durante a fase inicial da consolidação, o ROF não produziu nenhum efeito. Já na fase tardia (3 h), a dose de 0,03 mg/kg potencializou a persistência da extinção. O mesmo padrão foi encontrado com a administração de ROF no IL, afinal, a administração de ROF 5 min após a sessão de extinção, não alterou a expressão do congelamento dos animais, mas quando administrado 3 h após a extinção o ROF potencializou a persistência da extinção. Esse efeito foi dependente da atividade da PKA no IL e do aumento da expressão de BDNF nessa região, mas sem alteração da sinaptofisina. Independente do tratamento, os grupos que foram submetidos ao protocolo de extinção apresentaram redução da expressão de PSD95 no IL. Em conjunto, os resultados encontrados indicam que o ROF administrado na fase tardia da consolidação é capaz de melhorar a persistência da extinção, o qual depende da atividade da PKA no IL e está relacionado com o aumento da expressão de BDNF no córtex IL.

Palavras-chave: BDNF; Condicionamento de medo ao contexto; Roflumilaste; H89; PKA.

ABSTRACT

The posttraumatic stress disorder is a psychiatric disease developed from a traumatic event. A possible treatment is the prolonged exposure therapy, which is associated with the extinction memory formation. The fear memory extinction depends on consolidation, a process conditioned to protein synthesis and signaling pathways such as cyclic 3'5'-adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/element binding protein responsive to cAMP (CREB)/brain derived neurotrophic factor (BDNF). Moreover, a key region underlying extinction is the infralimbic cortex (IL). In this context, roflumilast (ROF), a selective inhibitor of phosphodiesterase 4, may amplify this signaling pathway. Thus, the objective of this study was to evaluate whether the ROF administration during the stages of extinction learning could improve its persistence. For this, male Wistar rats were initially submitted to the elevated plus-maze (EPM) and the light-dark transition test (LDT) 20 minutes after ROF (0.01, 0.03 and 0.1 mg/kg) administration to evaluate anxiety-associated behaviors. Then, independent groups of animals were submitted to the protocol of fear conditioning and memory extinction. These groups received the same doses of ROF 20 min before or 5 min, 3 h and 6 h after the extinction session. Additionally, the ROF (9 ng/0.2 μ l) was also directly infused into IL 5 min and 3 h after extinction. H89 (10 μ M; PKA inhibitor) was also infused into IL after 3 h. An additional group received vehicle or ROF (0.03 mg/kg; i.p.) 3 h after extinction and were euthanized 11 days after extinction and the IL was dissected for analyzes of BDNF, PSD95 and Synaptophysin expression by Western Blot. The results showed that ROF did not produce any effect in anxiety and exploratory behavior. ROF (0.03 mg/kg) administration before acquisition of extinction reduced the freezing behavior during the extinction session, while the higher dose (0.1 mg/kg) impaired the expression of extinction during the next day, but these effects were not long lasting. During the initial consolidation phase, ROF had no effect. In the late phase (3 h), the dose of 0.03 mg/kg increased the persistence of extinction. The same pattern of results was observed with the administration of ROF into the IL. After 5 min ROF did not alter the freezing expression, but when administered 3 h after extinction, ROF potentiated the extinction persistence. This effect was dependent on PKA activity in IL and the increase of BDNF expression in this region, but without synaptophysin alteration. Regardless of the treatment, the groups submitted to the extinction protocol showed reduction of PSD95 expression in IL. Taken together, the results indicate that ROF administered in the late phase of consolidation is able to improve the persistence of extinction. This result depends on the activity of PKA in IL and is related to the increase of BDNF expression in the IL cortex.

Keywords: BDNF; Contextual fear conditioning; Roflumilast; H89; PKA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A formação e manutenção da memória de medo.....	21
Figura 2. Os neurocircuitos envolvidos com a expressão e supressão do comportamento do medo aprendido	24
Figura 3. Participação da FDE na sinalização celular.....	29
Figura 4. Representação do sítio de injeção no córtex IL.....	35
Figura 5. O efeito do ROF administrado 20 min antes da sessão de extinção.....	44
Figura 6. O efeito do ROF administrado 5 min após a sessão de extinção.....	45
Figura 7. O efeito do ROF administrado 3 horas após a sessão de extinção.....	46
Figura 8. O efeito do ROF administrado 6 horas após a sessão de extinção.....	47
Figura 9. O efeito do ROF infundido no Córtex IL 5 min após a sessão de extinção.....	48
Figura 10. Efeitos do ROF infundidos em IL 3 horas após a sessão de extinção.....	49
Figura 11. O inibidor de PKA (H89) administrado no córtex IL reverte o efeito do ROF administrado na fase tardia da consolidação.....	51
Figura 12. Expressão de marcadores de plasticidade quando o ROF (0,03 mg/kg) foi administrado (i.p.) na fase tardia da consolidação.....	52
Figura 13. O efeito do ROF na extinção.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – O Efeito do tratamento com ROF no LCE.....	43
Tabela 2 – Efeito do Tratamento com ROF no TCE.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- AMPA - Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- AMPC - Monofosfato de adenosina cíclico
- ANOVA - Análise de variância (do inglês, *analysis of variance*)
- AP - Antero-Posterior
- BA - Amígdala Basal (do inglês, *basal amigdala*)
- BDNF - Fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)
- BLA - Amígdala Basolateral (do inglês, *basolateral amigdala*)
- CaMKII - Proteína quinase II dependente de cálcio
- CEm - Núcleo centro-medial da Amígdala (do inglês, *centro-medial amigdala*)
- CPFm - Córtex pré-frontal medial
- CPFvm - Córtex pré-frontal ventro-medial
- CREB - Proteína de ligação do elemento responsivo ao AMPc (do inglês, *cyclic amp-response element binding protein*)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica
- DSM-V - Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5.^a edição (do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5*)
- DV - Dorso-Ventral
- EBA - Entrada braços abertos
- EBF - Entrada braços fechados
- EC - Estímulo condicionado
- EI - Estímulo incondicionado
- EPM - Erro padrão da média
- ERK - Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês, *Extracellular signal-regulated kinases*)
- EUA - Estados Unidos da América
- FDE - Fosfodiesterase
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- GMPc - Monofosfato de guanosina cíclico
- H89 - Diclorohidratado - H89
- HCl - Ácido clorídrico

HIP - Hipocampo
i.p. - Intraperitoneal
IL - Infralímbico
ITC - Células intercalares da amígdala
LA - Amígdala Lateral (do inglês, *lateral amigdala*)
LCE - Labirinto em Cruz Elevado
LTP - Potenciação de longa duração (do inglês, *Long-term potentiation*)
ML - Médio-Lateral
NaCl - Cloreto de sódio
NC - Número de cruzamentos
NMDA - N-metil-d-aspartato
PKA - Proteína Quinase A (do inglês, *Protein Kinase A*)
PKG - Proteína quinase G
PKM ζ - Proteína quinase M ζ
PL - Pré-límbico
PSD95 - Proteína de densidade pós-sináptica 95 (do inglês, *postsynaptic density protein 95*)
ROF - Roflumilast
SNC - Sistema nervoso central
TBA - Tempo nos braços abertos
TBS-T - Salina tamponada tris com tween 20 (do inglês, *Tris Buffered Saline with Tween 20*)
TCC - Tempo no compartimento claro
TCE - Transição claro escuro
TE1 - Teste da extinção 1
TE2 - Teste da extinção 2
TEPT - Transtorno de estresse pós-traumático
TrkB - Tirosina quinase B
VEI - Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	O TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO	18
1.2	O CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO	19
1.3	A MEMÓRIA AVERSIVA	20
1.4	A MEMÓRIA DE EXTINÇÃO.....	23
1.5	AS FOSFODIESTERASES	28
1.6	O ROFLUMILASTE	30
1.7	JUSTIFICATIVA	31
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	32
2.1	HIPÓTESE	32
2.2	OBJETIVO GERAL.....	32
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	ANIMAIS.....	33
3.2	DROGAS.....	34
3.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA, INFUSÃO DE DROGAS NO CÓRTEX IL E HISTOLOGIA	34
3.4	CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO	35
3.5	TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	37
3.6	TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO (TCE).....	37
3.7	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE BDNF, PSD95 E SINAPTOFISINA POR WESTERN BLOT	38
3.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
3.8.1	Experimento 1: Avaliação do efeito do ROF no comportamento exploratório e nos comportamentos do tipo ansioso.....	39

3.8.2	Experimento 2: Avaliação do efeito do ROF na aquisição da memória de extinção	39
3.8.3	Experimento 3: Avaliação do efeito do ROF durante a fase inicial de consolidação da extinção	39
3.8.4	Experimento 4: Avaliação do efeito do ROF durante a fase tardia da consolidação da extinção	40
3.8.5	Experimento 5: Avaliação do efeito do ROF 6 horas após a extinção.....	40
3.8.6	Experimento 6: Avaliação do efeito do ROF administrado no córtex IL durante a fase inicial da consolidação da extinção.	40
3.8.7	Experimento 7: Avaliação do efeito do ROF administrado no córtex IL durante a fase tardia da consolidação.....	40
3.8.8	Experimento 8: Avaliação do efeito da inibição da PKA no córtex IL no efeito do ROF administrado sistemicamente durante a fase tardia da consolidação.	41
3.8.9	Experimento 9: Avaliação da expressão de BDNF, Sinaptofisina e PSD95 no córtex IL quando o ROF foi administrado sistemicamente durante a fase tardia da consolidação.....	41
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4	RESULTADOS	42
4.1	NAS DOSES SELECIONADAS O ROF NÃO PRODUZIU NENHUM EFEITO NO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO E NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DOS ANIMAIS.	42
4.2	DURANTE A AQUISIÇÃO, O ROF FACILITOU A EXTINÇÃO E PREJUDICOU A EVOCAÇÃO DA EXTINÇÃO, CONTUDO, NENHUM DOS EFEITOS É PERSISTENTE.....	43

4.3	O ROF ADMINISTRADO NA FASE INICIAL DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO NÃO ALTEROU A EXPRESSÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO.....	44
4.4	O TRATAMENTO COM ROF NA FASE TARDIA DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO POTENCIALIZOU A PERSISTÊNCIA DA EXTINÇÃO NO TE2.....	45
4.5	O TRATAMENTO COM ROF 6 HORAS DEPOIS DA EXTINÇÃO NÃO INTERFERIU NA EVOCAÇÃO DA EXTINÇÃO.	46
4.6	O ROF ADMINISTRADO NO CÓRTEX IL NA FASE INICIAL DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO NÃO INTERFERE NA EXPRESSÃO DA EXTINÇÃO.....	47
4.7	O ROF ADMINISTRADO DIRETAMENTE NO CÓRTEX IL NA FASE TARDIA DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO POTENCIALIZA A PERSISTÊNCIA DA EXTINÇÃO NO TE2.....	48
4.8	O INIBIDOR DE PKA REVERTE O EFEITO DO ROF QUANDO ADMINISTRADO DIRETAMENTE NO CÓRTEX IL.....	50
4.9	A DOSE INTERMEDIÁRIA DE ROF ADMINISTRADA NA FASE TARDIA DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO AUMENTOU A EXPRESSÃO DE BDNF MAS NÃO DOS MARCADORES DE PLASTICIDADE, SINAPTOFISINA E PSD95 NO CÓRTEX IL.....	51
5	DISCUSSÃO.....	52
5.1	A AUSÊNCIA DO EFEITO DO ROF NOS COMPORTAMENTOS ASSOCIADOS COM A ANSIEDADE E ATIVIDADE EXPLORATÓRIA.....	53
5.2	O EFEITO DO ROF NA AQUISIÇÃO DA EXTINÇÃO.....	55
5.3	O EFEITO DO ROF NA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO.....	57
5.3.1	O efeito do ROF na fase inicial da consolidação da extinção.....	57
5.3.2	O efeito do ROF na fase tardia da consolidação da extinção.....	60

5.3.3 O efeito do ROF é restrito a janela de consolidação	61
5.3.4 O efeito do ROF administrado no córtex IL nas fases inicial e tardia da consolidação	61
5.3.5 O efeito do ROF é dependente da atividade da PKA	63
5.3.6 O efeito do ROF administrado na fase tardia da consolidação na expressão de BDNF, PSD95 e Sinaptofisina no córtex IL	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
<u> </u> REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma doença psiquiátrica relacionada a um trauma e ao estresse (DSM-V, 2013) que se desenvolve a partir da exposição do indivíduo a um evento traumático (CAREAGA, GIRARDI & SUCHEKI, 2016) definido como uma situação que apresenta ameaça iminente à vida, gerando uma resposta intensa de medo (CREAMER, BURGESS & MCFARLANE, 2001). Os pacientes com TEPT apresentam sinais importantes para a identificação da doença como: recorrência de memórias intrusivas, evitação e hiperexcitabilidade (DSM-V, 2013).

Embora nem todas as pessoas expostas a eventos estressantes extremos desenvolvem o TEPT, este é o quarto transtorno psiquiátrico mais comum nos EUA (BRESLAU et al., 1991; KESSLER et al., 1995; CAREAGA, GIRARDI & SUCHEKI, 2016). Estudos epidemiológicos na população em geral revelam que antes dos ataques de 11 de setembro, 5 a 6% dos homens e 10 a 14% das mulheres apresentavam sintomas de TEPT ao longo da vida (BRESLAU et al., 1991, KESSLER et al., 1995, RESNICK et al. 1993), depois do ataque, estes números dobraram (BOWLER et al., 2017). Além disso, relatos anteriores indicam que cerca de 50% das mulheres que foram vítimas de abuso sexual desenvolvem o transtorno (CREAMER et al., 2001). Em veteranos de guerra, outro grupo de risco para a doença, a porcentagem fica em torno de 13 à 15% (CAREAGA, GIRARDI & SUCHEKI, 2016).

Esses eventos traumáticos promovem a formação de uma memória de medo associativa, sendo que um desequilíbrio no processo de aprendizado e na evocação dessa memória seria um dos fatores para o início da doença (MICHOPoulos, NORRHOLM & JOVANOVIC, 2015). Ao mesmo tempo essa memória está envolvida com os principais sintomas apresentados na doença: as lembranças angustiantes, recorrentes e involuntárias do evento traumático (DSM-5, 2013). Ao evocar esta memória os pacientes com TEPT re-experenciam a situação traumática por meio de pesadelos, *flashbacks* e expressam reações de medo quando expostos a situações que remetem ao trauma (HUGHES & SHIN, 2011).

O processamento das memórias aversivas depende do recrutamento de estruturas cerebrais como o hipocampo, o córtex pré-frontal medial (CPFm) e a amígdala. Em pacientes com TEPT apresentam, quando comparados ao grupo controle, hiperatividade da amígdala e o córtex cingulado anterior enquanto há hipoatividade do hipocampo e o córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm; HUGHES & SHIN, 2011; HAYES, VANELZAKKER & SHIN 2012).

Com relação ao tratamento da doença, uma possível psicoterapia utilizada como recurso terapêutico para o TEPT é a terapia de exposição prolongada (HOFMANN, 2007), que é um técnico cognitivo comportamental que se baseia no mecanismo de extinção da memória, nos quais os pacientes são expostos a sinais que são relacionados ao evento traumático (pensamentos, sentimentos e situações). Estes sinais são apresentados ao paciente de forma repetida e prolongada a fim de reduzir os sintomas do estresse pós-traumático (MORRISON & RESSLER, 2013). Contudo, o processo de extinção apresenta limitações, entre elas, a recuperação espontânea, fenômeno caracterizado pela recuperação das respostas de medo (HOFMANN, 2007; MORRISON & RESSLER, 2013; KLAVIR, GENUUD-GABAI & PAZ, 2012).

Portanto, é importante compreender melhor os mecanismos envolvidos na formação e manutenção da memória de medo, para encontrar maneiras de enfraquecer a recuperação das respostas de medo. Em estudos pré-clínicos, o protocolo de condicionamento de medo ao contexto, é um modelo animal que permite mimetizar a formação da memória de medo como no TEPT, sendo assim, uma ferramenta para compreender os mecanismos envolvidos na manutenção da memória aversiva (MORRISON & RESSLER, 2013; IZQUIERDO, FURINI & MYSKIW, 2016).

1.2 O CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

O estudo do condicionamento foi primeiramente descrito em 1927 por Pavlov, que mostrou que os cães eram capazes de associar o som de um sino a uma recompensa apetitiva e, depois de condicionados a receber a recompensa após o sino, o estímulo sonoro *per se* já era capaz de estimular a produção de saliva (PAVLOV, 1927). Embora esse trabalho tratasse de memórias apetitivas, modelos de condicionamento clássico têm sido amplamente utilizados para o

estudo de memórias aversivas e contribuído para a compreensão das etapas de formação e manutenção dessas memórias, principalmente pela sua fácil reprodutibilidade (BOUTON & MOODY, 2004).

No modelo de condicionamento Pavloviano, os animais são apresentados a um estímulo sensorial prévio, até então neutro, como um som, odor, luz ou contexto, sendo esse, o estímulo condicionado (EC). Especificamente para o condicionamento ao contexto, os animais formam uma representação espacial relacionada ao contexto previamente exposto, processo importante para o estabelecimento de uma memória contextual de longa duração (FANSELOW, 2010).

Desta forma, após a exposição ao contexto é feito o pareamento desse EC a um estímulo aversivo, usualmente por meio de choques nas patas, introduzindo o estímulo incondicionado (EI). O EI aversivo naturalmente induz uma resposta comportamental de medo e assim esse pareamento leva a formação de uma memória de medo associativa (IZQUIERDO, FURINI & MYSKIW, 2016). A formação dessa memória de medo torna este modelo animal uma ferramenta adequada para explorar os mecanismos associados com a formação e manutenção das memórias aversivas.

1.3 A MEMÓRIA AVERSIVA

Durante o protocolo de condicionamento de medo ao contexto, o momento em que o EC é pareado com o EI é chamado de sessão treino ou sessão de condicionamento, em que há o processo de aquisição da memória aversiva e há a ativação de circuitos neurais específicos que serão estabilizados pelo processo de consolidação. Tais mecanismos associados com a formação e manutenção das memórias estão representados na figura 1.

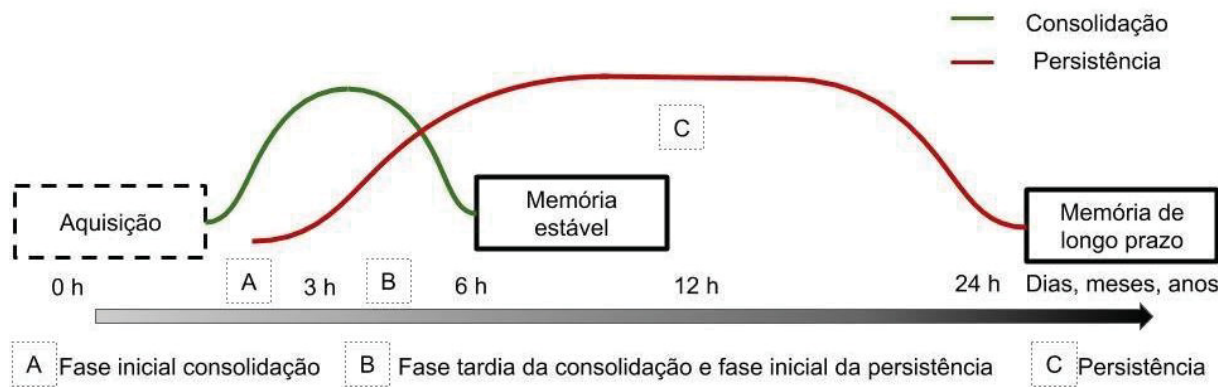


Figura 1. A formação e manutenção da memória de medo. Após um evento aversivo há a aquisição da memória em que ocorre a ativação de circuitos de neurônios, que depois de estabilizada sustentará a memória. A estabilização depende dos mecanismos de consolidação e persistência. A consolidação é dividida em duas etapas: **A** - Fase inicial da consolidação (0-3 h) em que há aumento de proteínas e neurotransmissores envolvidos na transmissão de sinal; **B** - Fase tardia da consolidação (3-6 h) com a síntese de proteínas que mantém a LTP e estabiliza o traço de memória. Durante a consolidação também há o início do processo de persistência, representado por **C**, que é uma onda de síntese proteica tardia que atua na manutenção das memórias de longo prazo.

O processo de consolidação pode ser dividido em, uma fase inicial e uma fase tardia. A fase inicial da consolidação, ocorre imediatamente após o aprendizado, com o aumento de proteínas, neurotransmissores e receptores envolvidos na amplificação da transmissão do sinal como: óxido nítrico, monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), proteína quinase G (PKG), proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII), noradrenalina, glutamato, receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; BOURTCHOULADZE et al., 1998; MCGAUGH, 2000; KIDA, 2019; BERNABEU et al., 1997; KANDEL, 2001; FINKBEINER et al., 1997).

Por sua vez, a fase tardia da consolidação, que ocorre aproximadamente na metade da janela de consolidação, está mais associada com o aumento de expressão de sinalizadores que vão induzir o remodelamento sináptico como, por exemplo: o 3'5'-adenosina- monofosfato-cíclico (AMPc), a proteína quinase A (PKA), a proteína de ligação do elemento responsivo ao AMPc (CREB) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; BOURTCHOULADZE et al., 1998; MCGAUGH, 2000; KIDA, 2019; BERNABEU et al., 1997; KANDEL, 2001; FINKBEINER et al., 1997).

Dentre esses sinalizadores, que são expressos durante a fase tardia da potenciação de longa duração (LTP do inglês “long-term potentiation”) o CREB e o

BDNF provocam alterações morfológicas nos neurônios (BERNABEU et al., 1997; KANDEL, 2001; FINKBEINER et al., 1997), o que é importante para a sustentação da memória de longa duração e já foi relatado que o CREB é necessário para manter as alterações associadas com a manutenção do potencial excitatório na LTP, como a expressão da subunidade GluA1 dos receptores AMPA e a formação/maturação das espinhas dendríticas neuronais (MIDDEI et al., 2013).

Desta forma, é possível que esses sinalizadores estimulem às proteínas que estão envolvidas com as alterações morfológicas da LTP, entre elas, a proteína de densidade sináptica 95 (PSD95) que é uma proteína estrutural altamente estável na sinapse e liga-se aos receptores NMDA e os estabiliza em neurônios pós-sinápticos, além de participar da maturação dos botões sinápticos e, assim, sendo necessária para a indução de LTP, pois favorece a sinapse excitatória (BERRY & NEDIVI, 2017; XIE et al., 2019).

Outra proteína dependente da sinalização acima citada é a sinaptofisina, uma proteína de membrana presente em vesículas sinápticas, que pode ser usada como um marcador específico das vesículas sinápticas presente nos terminais sinápticos do neurônio pré-sináptico que desempenha um papel importante para a liberação de neurotransmissores, fundamental para a transdução de sinal da LTP (WANG et al., 2017; WOOD et al., 2019).

Para que o traço de memória seja duradouro, além do processo de consolidação, para que haja a manutenção da memória é necessários os mecanismos de persistência.

A persistência é definida como uma onda tardia de síntese protéica necessária para sustentar e armazenar a memória de longo prazo. Este processo tem início na fase tardia da consolidação e pode se estender por até 24 horas após o aprendizado (KATCHE et al., 2010; BEKINSCHTEIN et al., 2008a). Evidências sugerem que sinalizadores de plasticidade e transcrição gênica como o CREB e o BDNF podem estar envolvidos na manutenção da memória (BEKINSCHTEIN et al., 2008b).

Uma proteína fundamental para o processo de persistência é a proteína quinase M ζ (PKM ζ), uma isoforma atípica, constitutivamente ativa, da proteína quinase C (PKC) expressa no sistema nervoso central (Sacktor et al., 1993; Kelly et al, 2007; Sacktor & Hell, 2017). A qual, participa da manutenção da LTP e das memórias de longa duração (Mei et al, 2011; Sacktor & Hell, 2017). Um possível

mecanismo desta manutenção é a redução da internalização dos receptores AMPA, pela ação da PKM ζ , mantendo-os assim ancorados à membrana (Yu et al., 2017).

Depois de estabilizada, a memória de medo pode ser evocada. Isso ocorre, por exemplo, quando os animais são novamente expostos ao EC e expressam comportamentos de defesa como: fuga, esquiva ou congelamento (LEDOUX, 2000). No caso do condicionamento de medo ao contexto é comum a avaliação do comportamento de congelamento, definido como a total ausência de movimentos do corpo e da cabeça exceto aqueles associados à respiração (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969), como parâmetro de retenção da memória.

Um ponto interessante, é que, se a reexposição ao contexto se der de forma repetida e/ou prolongada, a resposta comportamental reduz gradativamente, processo denominado de extinção (HOFMANN, 2007; STOJEK, MCSWEENEY & RAUCH, 2018). Como já mencionado, acredita-se que este processo seja um possível mecanismo para o que é observado na terapia de exposição prolongada para pacientes com TEPT (MORRISON & RESSLER, 2013). Logo, compreender os mecanismos envolvidos na formação e manutenção da extinção pode indicar novos mecanismos ou intervenções farmacológicas que possam ser utilizados para potencializar os resultados da terapia de exposição prolongada.

1.4 A MEMÓRIA DE EXTINÇÃO

Se o animal for exposto de forma prolongada e/ou repetida ao EC sem a apresentação do EI, a resposta de medo ao EC diminui. Esta redução da resposta de medo é atribuída à formação de uma nova memória que suprime a memória de medo, um processo conhecido como extinção do medo (HERRY et al., 2010). Isso porque, a extinção do medo é um processo que envolve uma nova aprendizagem de um sinal inibitório que compete com a memória do medo anteriormente aprendida (CHATTWAL et al., 2006).

A formação da memória de extinção e do medo apresentam mecanismos diferentes (ISIEGAS et al., 2006; IZQUIERDO, FURINI & MYSKIW, 2016), a começar pelos neurocircuitos envolvidos. A figura 2A e 2B indica as diferentes projeções envolvidas no aprendizado e manutenção de medo e da extinção,

respectivamente, evidenciando a diferente participação do córtex infralímbico (IL) e pré-límbico (PL) em cada um dos processos.

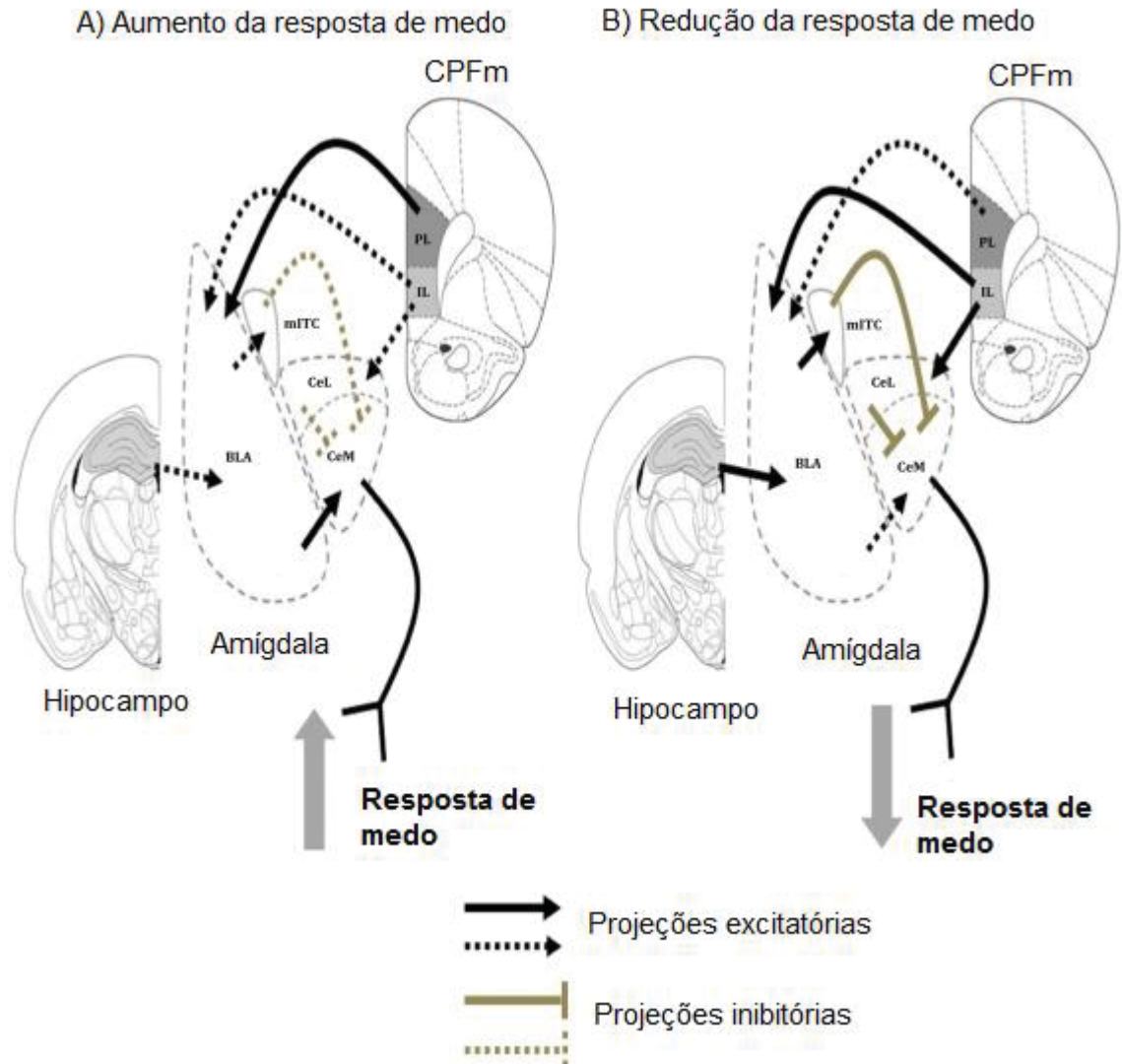


Figura 2. Os neurocircuitos envolvidos com a expressão e supressão das respostas de medo no condicionamento de medo ao contexto. Em A estão indicados os mecanismos que envolvem a expressão da memória de medo, em que os estímulos sensoriais chegam pela amígdala basolateral (BLA) por projeções glutamatérgicas que ativam o núcleo centro-medial da amígdala (CeM), estimulando as respostas de medo, sinalização modulada pelo córtex pré-límbico (PL). Em B estão representados os processos envolvidos com a expressão da extinção, em que é possível verificar que a atividade das células intercalares da amígdala (mITC; interneurônios gabaérgicos), que inibem o CeM, reduzindo a expressão do medo, sinalização modulada pelo córtex infralímbico (IL). FONTE: Adaptado de CAREAGA, GIRARDI & SUCHEKI (2016)

Assim como indicado na figura 2B, o IL apresenta um papel fundamental na regulação da memória de medo. O IL está localizado no CPFm e tem papel fundamental para a formação e recuperação da memória de extinção (DO-MONTE et al., 2015; SOTRES-BAYON et al., 2004; MILAD & QUIRK, 2012; ORSINI &

MAREN, 2012; DUVARCI & PARE, 2014). Curiosamente, lesionar ou inativar o IL durante o treinamento de extinção tem pouco efeito durante a sessão da extinção, contudo, induz a recuperação do medo no dia seguinte (QUIRK et al., 2000; LAURENT & WESTBROOK, 2009; CHANG & MAREN, 2010; FONTANEZ-NUIN et al., 2011; SIERRA-MERCADO, PADILHA-COREANO & QUIRK, 2011; SANTINI, SEPULVEDA-ORENGO & PORTER, 2012), propondo que a atividade do IL induzida pela extinção é fundamental para a formação da memória de extinção (DO-MONTE et al., 2015).

Esses achados da importância do IL para a formação e manutenção da memória de extinção são semelhantes aos resultados encontrados em humanos, pois, ao avaliar a atividade do CPFvm humano, região homóloga ao IL de ratos, foi observado que pacientes com TEPT apresentam hipoatividade da região (PHELPS et al., 2004; HAYES et al., 2012). Esta hipoatividade pode estar relacionada com a resistência à extinção, uma das principais características observadas nos pacientes com TEPT. Afinal, o CPFvm é fundamental para o aprendizado da extinção (PHELPS et al., 2004; ETKIN & WAGER, 2007; HAYES et al., 2012).

Assim como o IL em roedores, em humanos, o CPFvm possui projeções para as células intercalares da amígdala que inibem a amígdala basolateral reduzindo as respostas de medo e ansiedade (KOENIGS & GRAFMAN, 2009; LIKHTIK et al., 2014), portanto, esta desregulação da função CPFvm pode contribuir diretamente para a desregulação da ativação da amígdala e consequentemente com as respostas aumentadas de medo e ansiedade observadas no TEPT (GOOSSENS et al., 2007). Além disso, os pacientes com TEPT também exibem deficiências em outros processos cognitivos mediados pelo CPFvm, como exemplo, prejuízo no aprendizado de novos ambientes, que pode ser atrelado com a generalização da memória aversiva, conhecida como perda da especificidade da memória (OLFF et al., 2014). Adicionalmente, pacientes com TEPT apresentam também um desempenho ruim em testes de flexibilidade cognitiva (KANAGARATNAM & ASBJØRNSSEN, 2007). Desta forma, o prejuízo na atividade do CPF pode contribuir para a disfunção cognitiva observada em pacientes com TEPT. Portanto, é possível que a resistência à extinção seja decorrente desta disfunção cognitiva observada em pacientes, evento que de forma translacional é observado em modelos animais, pois, roedores que são

submetidos a protocolos que formam a memória de extinção também apresentam recuperação das respostas de medo (PAREDES & MORILAK, 2019).

Tendo em vista que a expressão da extinção e do medo ocorre por diferentes circuitos e mecanismos, é possível que as memórias de medo que foram extintas possam se recuperar espontaneamente ao longo do tempo (RESCORLA, 2004). Outro ponto importante, é que a renovação de memórias de medo pode ocorrer em novos contextos (BOUTON, 2004). E ainda, as respostas de medo a um EC podem ser restabelecidas simplesmente pela reexposição apenas ao EI (RESCORLA & HETH, 1975). Essas características fornecem evidências substanciais de que as memórias de medo existentes, por si só, não são apagadas pela extinção do medo, porque a memória extinta pode retornar. Além disso, é possível que o aprendizado do medo original seja novamente fortalecido envolvendo novamente a associação entre o EC e do EI (RESCORLA, 2001; BOUTON et al., 2006). Portanto, a extinção do medo recruta circuitos inibitórios para suprimir a expressão das memórias de medo existentes.

A manutenção em longo prazo destas memórias depende da síntese *de novo* de proteínas e mudanças de plasticidade em áreas do cérebro que levam à sua persistência (LUCHKINA & BOLSHAKOV, 2019). Os mecanismos que envolvem a consolidação da memória já são amplamente explorados (DO-MONTE et al., 2015), contudo, os mecanismos que sustentam a memória de extinção ao longo do tempo são muito pouco estudados, principalmente referentes à sua persistência. Nesse contexto, alguns autores mostraram que mecanismos que controlam memórias de longo prazo são similares na extinção (MUELLER, PORTER & QUIRK, 2008; DO-MONTE et al., 2015) e outros estudos sugerem que a extinção do medo depende de mecanismos diferentes (LUCHKINA & BOLSHAKOV, 2019).

Para a formação da extinção, as projeções neuronais do infralímbico ativam as células intercalares da amígdala (interneurônios gabaérgicos) que inibem a amígdala central reduzindo assim as respostas de medo (LUCHKINA & BOLSHAKOV, 2019). Para esta sinalização há a participação de sinalizadores excitatórios (como a PSD95, sinaptofisina e receptores AMPA) e sinalizadores inibitórios (como o ácido gama-aminobutírico; GABA), sendo assim, fundamentais para a formação desta memória (POPOVA et al., 2014). Esta sinalização induz processos de plasticidade que formam e mantêm o aprendizado de extinção

(FLAVELL et al., 2019; LISBOA et al., 2019). Contudo, os mecanismos que sustentam a memória de extinção com o passar do tempo ainda são pouco explorados.

Neste contexto, compreender os mecanismos envolvidos com a persistência da extinção é fundamental, afinal, já é conhecido que com o passar dos dias a memória de medo se sobressai sobre a de extinção. Isso se dá, muito provavelmente, pela natureza adaptativa da memória de medo, como sugerido pelos estudos de Haubrich e colaboradores (2017) que mostraram que a reexposição ao contexto a partir de 21 dias faz com que os animais apresentem um percentual de congelamento semelhante aos primeiros minutos da extinção, evento conhecido como recuperação espontânea.

Desta forma, buscar mecanismos que fortaleçam o aprendizado da extinção é uma das formas de reduzir a recuperação espontânea. Uma possível via para realizar intervenções farmacológicas capazes de fortalecer o aprendizado ou persistência da extinção é a via do AMPc/PKA/CREB/BDNF. Pois, interferências nesta via podem melhorar a cognição e aumentar a expressão de neurotrofinas (SHARMA et al., 2013). Estudos têm mostrado que o BDNF é fundamental para a expressão da extinção (GREEN, CORSI-TRAVALI & NEUMEISTER, 2013; SUN, LI & AN, 2018; SOLER-CEDEÑO et al., 2019; RADISKE et al., 2015). Um destes estudos mostrou que a administração de BDNF é capaz de mimetizar a expressão da extinção quando infundido, in vivo, diretamente no córtex IL (PETERS et al., 2010), assim como, um estudo in vitro, no qual a estimulação elétrica mimetiza a extinção, mostrou que a administração de BDNF foi capaz de manter as alterações de plasticidade induzidas nesse modelo (SOLER-CEDEÑO et al., 2019).

Neste cenário, as fosfodiesterases (FDEs), enzimas que degradam os segundos mensageiros AMPc e/ou o GMPc, apresentam-se como uma opção promissora para melhorar a memória de extinção, principalmente porque, sua inibição, já tem apresentado efeitos positivos na potencialização do aprendizado, tendo em vista que a partir do momento que estão inibidas mantém a o AMPc e/ou GMPc ativos por mais tempo.

1.5 AS FOSFODIESTERASES

As FDEs são uma classe de enzimas fundamentais dentro da cascata de transdução de sinal intracelular que segue a ativação de receptores acoplados à proteína G (KNOTT et al., 2017), pois, degradam o AMPc e/ou o GMPc através da hidrólise da ligação 3' fosfato (SHARMA et al., 2013, KNOTT et al., 2017). Desse modo, as FDEs regulam os níveis intracelulares desses segundos mensageiros que estão presentes em inúmeros tecidos. Além disso, estes nucleotídeos cíclicos desempenham um papel importante na regulação de uma série de funções celulares envolvidas na transdução de sinal e transmissão sináptica (GREENGARD, 2001, NEVE et al., 2004).

Em mamíferos, as FDEs são codificadas por 21 genes, produzindo 11 famílias distintas de FDE e *splicing* alternativo (FDE1 a FDE11). Com base na especificidade do substrato, há famílias de FDE classificadas como específica de cAMP (FDEs 4, 7, 8), FDEs específicas de cGMP (FDEs 5, 6, 9) e de especificidade dupla (FDEs 1, 2, 3, 10, 11; BENDER & BEAVO, 2006). A utilização de inibidores de FDE já indicou diversos efeitos inclusive nos processos de cognição e de plasticidade (RENEERKENS, 2009; KNOTT et al., 2017). Um dos possíveis mecanismos envolvidos com esta melhora seria o aumento da sinalização da via AMPc/PKA/CREB/BDNF, pois, a FDE participa da modulação desta via de sinalização, conforme mostrado na figura 3.

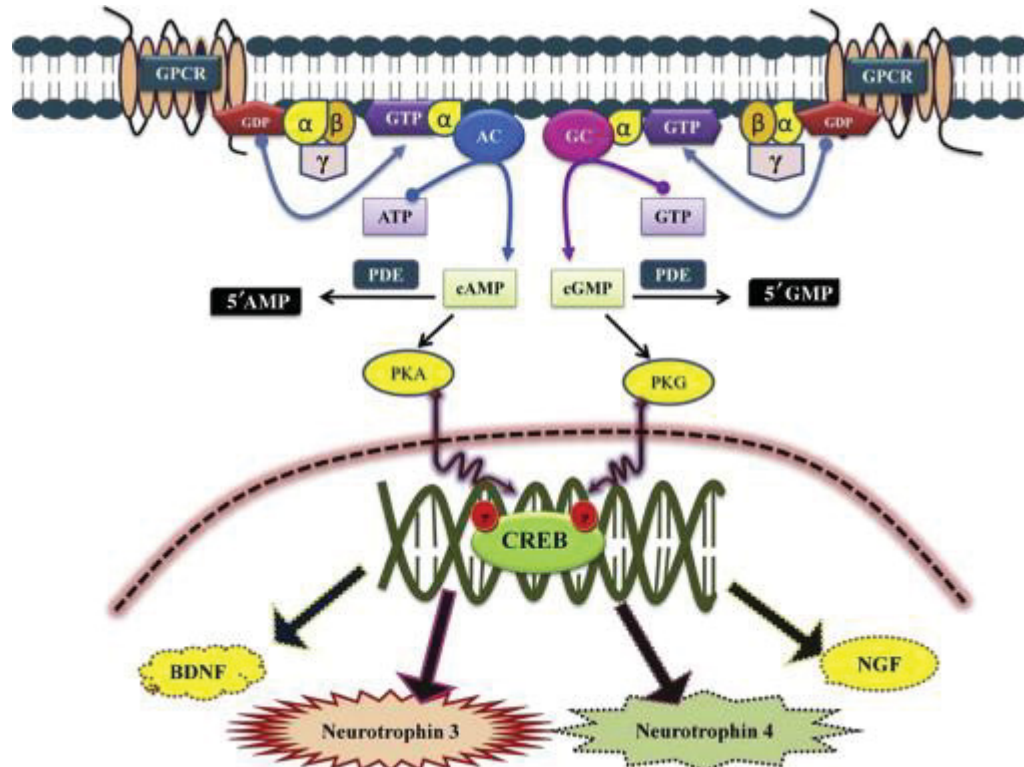


Figura 3. Participação da FDE na sinalização celular. O esquema apresenta dois receptores acoplados à proteína G, em que o da esquerda induz a formação de AMPc enquanto o da direita induz GMPc. Em ambos, a fosfodiesterase interrompe a sinalização de sinal hidrolisando AMPc ou o GMPc. Ao hidrolisar estes segundo mensageiros, a FDE reduz a sinalização de PKA e PKG e consequentemente a fosforilação do CREB, reduzindo, portanto a expressão de BDNF e outras neurotrofinas. FONTE: SHARMA et al., 2013.

Dentre estes inibidores, a inibição da FDE-4 é uma das mais promissoras para potencializar a memória de extinção, pois, a FDE-4 é um dos subtipos de FDE que degrada especificamente o AMPc (RUTTEN et al., 2007; RENEERKENS, 2009; KNOTT et al., 2017) e é amplamente expressa no sistema nervoso central, inclusive em regiões que são fundamentais para a formação da memória de extinção: o hipocampo, a amígdala e o CPFm (PÈRES-TORRES et al., 2000; LAKICS, KARRAN & BOESS, 2010; SINGEWALD et al., 2015), mostrados na figura 2B.

Desta forma, a inibição da FDE-4 aumenta a atividade biológica do AMPc, e consequentemente mantém a sua interação com a PKA, a qual induz a fosforilação da CREB e aumenta a transcrição de diversas proteínas associadas com os mecanismos de plasticidade, incluindo o BDNF (figura 3). Portanto, a inibição da FDE-4 apresenta funções fundamentais na fase tardia da consolidação da memória (RUTTEN et al., 2007) e nos processos de potenciação de longa duração (do inglês LTP; BARAD et al., 1998; MCGIRR et al., 2016). Curiosamente,

a participação do CREB nos processos de consolidação da extinção ainda é controversa, pois, há autores que mostraram que o aumento da fosforilação e conseqüentemente da atividade de CREB pode favorecer o processo de aquisição da extinção (CHAI et al., 2014; MAMIYA et al., 2009), ao mesmo tempo em que autores propõem que este aumento prejudicaria o aprendizado da extinção (MONTI, BERTEOLLI & CONTESTABILE, 2006; MULLER, HOFMANN & CHERRY, 2010).

Em suma, estas evidências apontam que os inibidores de FDE-4 são uma possível ferramenta para avaliar se a potencialização da sinalização dependentes de AMPc/PKA/CREB pode potencializar ou prejudicar a memória de extinção. Um dos fármacos pertencente à classe dos inibidores de FDE-4 é o Roflumilaste (ROF).

1.6 O ROFLUMILASTE

O ROF (Daxas®) é um medicamento que foi aprovado para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica grave (DPOC; GIEMBYCZ & FIELD, 2010). Seu mecanismo de ação ocorre através da inibição seletiva da FDE-4 (GIEMBYCZ & FIELD, 2010; WEDZICHA, CALVERLEY & RABE, 2016). Esta inibição ocorre de forma não seletiva para todos os subtipos de FDE-4 (A, B, C e D), contudo, estudos *in vitro* indicaram que o ROF apresenta maior afinidade com a FDE-4B, pois, foi capaz de inibir este subtipo com concentrações muito menores quando comparado com os outros subtipos (BOSWELL-SMITH, CAZZOLA & PAGE, 2006; HATZELMANN et al., 2010; KAWAMATAWONG, 2017).

Adicionalmente, o ROF tem apresenta maior aceitabilidade clínica, pois estudos em humanos demonstraram menor incidência de efeitos eméticos do que comparados com o seu antecessor, o Rolipram (também inibidor de FDE-4) sendo este um dos motivos pelo qual foi aprovado para o uso em humanos (HALPIN, 2008; PAGE & SPINA, 2012 KAWAMATAWONG, 2017).

Outro ponto importante é que o ROF é capaz penetrar a barreira hematoencefálica (VANMIERLO et al., 2016, TAKANO et al., 2018). Essa propriedade farmacocinética é de relevância, tendo em vista que, estudos pré-clínicos e clínicos já apontaram que o tratamento com ROF foi capaz de melhorar a memória (RUTTEN et al., 2007; VANMIERLO et al., 2016) e a recordação

imediate da memória verbal em idosos saudáveis, reforçando os possíveis efeitos na cognição e nos processos de aprendizagem de memória declarativa (VAN DUINEN et al., 2018; BLOKLAND et al., 2019). Em estudos pré-clínicos, animais que foram tratados por 5 dias com ROF, ou 3 horas após o teste de aprendizagem, apresentaram desempenho de memória aprimorada nos testes de reconhecimento e de localização de objetos, respectivamente (JABARIS et al., 2015a; VANMIERLO et al., 2016). Além disso, JABARIS et al. (2015b) sugeriram também que o ROF pode reverter o comprometimento cognitivo em ratos hipertensos, estimulando a via AMPc/PKA/CREB, já que o CREB fosforilado foi aumentado no hipocampo de animais tratados com ROF. Estas características fazem deste inibidor de FDE-4 um excelente fármaco para induzir efeitos que melhoram a cognição (BLOKLAND et al., 2019).

1.7 JUSTIFICATIVA

Como os mecanismos envolvidos com a formação da memória de extinção ainda não são totalmente esclarecidos é importante avaliar os diferentes mecanismos envolvidos nesse processo. Principalmente porque os dados da literatura ainda são controversos com relação ao envolvimento de CREB na formação da memória de extinção.

Além disso, os mecanismos que estão associados com a persistência da memória de medo vêm sendo amplamente explorados. Por outro lado, pouco se sabe sobre os mecanismos de persistência da extinção, assim, é fundamental explorar esses mecanismos.

Para tal, o ROF, inibidor de FDE do tipo 4, é um possível agente farmacológico para melhorar o processo de extinção, já que estudos têm demonstrado que é capaz de potencializar a cognição, tanto em humanos quanto em animais, muito provavelmente pelo via do AMPc/PKA/CREB/BDNF. Contudo, isso permanece por ser investigado.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

A formação da memória de extinção é dependente de um mecanismo complexo de sinalização intracelular e do processo de plasticidade sináptica. Contudo, pouco se sabe ainda sobre os processos envolvidos nessa modulação. Curiosamente, o CREB, um dos sinalizadores chave no processo de plasticidade, apresenta um papel controverso na extinção da memória, pois há autores que observaram que o aumento de sua expressão melhora a extinção, enquanto, outros sugerem que prejudica a extinção. Nossa hipótese baseia-se no fato que os autores mantêm-se restritos a fase de aquisição e às fases iniciais da consolidação. Contudo, o processo de consolidação e persistência apresenta um período prolongado de síntese proteica, nos quais, as fases mais tardias são pouco exploradas. Desta forma, é possível que a participação da sinalização do CREB seja diferente com o passar do tempo e da fase de manutenção da memória. Desta forma, a nossa hipótese é que a inibição da FDE-4 em diferentes etapas do aprendizado da extinção pode potencializar a persistência da memória de extinção.

2.2 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do inibidor de fosfodiesterase 4, ROF na aquisição e nas fases inicial e tardia da consolidação da extinção. Explorando as possíveis vias de sinalização associadas ao efeito do fármaco.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do ROF na ansiedade em ratos expostos ao teste do labirinto em cruz elevado;
- Avaliar o efeito do ROF na ansiedade em ratos expostos ao teste de transição claro-escuro;
- Avaliar o efeito do ROF aquisição da memória de extinção;
- Avaliar o efeito do ROF na fase inicial da consolidação da memória de extinção;

- Avaliar o efeito do ROF na fase tardia da consolidação da memória de extinção;
- Avaliar o efeito do ROF na fase final da janela de consolidação;
- Avaliar o efeito do ROF administrado no córtex IL na fase inicial da consolidação da extinção;
- Avaliar o efeito do ROF administrado no córtex IL na fase tardia da consolidação da extinção;
- Avaliar se o efeito do ROF no córtex IL é dependente da atividade da PKA na fase tardia da consolidação da extinção;
- Avaliar se o efeito do ROF na fase tardia da consolidação da extinção modifica a expressão de BDNF, Sinaptofisina e PSD95 no córtex IL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado com ratos da linhagem Wistar, machos, com 13 a 15 semanas de vida, pesando entre 270 e 320 g, obtidos no biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e alojados em grupos de cinco em gaiolas de plástico (60 × 25 × 25 cm). Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério com temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e iluminação controlada (ciclo claro/escuro de 12 h), com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética local para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil (autorização nº 1161), em conformidade com o Guia do National Institutes of Health para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. (Publicação NIH nº 80-23, 1996) e a legislação brasileira seguindo as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os experimentos foram elaborados visando minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

3.2 DROGAS

As drogas utilizadas foram o Roflumilaste (ROF), inibidor seletivo da fosfodiesterase do tipo 4 nas doses de 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg quando administrado por via intraperitoneal (i.p.) ou 9 ng/0,2 μ L quando administrado localmente no córtex IL. O ROF foi dissolvido em NaCl a 0,9% contendo 10,0% de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween® 80, Sigma-Aldrich, EUA), solução também usada como controle. A seleção das doses utilizadas foi baseada em estudos publicados anteriormente (RENEERKENS et al, 2009; VANMIERLO, 2016). H89 (diclorohidratado - H89; Sigma-Aldrich, EUA), inibidor de PKA, usado na concentração de 10 μ M/0,2 μ L e infundido localmente no córtex IL, foi solubilizado em NaCl a 0,9% contendo 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO). A seleção da concentração utilizada para infusão foi baseada em estudos publicados anteriormente (DAVIES et al., 2000; WU et al., 2015).

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA, INFUSÃO DE DROGAS NO CÓRTEX IL E HISTOLOGIA

Para a cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados com 1,0 ml/kg de solução contendo xilazina (10 mg/ml; Carlier, Brasil) e quetamina (100 mg/ml; Sespo, Brasil) associada à anestesia local (lidocaína 3,0% com norepinefrina 1: 50000; Dentsply, Brasil) e posicionado em um aparelho estereotáxico (Kopf, USA). Duas cânulas-guia de aço inoxidável (comprimento = 11,0 mm, diâmetro externo = 0,8 mm) foram implantadas bilateralmente visando o córtex IL (AP = +3,0 mm de Bregma, ML = \pm 0,5 mm de sutura central, DV = -1,8 mm de o crânio (PAXINOS E WATSON, 2009) e fixados ao crânio com resina acrílica e dois parafusos de aço inoxidável. Para evitar a oclusão das cânulas, um fio ortodôntico (0,35 mm de espessura) foi introduzido dentro de cada cânula guia.

Após dez dias de recuperação, os animais foram submetidos ao protocolo comportamental. Os animais receberam uma infusão bilateral de drogas 5 min e 3 horas após a sessão de extinção com agulhas gengivais com 14,2 mm de comprimento introduzido através das cânulas guia até que suas pontas estivessem 3,2 mm abaixo da extremidade da cânula. Durante 1 min, 0,2 μ L/lado de veículo ou droga foram injetados usando uma seringa de 5,0 μ L conectadas a

uma bomba de infusão (Insight, Brasil). Um cateter de polietileno foi interposto entre a extremidade superior das agulhas e das seringas. O deslocamento de uma bolha de ar dentro do polietileno foi usado para monitorar o fluxo de drogas. As agulhas foram removidas 30 s após o término das injeções.

Após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados como já descrito. Para averiguar se o sítio de injeção estava corretamente posicionado no córtex IL, utilizou-se azul de metileno (0,2 µl/lado) injetado através das cânulas-guia com uma agulha de mesma espessura e comprimento que a utilizada no dia da infusão. O cérebro foi removido e imerso em solução de formalina a 10%. Cortes cerebrais (50 µm de espessura) foram obtidos em um vibrátomo e o local da injeção foi conferido (Figura 4). Os animais foram incluídos na análise quando ambos os lados do córtex IL foram marcados com pelo azul de metileno.

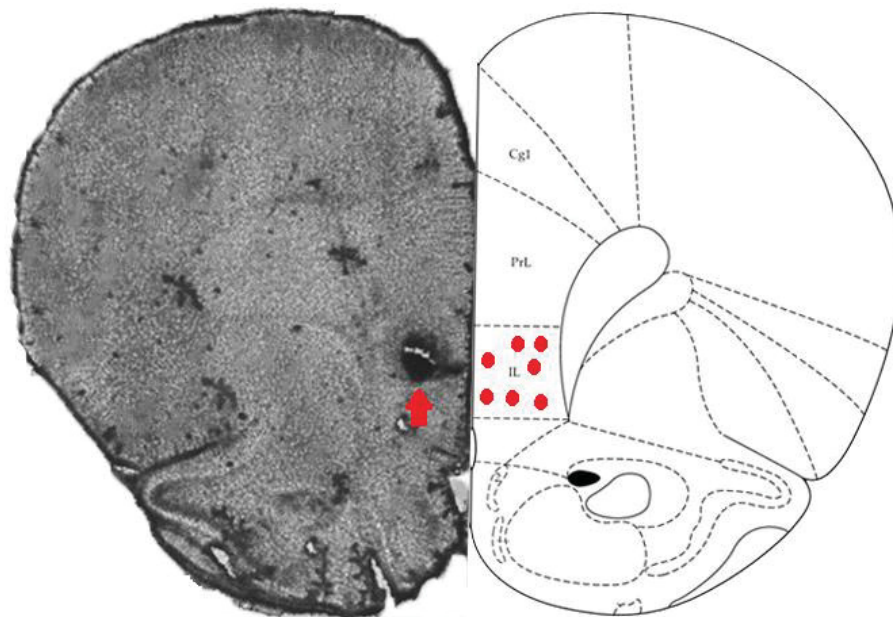


Figura 4. Representação do sítio de injeção no córtex IL. Os círculos vermelhos representam a infusão no córtex. A seta vermelha indica a região corada com azul de metileno na análise histológica. Apenas os animais que tiveram acerto bilateral no córtex IL foram incluídos na análise estatística.

3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

Para minimizar a possível influência do ciclo circadiano no aprendizado e no processamento da memória, os testes comportamentais foram sempre realizados entre 13 e 17 horas.

O condicionamento de medo ao contexto foi realizado sob a iluminação de 70 lux em uma câmara retangular (35 × 20 × 30 cm) com paredes laterais de

alumínio e uma parede frontal e porta do teto feita de acrílico transparente, com piso gradeado, feito de barras de aço inoxidável, conectado a uma placa de circuito e a um gerador de choque (Insight, Brasil) permitindo aplicar choques elétricos controlados nas patas do animal, conforme detalhado posteriormente. Em todos os experimentos, conforme estudos anteriores (da SILVA et al., 2016; STERN et al., 2017), os animais foram inicialmente colocados no contexto com o objetivo de permitir a livre exploração do aparato por 3 min, processo denominado de sessão de familiarização, depois, retornaram à caixa moradia.

No dia seguinte, os animais foram novamente submetidos ao contexto, agora na sessão de condicionamento do medo, na qual, os ratos receberam, após 30 segundos, o EI (três choques elétricos nas patas por 3 segundos, com 30 segundos de intervalo entre os choques). Após a última apresentação do EI, os animais permaneceram na caixa de condicionamento por mais 30 s antes de retornarem à sua gaiola. A intensidade do EI foi de 0,7 mA para os experimentos em que a administração de drogas foi sistêmica. Esta intensidade foi baseada em estudos anteriores que demonstraram não induzir resposta generalizada de medo (BALDI et al., 2004; da SILVA et al., 2016). Para os animais que passaram pela cirurgia estereotáxica para infusão diretamente no encéfalo a intensidade foi ajustada para 0,8 mA a fim de atingir níveis semelhantes de tempo de congelamento em animais tratados com veículo (STERN et al., 2015; 2017).

No dia seguinte ao condicionamento ao medo, os animais foram expostos à sessão de extinção, que consistiu em uma exposição de 20 minutos ao contexto condicionado, sem a apresentação do EI. Com objetivo de avaliar a retenção da memória de extinção dos animais, os animais foram novamente expostos ao contexto no dia seguinte para o teste de extinção 1 (TE1) e 10 dias depois ao teste de extinção 2 (TE2), ambos com duração total de 3 min.

Durante a sessão de extinção, TE1 e TE2, o comportamento de congelamento foi registrado como índice de retenção memória. O congelamento foi definido como a ausência total de movimentos do corpo e da cabeça, exceto aqueles associados à respiração (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969). O tempo de congelamento foi quantificado em segundos por um observador treinado (confiabilidade inter e intra-observador $\geq 90\%$) cego aos grupos experimentais e expressos como a porcentagem do tempo total da sessão.

3.5 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste de um aparato de madeira com dois braços abertos (50 x 10 cm) contendo uma borda de madeira com 1 cm de altura e 2 braços fechados (50 x 10 x 40 cm) conectados por uma área central (10 x 10 cm). O aparelho foi mantido em uma sala com iluminação controlada (40 lux). O teste foi realizado conforme descrito em trabalhos anteriores (STERN et al., 2010; 2015). Os animais foram colocados na área central do aparato voltada para um braço fechado. A sessão durou 5 minutos e foi gravada para análise posterior em que foram avaliadas as seguintes medidas comportamentais: O número de entradas com as quatro patas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF) e o tempo gasto nos braços abertos e fechados. Os dados brutos foram usados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos $\{\%EBA; [(entradas\ de\ braços\ abertos / (entradas\ nos\ braços\ abertos + entrada\ nos\ braços\ fechados)) \times 100]\}$ e percentual de tempo explorando os braços abertos $\{\%TBA; [(tempo\ em\ braços\ abertos / 300) \times 100]\}$.

3.6 TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO (TCE)

O teste de transição claro-escuro foi realizado em uma caixa de madeira (56,5 x 26,5 x 28,5 cm). A caixa é dividida em dois compartimentos de tamanho igual, um lado preto (compartimento escuro) e um lado branco (compartimento iluminado) que são cobertos por tampas de acrílico preto ou transparente, respectivamente. As duas câmaras estão interligadas por uma porta divisória (7,0 x 6,0 cm) que permite a transição entre os dois compartimentos. A caixa foi mantida durante o teste a iluminação de 400 lux. Os ratos foram colocados individualmente no compartimento iluminado com a cabeça virada para a porta de separação. Após a primeira transição para o compartimento escuro, o comportamento do animal foi registrado por 5 minutos. A porcentagem tempo no compartimento claro (%TCC) foi usada como um índice de comportamento semelhante à ansiedade (HASCOET, 2009) e o número de cruzamentos totais (NC) foi usado para avaliar a atividade locomotora do animal.

3.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE BDNF, PSD95 E SINAPTOFISINA POR WESTERN BLOT

Para as análises por western blot os animais foram decapitados após os procedimentos experimentais descritos detalhadamente no experimento 8. O córtex IL foi cuidadosamente removido e dissecado, com o auxílio de uma matriz, espátulas e pinças. e mantidos congelados em gelo seco e no freezer -80 °C até cada tecido ser transferido para um tubo contendo tampão de homogeneização (glicerol 10%, NaCl 137 mM, Tris HCl 20 mM, pH 7,5) com inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e foram homogeneizados.

Em seguida, o material foi centrifugado a 2.800 rpm em uma centrífuga refrigerada (4° C) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf e centrifugado novamente a 12.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado. As amostras foram diluídas para atingir concentrações de proteínas igual 30 µg e separadas por eletroforese em 10%, 12% e 15% de SDS-poliacrilamida gel.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas por uma hora e meia em tampão Tris (25 mM Tris, Glicina 192 mM, 200 ml de metanol, pH 8). Para a realização da técnica de *immunoblotting*, foi realizado bloqueio com leite em pó 5% em salina tamponada tris com tween 20 (TBS-T) em temperatura ambiente (quantidade suficiente para cobrir a membrana) durante 1 h, seguido de três lavagens em TBS-T de 10 min cada. Em seguida, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais primários, anti-BDNF (1:300, Santa Cruz Biotechnology), anti-Sinaptofisina (1:2000, Millipore), anti-PSD95 (1:1500, QED Bioscience Inc.) e anti-GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) *overnight* (~16 h). A seguir, foram lavadas por três vezes de 10 minutos cada em TBS-T. Então, foi realizada a incubação com anticorpo secundário policlonal (1:2000 em TBS-T; cabra anti-coelho ou coelho anti-camundongo por 2 horas, seguida de 3 lavagens em TBS-T de 10 minutos cada. Por fim, foi realizada a revelação com *kit* de quimioluminescência ECLplus® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 10 minutos. As bandas foram visualizadas com auxílio do Chemi-doc (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA), e quantificadas por densidade óptica integrada usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.8.1 Experimento 1: Avaliação do efeito do ROF no comportamento exploratório e nos comportamentos do tipo ansioso.

Como evidências mostram que os inibidores da FDE-4 podem interferir na ansiedade em roedores (LI et al., 2009; JINDAL et al., 2013; HANSEN et al., 2014; MCGIRR et al., 2015), primeiramente avaliamos se o ROF, nas doses selecionadas, causaria algum efeito nos comportamentos exploratórios ou nos comportamentos relacionados à ansiedade. . Desta forma, o ROF (0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg) ou seu veículo (VEI) foram administrados sistemicamente (i.p.) 20 minutos antes do teste LCE (n = 10 animais/grupo) ou do teste TCE (n = 10 animais/grupo).

3.8.2 Experimento 2: Avaliação do efeito do ROF na aquisição da memória de extinção

Para investigar o efeito da inibição da FDE-4 durante a aquisição da extinção, o ROF [0,01 mg/kg (n = 14), 0,03 mg/kg (n = 12) ou 0,1 mg/kg (n = 9)] ou seu veículo [VEI (n = 13)] foram administrados sistemicamente 20 minutos antes da sessão de extinção. Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

3.8.3 Experimento 3: Avaliação do efeito do ROF durante a fase inicial de consolidação da extinção

Para investigar o efeito da inibição da FDE-4 durante a fase inicial de consolidação, ROF [0,01 mg/kg (n = 10), 0,03 mg/kg (n = 12) ou 0,1 mg/kg (n = 10)] ou seu veículo [VEI (n = 12)] foram administrados sistemicamente (i.p.) 5 minutos após a sessão de extinção. Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

3.8.4 Experimento 4: Avaliação do efeito do ROF durante a fase tardia da consolidação da extinção

Para investigar o efeito da inibição de FDE-4 durante a fase tardia da consolidação, o ROF [0,01 mg/kg (n = 10), 0,03 mg/kg (n = 10) ou 0,1 mg/kg (n = 10)] ou seu veículo [VEI (n = 10)] foram administrados sistemicamente 3 horas após a sessão de extinção. Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

3.8.5 Experimento 5: Avaliação do efeito do ROF 6 horas após a extinção

Para investigar o efeito da inibição da FDE-4 no final da janela de consolidação, ROF [0,01 (n = 9), 0,03 (n = 9) ou 0,1 mg/kg (n = 8)] ou seu veículo [VEI (n = 8)] foram administrados sistemicamente 6 horas após a sessão de extinção. Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

3.8.6 Experimento 6: Avaliação do efeito do ROF administrado no córtex IL durante a fase inicial da consolidação da extinção.

Para investigar o efeito da inibição da FDE-4 no IL, o ROF [9 ng/0,2 uL/hemisfério (n = 7)] ou seu veículo [VEI (n = 7)] foram infundidos no córtex IL 5 min após a extinção. Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

3.8.7 Experimento 7: Avaliação do efeito do ROF administrado no córtex IL durante a fase tardia da consolidação.

Para investigar o efeito da inibição da FDE-4 no IL, o ROF [9 ng/0,2 uL/hemisfério (n = 7)] ou seu veículo [VEI (n = 8)] foram infundidos no córtex IL três horas após a extinção. Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

3.8.8 Experimento 8: Avaliação do efeito da inibição da PKA no córtex IL no efeito do ROF administrado sistemicamente durante a fase tardia da consolidação.

Para investigar o efeito da inibição da PKA no IL enquanto o inibidor de FDE-4 era administrado sistemicamente, o ROF (0,03 mg/kg; i.p.) ou o seu veículo (VEI) foram administrados 3 horas após a sessão de extinção, 5 min após o tratamento, o inibidor de PKA [H89 (10 μ M/0,2 uL/hemisfério)] ou o seu veículo (VEI) foram diretamente infundidos no córtex IL (n dos grupos experimentais: VEI-VEI = 6; VEI-ROF = 8; H89-VEI = 9; H89-ROF = 7). Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

3.8.9 Experimento 9: Avaliação da expressão de BDNF, Sinaptofisina e PSD95 no córtex IL quando o ROF foi administrado sistemicamente durante a fase tardia da consolidação.

Para investigar a expressão de BDNF, Sinaptofisina e PSD95 no IL quando a inibição da FDE-4 foi realizada durante a fase tardia da consolidação, o ROF [0,03 mg/kg (n = 6)] ou seu veículo [VEI (n = 6)] foram administrados sistemicamente 3 horas após a sessão de extinção. Após 24 horas e 11 dias depois, os animais foram submetidos ao TE1 e TE2, respectivamente.

Após o TE2 os animais foram eutanasiados e o encéfalo removido para dissecação do córtex IL. O grupo naive (n = 6) não foi submetido aos testes comportamentais, apenas eutanasiados e o cérebro foi removido para dissecação do IL, as amostras foram mantidas em gelo seco ou no freezer - 80° C até que o processamento para western blot (já descrito anteriormente) fosse realizado.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após avaliar a normalidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, os dados foram compilados pelo percentual de tempo que os animais apresentaram o comportamento de congelamento durante a sessão de extinção, TE1 e TE2.

Para a análise dos dados durante a sessão de extinção foi aplicada a ANOVA de medidas repetidas entre os 5 blocos de 4 min e outra ANOVA de

medidas repetidas foi aplicada ao TE1 e TE2. Para os experimentos em que foi utilizado o inibidor da PKA foi aplicada a ANOVA de duas vias. Os experimentos que avaliaram o comportamento associado com a ansiedade dos animais (LCE e TCE) foram analisados por ANOVA de uma via. Para todas essas análises, o teste de Newman-Keuls foi escolhido como o post hoc para múltiplas comparações.

Para a análise das análises pela técnica de Western Blot, foi utilizado a ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey.

O nível de significância estatística foi estabelecido em $P \leq 0,05$. Utilizou-se Statistica 12 (StatSoft, EUA) para análise estatística e GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism, EUA) para representação gráfica.

4 RESULTADOS

4.1 NAS DOSES SELECIONADAS O ROF NÃO PRODUZIU NENHUM EFEITO NO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO E NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DOS ANIMAIS.

A ANOVA de uma via indicou que não há efeito do fator tratamento entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados no LCE, tanto nos parâmetros relacionados à ansiedade {% TBA [F (3, 36) = 1,1743; $P > 0,05$] e % EBA [F (3, 36) = 1,72; $P > 0,05$]}, quanto no parâmetro locomotor EBF [F (3, 36) = 0,49; $P > 0,05$]. Os resultados obtidos durante o experimento estão indicados na tabela 1.

No TCE, a ANOVA de uma via indicou que não houve efeito no fator tratamento do para o parâmetro de % TCC [F (3, 36) = 1,61; $P > 0,05$] assim como no parâmetro locomotor NC [F (3, 36) = 0,33; $P > 0,05$], resultados demonstrados na tabela 2.

Tabela 1. Efeito do tratamento com ROF no LCE. A ANOVA de uma via apontou que não há diferença estatística entre os grupos nos parâmetros avaliados. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=10 animais por grupo).

	Veículo	ROF 0,01 mg/kg	ROF 0,03 mg/kg	ROF 0,1 mg/kg
%TBA	35,93 \pm 3,67	28,06 \pm 4,03	34,20 \pm 4,65	26,76 \pm 4,20
%EBA	47,52 \pm 3,88	37,01 \pm 2,90	46,58 \pm 2,64	39,84 \pm 5,54
EBF	10,50 \pm 0,98	10,50 \pm 1,36	9,00 \pm 0,70	9,70 \pm 1,00

Tabela 2. Efeito do Tratamento com ROF no TCE. A ANOVA de uma via apontou que não há diferença estatística entre os grupos nos parâmetros avaliados. Os resultados estão expressos pela média \pm EPM (n=10 animais por grupo).

	Veículo	ROF 0,01 mg/kg	ROF 0,03 mg/kg	ROF 0,1 mg/kg
%TCC	32,60 \pm 3,35	28,19 \pm 3,32	39,59 \pm 4,09	34,33 \pm 4,01
NT	11,30 \pm 0,82	12,10 \pm 0,72	12,50 \pm 0,93	11,60 \pm 1,18

4.2 DURANTE A AQUISIÇÃO, O ROF FACILITOU A EXTINÇÃO E PREJUDICOU A EVOCAÇÃO DA EXTINÇÃO, CONTUDO, NENHUM DOS EFEITOS É PERSISTENTE.

Durante a sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas indicou uma interação entre fatores tratamento e os 5 blocos de 4 minutos para o percentual do tempo de congelamento [$F(12,176) = 2,91$; $P < 0,05$]. Conforme mostrado na Figura 5A, o teste post hoc indicou que a dose intermediária de ROF (0,03 mg/kg) reduziu o comportamento de congelamento quando comparado ao grupo controle durante o primeiro bloco de 4 min. Além disso, todos os grupos reduziram o comportamento de congelamento do terceiro até o quinto bloco de 4 min quando comparado com o respectivo primeiro bloco.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre o tratamento e a exposição ao contexto [$F(3,44) = 2,77$; $P < 0,05$] para tempo de

congelamento durante TE1 e TE2. Como observado na Figura 5B, o teste post hoc mostrou que o grupo que foi tratado com a maior dose de ROF (0,1 mg/kg) apresentou um aumento no tempo de congelamento durante o TE1. Nenhum efeito foi observado no TE2.

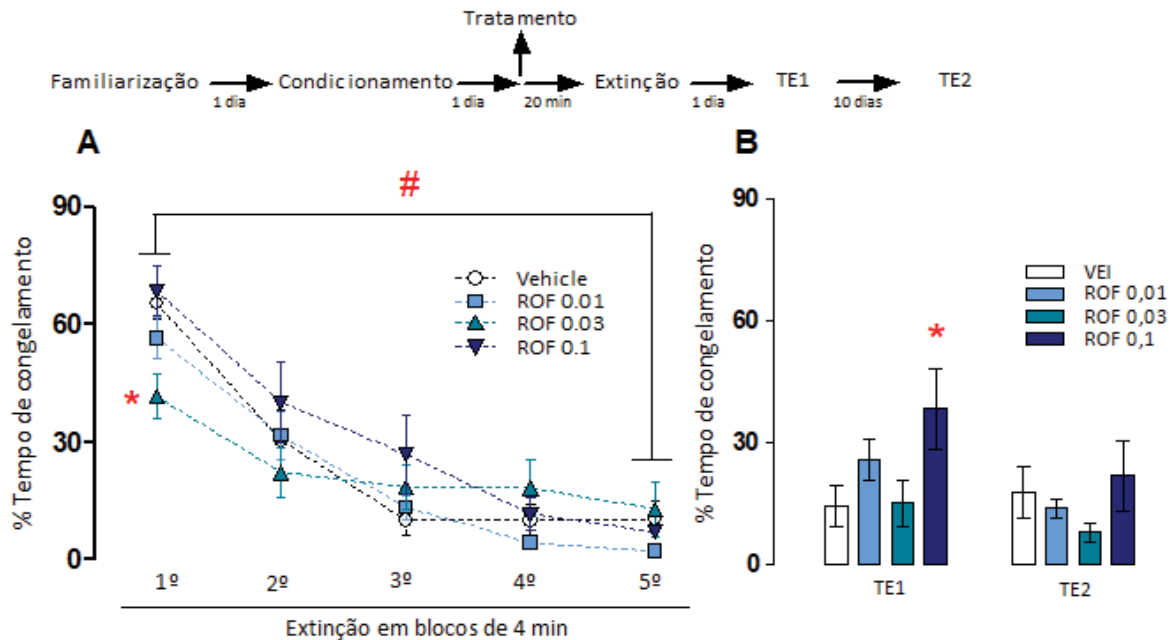


Figura 5. O efeito do ROF administrado 20 min antes da sessão de aquisição da extinção. O gráfico A indica a sessão de extinção. O ROF na dose intermediária (0,03 mg/kg) reduz o comportamento de congelamento quando comparado com o grupo VEI do primeiro bloco. Todos os grupos apresentam redução da porcentagem de congelamento a partir do 3º bloco. O gráfico B indica o TE1 e TE2. Durante do TE1 os animais tratados com a maior dose (0,1 mg/kg) apresentaram aumento da porcentagem do tempo de congelamento quando comparado com o VEI, durante o TE2 nenhum efeito do tratamento é observado. O * ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado ao grupo VEI. O # ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado com o respectivo grupo no 1º bloco durante a sessão de extinção. Os dados estão expressos pela média \pm EPM. ROF [0,01 mg/kg ($n=14$); 0,03 mg/kg ($n=12$); 0,1 mg/kg ($n=9$)]; VEI ($n=13$).

4.3 O ROF ADMINISTRADO NA FASE INICIAL DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO NÃO ALTEROU A EXPRESSÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da extinção para o tempo de congelamento [$F(4,160) = 230,02$; $P < 0,05$]. Conforme observado na Figura 6A, ao final da sessão de extinção todos os grupos apresentaram menor tempo de congelamento que o controle durante o primeiro bloco. É importante ressaltar que nenhuma diferença prévia entre os grupos a serem tratados foi encontrada [$F(3,40) = 0,14$; $P > 0,05$].

A ANOVA de medidas repetidas não indicou efeito significativo entre o tratamento e a reexposição do contexto para o tempo de congelamento durante TE1 e TE2 [$F(3,40) = 1,12$; $P > 0,05$], nem efeito principal do tratamento [$F(3,40) = 3,65$; $P > 0,05$]. No entanto, houve um efeito de reexposição de contexto [$F(1,40) = 29,9$; $P < 0,05$]. Como mostrado na Figura 6B, todos os grupos apresentaram percentuais similares de tempo de congelamento durante o TE1 e TE2.

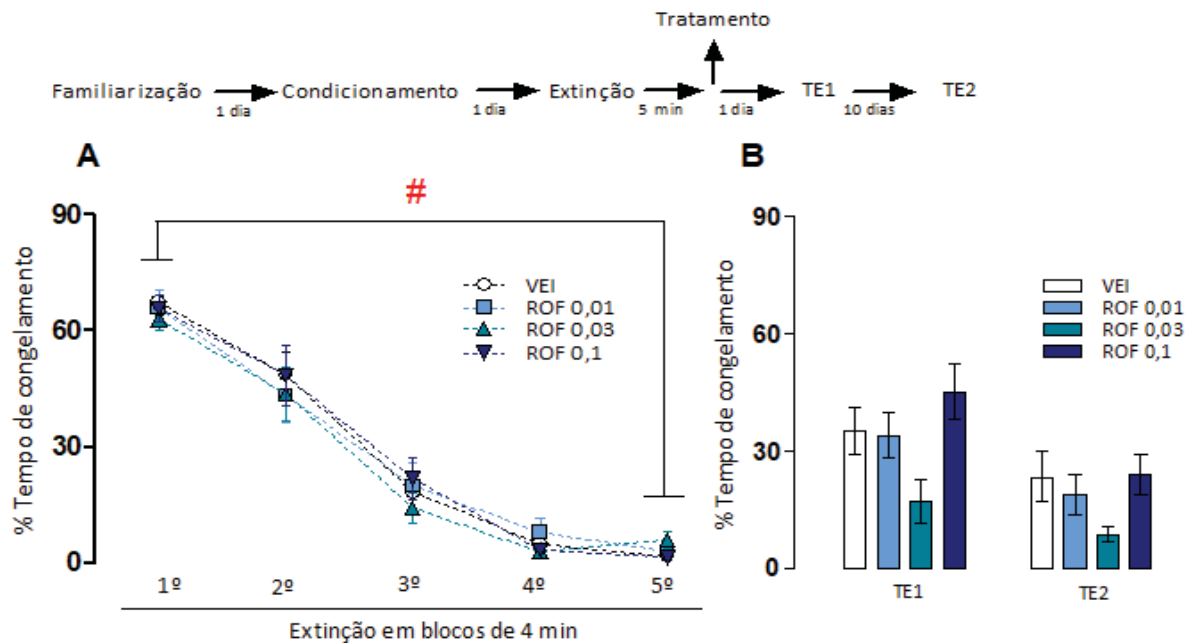


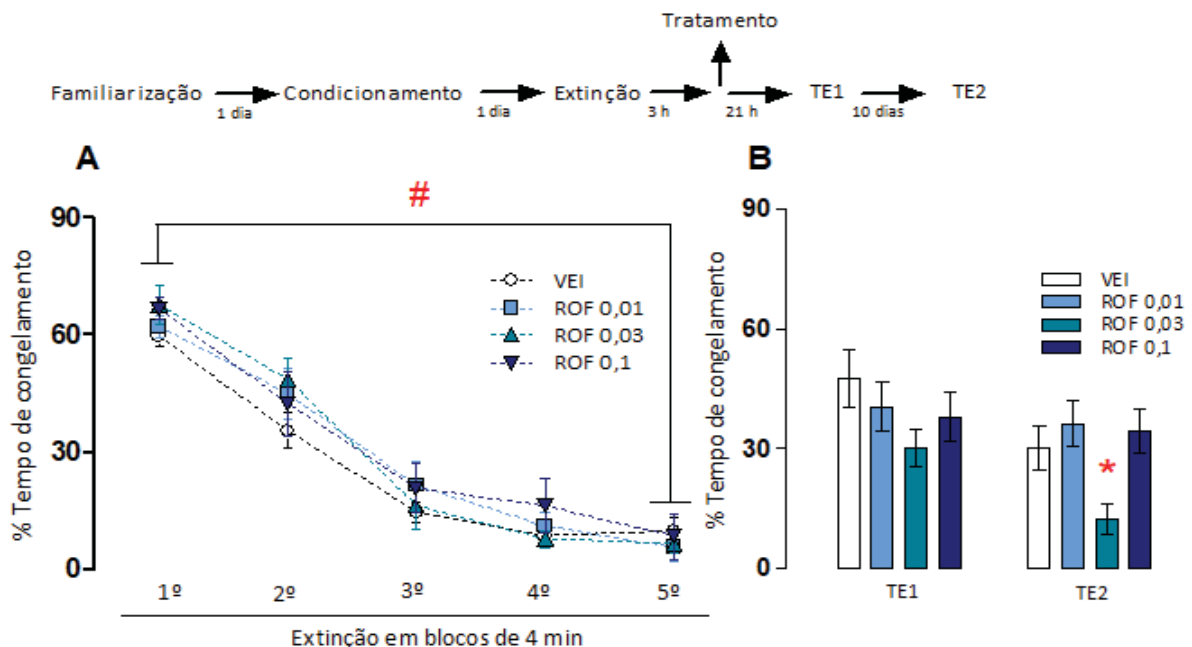
Figura 6. O efeito do ROF administrado 5 min após a sessão de extinção. O gráfico A indica a sessão de extinção. Todos os grupos apresentam redução da porcentagem de congelamento a partir do 3º bloco. O gráfico B indica o TE1 e TE2. Durante o TE1 e TE2 a dose intermediária de ROF (0,03 mg/kg) indica uma tendência em apresentar efeito de tratamento, contudo, a ANOVA de medidas repetidas apontou não existir diferença do fator tratamento entre os grupos. O # ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado com o respectivo grupo no 1º bloco durante a sessão de extinção. Os dados estão expressos pela média \pm EPM. ROF [0,01 mg/kg (n=10); 0,03 mg/kg (n=12); 0,1 mg/kg (n=10)]; VEI (n=12).

4.4 O TRATAMENTO COM ROF NA FASE TARDIA DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO POTENCIALIZOU A PERSISTÊNCIA DA EXTINÇÃO NO TE2.

Durante a extinção, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo nos blocos da sessão de extinção para o tempo de congelamento [$F(4,144) = 182,25$; $P < 0,05$]. Conforme observado na Figura 7A, no final da sessão de extinção, todos os grupos apresentaram menor tempo de congelamento que o controle durante o primeiro intervalo de tempo. É importante ressaltar que

nenhuma diferença prévia entre os grupos a serem tratados foi encontrada [F (3,36) = 0,39; $P > 0,05$].

Durante os testes da extinção a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento para o tempo de congelamento durante TE1 e TE2 [F (3,36) = 3,17; $P < 0,05$] e efeito de reexposição de contexto [F (1,36) = 11,52; $P < 0,05$]. Como observado na Figura 7B, os animais tratados com ROF (0,03 mg/kg) apresentaram menor comportamento de congelamento do que os controles durante o TE2. No gráfico é possível verificar a curva em U do efeito, tendo em vista que a dose mais baixa e a mais alta não apresentaram diferença quando comparadas ao grupo veículo. Não houve interação entre o tratamento e a reexposição do contexto [F (3,36) = 1,58; $P > 0,05$].



4.5 O TRATAMENTO COM ROF 6 HORAS DEPOIS DA EXTINÇÃO NÃO INTERFERIU NA EVOCAÇÃO DA EXTINÇÃO.

Durante a sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo dos blocos durante a sessão de extinção para o tempo de congelamento [F (4,120) = 165,91; $P < 0,05$]. Conforme observado na Figura 8A,

ao final da sessão de extinção, todos os grupos apresentaram menor tempo de congelamento que o controle durante o primeiro intervalo de tempo.

Durantes os testes da extinção A ANOVA de medidas repetidas não apontou efeitos significativos entre o tratamento e a reexposição do contexto para o tempo de congelamento durante TE1 e TE2 [$F(3,30) = 0,101$; $P > 0,05$], nem efeito principal do tratamento [$F(3,30) = 3,44$; $P > 0,05$], no entanto, houve um efeito de reexposição de contexto [$F(1,30) = 10,251$; $P < 0,05$]. Como mostrado na Figura 8B, todos os grupos apresentaram porcentagens semelhantes de tempo de congelamento durante TE1 e TE2.

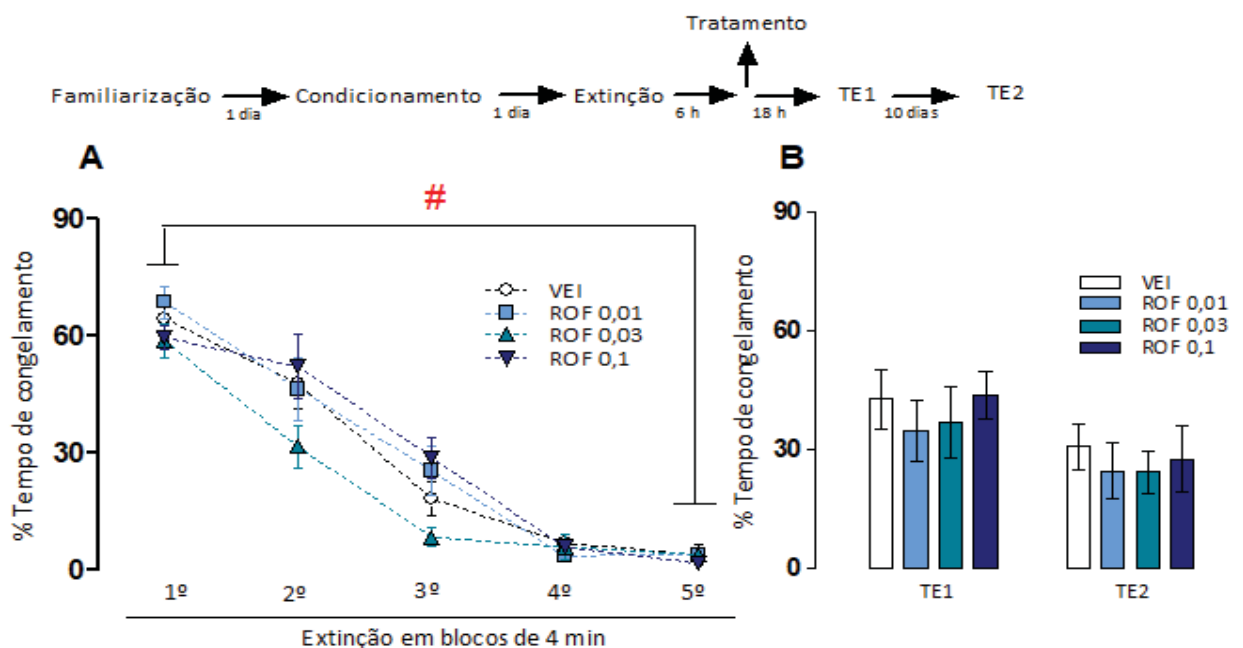


Figura 8. O efeito do ROF administrado 6 horas após a sessão de extinção. O gráfico A indica a sessão de extinção. Todos os grupos apresentam redução do percentual de congelamento a partir do 3º bloco. O gráfico B mostra que durante o TE1 e TE2 nenhuma das doses apresentou efeito sobre a evocação da extinção. O # ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado com o respectivo grupo no 1º bloco durante a sessão de extinção. Os dados estão expressos pela média \pm EPM. ROF [0,01 mg/kg ($n=9$); 0,03 mg/kg ($n=9$); 0,1 mg/kg ($n=8$)]; VEI ($n=8$).

4.6 O ROF ADMINISTRADO NO CÓRTEX IL NA FASE INICIAL DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO NÃO INTERFERE NA EXPRESSÃO DA EXTINÇÃO

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo nos blocos da sessão de extinção para o tempo de congelamento [$F(4,48) = 67,382$; $P < 0,05$]. Conforme demonstrado na figura 9A, o comportamento dos animais reduziu quando comparados com os blocos iniciais da extinção.

Nos testes da extinção, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve interação entre os fatores tratamento e repetição [$F(1,12) = 1,223$; $P > 0,05$] e que houve um efeito exposição ao contexto [$F(1,12) = 24,117$; $P < 0,05$]. A figura 9B mostra que não há diferença entre o tratamento com ROF no IL 5 minutos após a extinção do TE1 e no TE2.

O Grupo *OUT* refere-se aos animais em que o sítio de injeção não estava localizado no córtex IL (o local correto está representado na figura 4). Este grupo não foi incluído na análise estatística. Contudo, como pode ser observado na figura 9, esses animais apresentam um percentual de congelamento semelhante ao grupo veículo.

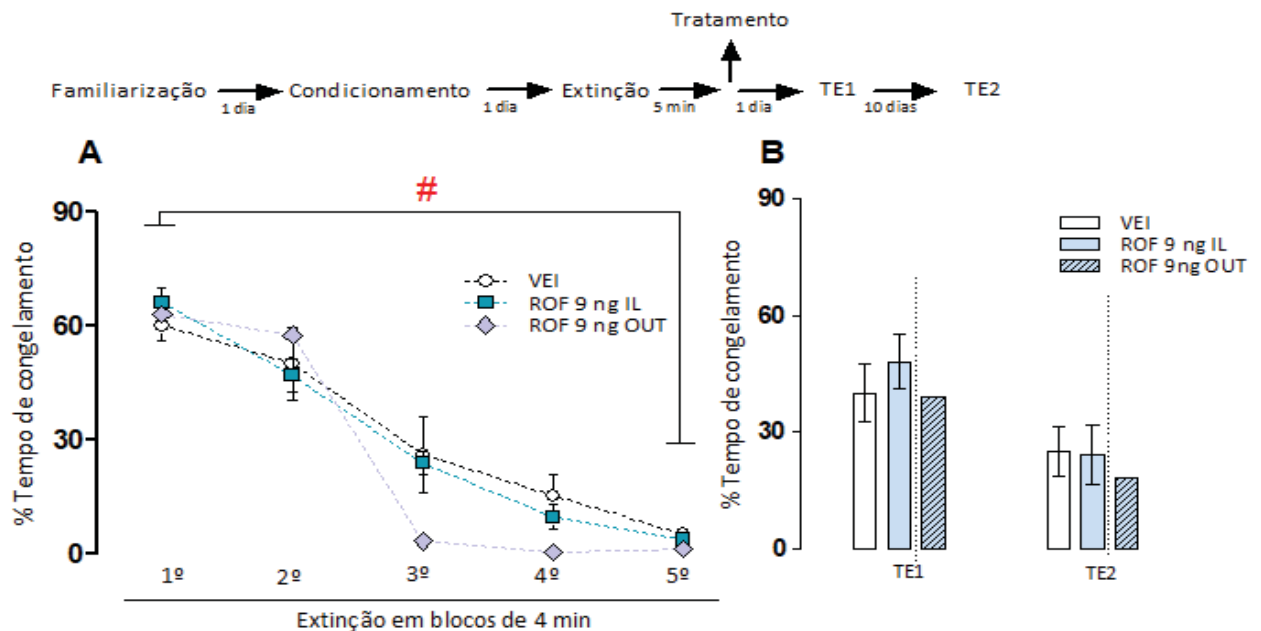


Figura 9. O efeito do ROF infundido no Córtex IL 5 min após a sessão de extinção. O gráfico A indica a sessão de extinção. Todos os grupos apresentaram redução do percentual de congelamento a partir do 3º bloco. O gráfico B mostra que o ROF não alterou a expressão da extinção dos animais no TE1 e no TE2. A linha tracejada vertical separa o grupo ROF 9 ng OUT porque o grupo não está incluído na análise estatística. O # ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado com o respectivo grupo no 1º bloco durante a sessão de extinção. Os dados estão expressos pela média \pm EPM. ROF 9 ng IL ($n=7$); VEI ($n=7$); ROF 9 ng OUT ($n=1$).

4.7 O ROF ADMINISTRADO DIRETAMENTE NO CÓRTEX IL NA FASE TARDIA DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO POTENCIALIZA A PERSISTÊNCIA DA EXTINÇÃO NO TE2

Durante a sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo dos blocos na sessão de extinção para o tempo de congelamento [$F(4,88) = 113,86$; $P < 0,05$]. Conforme observado na Figura 10A,

ao final da sessão de extinção todos os grupos apresentaram menor tempo de congelamento que o controle durante o primeiro bloco.

A ANOVA de medidas repetidas indicou uma interação significativa entre o tratamento e a reexposição de contexto para o tempo de congelamento durante o TE1 e TE2 [$F(1,13) = 4,60$; $P < 0,05$]. Como observado na Figura 10B, o grupo tratado com ROF apresentou menor comportamento de congelamento quando comparado ao controle no TE2.

O Grupo *OUT* refere-se aos animais em que o sítio de injeção não estava localizado no córtex IL (o local correto está representado na figura 4). Este grupo não foi incluído na análise estatística. Contudo, como pode ser observado na figura 10, esses animais apresentam um percentual de congelamento semelhante ao grupo veículo.

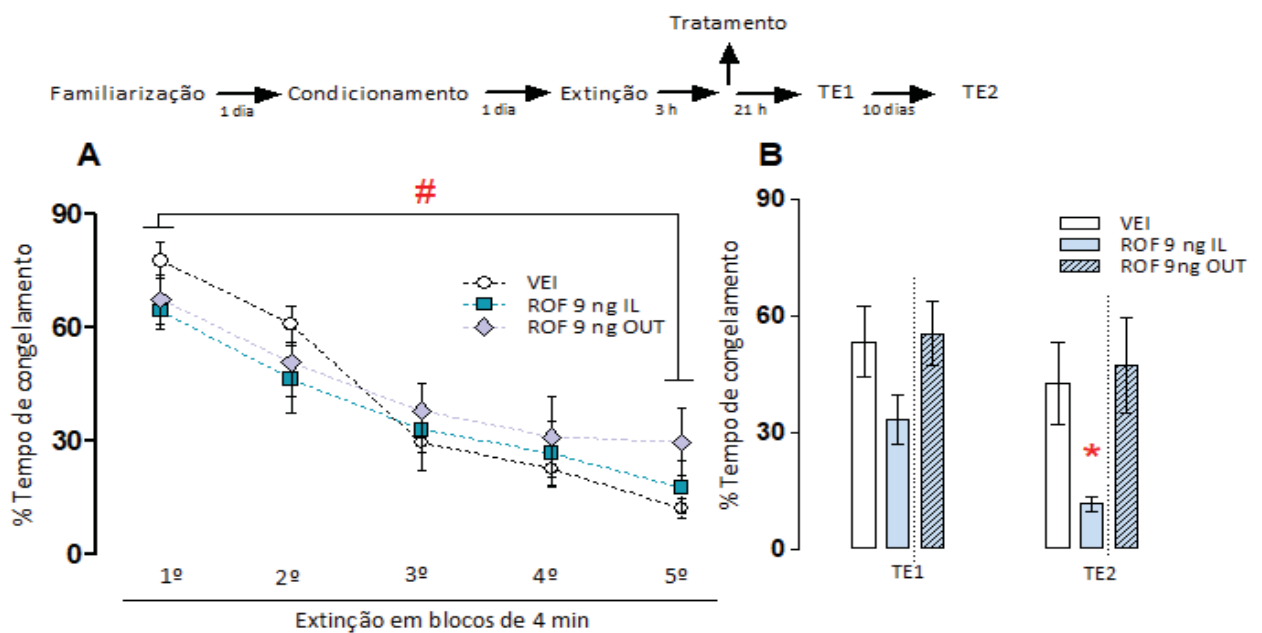


Figura 10. Efeitos do ROF infundidos em IL 3 horas após a sessão de extinção. O gráfico A indica a sessão de extinção. O gráfico B mostra que o tratamento com ROF (0,03 mg/kg) melhorou a expressão da extinção no TE2. A linha tracejada vertical separa o grupo ROF 9 ng OUT porque não está incluída na análise estatística. O * ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado ao grupo VEI. O # ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado com o respectivo grupo no 1º bloco durante a sessão de extinção. Os dados estão expressos pela média \pm EPM. ROF 9 ng IL (n=7); VEI (n=8); ROF 9 ng OUT (n=4).

4.8 O INIBIDOR DE PKA REVERTE O EFEITO DO ROF QUANDO ADMINISTRADO DIRETAMENTE NO CÓRTEX IL.

Durante a sessão de extinção, a ANOVA de duas vias indicou que não há interação entre os grupos a serem tratados com o pré-tratamento, tratamento e a repetição [$F(4,120) = 1,50; P > 0,05$] indicando não existir diferença prévia entre os grupos. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo dos blocos de 4 min na sessão de extinção para o tempo de congelamento [$F(4,120) = 240,31; P < 0,05$], indicando que todos os grupos de animais apresentaram redução do comportamento de congelamento ao comparar com o primeiro bloco do grupo veículo, conforme mostrado na figura 11A.

A ANOVA de duas vias indicou que não há efeito do pré-tratamento com ROF ou VEI sistemicamente [$F(2,29) = 1,29; P > 0,05$] e do tratamento com H89 ou VEI no IL [$F(2,29) = 0,29; P > 0,05$], mas houve uma interação entre os fatores pré-tratamento, tratamento e repetição nos testes TE1 e TE2 [$F(2,29) = 3,33; P < 0,05$]. A figura 11 mostra que o grupo ROF-VEI apresenta menor tempo de congelamento quando comparado ao grupo VEI-VEI, contudo o grupo ROF-H89 não apresenta diferença ao grupo VEI-VEI, sugerindo reversão do efeito do ROF administrado sistemicamente quando o H89 administrado no córtex IL. É importante ressaltar que o grupo VEI-H89 não apresenta diferença quando comparado ao grupo VEI-VEI, apontando que o H89 *per se* não foi capaz de apresentar efeitos sobre o aprendizado da extinção.

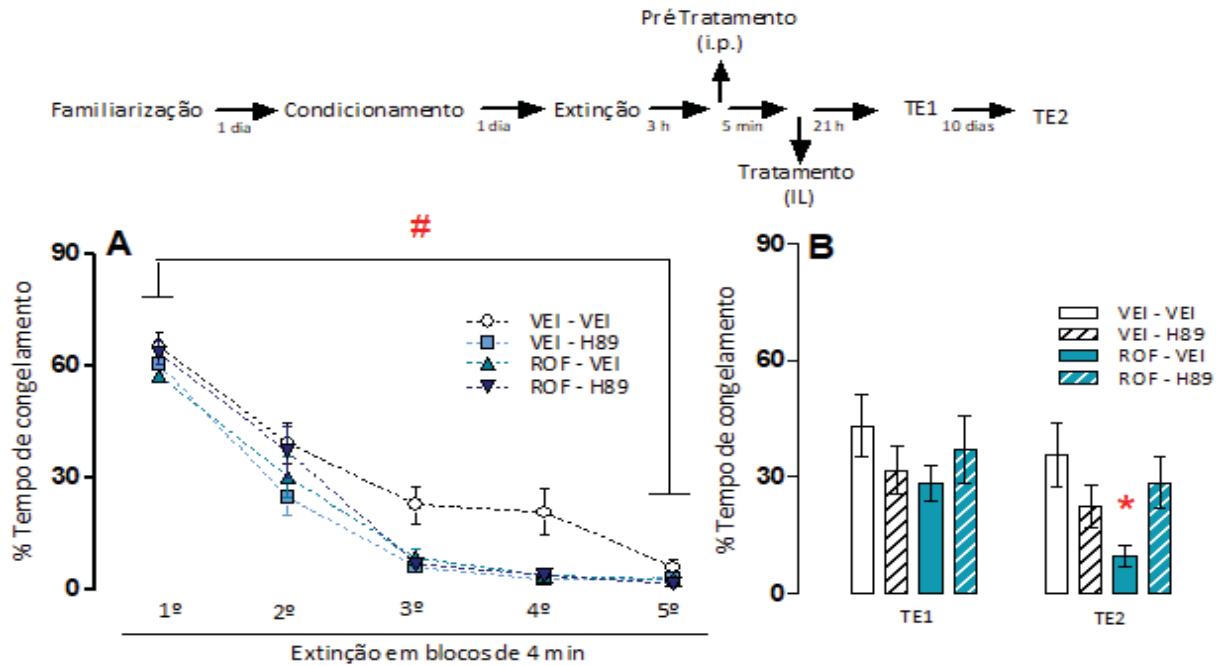


Figura 11: O inibidor de PKA (H89) administrado no córtex IL reverte o efeito do ROF administrado na fase tardia da consolidação. O gráfico A indica a sessão de extinção. Todos os grupos apresentaram redução do comportamento de congelamento a partir do 3º bloco. O gráfico B indica que o efeito do ROF (i.p.) é revertido com a administração no IL de H89. O H89 per se não apresenta diferença quando comparado com o grupo veículo. O * ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado ao grupo VEI. Os resultados estão representados como média \pm EPM. O # ($P < 0,05$) representa diferença estatística quando comparado com o respectivo grupo no 1º bloco durante a sessão de extinção. Os dados estão expressos pela média \pm EPM. VEI-VEI ($n=6$); VEI-ROF ($n=8$); H89-VEI ($n=9$); H89-ROF ($n=7$).

4.9 A DOSE INTERMEDIÁRIA DE ROF ADMINISTRADA NA FASE TARDIA DA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO AUMENTOU A EXPRESSÃO DE BDNF, MAS NÃO DOS MARCADORES DE PLASTICIDADE, SINAPTOFISINA E PSD95 NO CÓRTEX IL.

A ANOVA de uma via indicou efeito do fator tratamento para a expressão de BDNF/GAPDH [$F(2,13) = 14,68$; $P < 0,05$]. O teste de *post hoc* de Tukey indicou que os animais tratados com o ROF (0,03 mg/kg) na fase tardia da consolidação (3 horas após a extinção) apresentaram um aumento na expressão de BDNF quando comparados aos animais Naive e Veículo, como mostrado na figura 12A.

Para a expressão de PSD95/GAPDH a ANOVA indicou diferença no efeito tratamento [$F(2,14) = 7,347$; $P < 0,05$]. Como mostrado na figura 12B, independente do tratamento, os grupos condicionados apresentaram uma expressão de PSD95 reduzida em comparação ao grupo naive.

Já na expressão de Sinaptofisina, a ANOVA não indicou efeito do tratamento [$F(2,14) = 1,365$; $P > 0,05$]. Conforme indicado na figura 12C a expressão de sinaptofisina entre os grupos é semelhante.

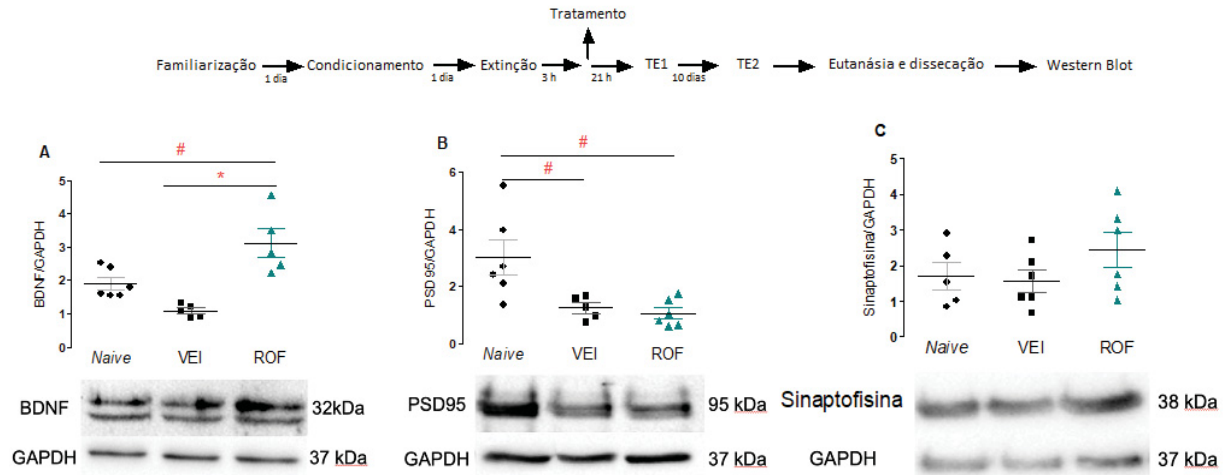


Figura 12: Expressão de BDNF, PSD95 e sinaptofisina no IL quando o ROF (0,03 mg/kg) foi administrado (i.p.) na fase tardia da consolidação da extinção. O gráfico A indica a relação da expressão BDNF/GAPDH. Os animais tratados com ROF apresentam maior expressão de BDNF no IL que o grupo Naive e o grupo VEI. O gráfico B indica a expressão PSD95/GAPDH. Os grupos VEI e ROF apresentam menor expressão que o grupo Naive. O gráfico C indica a expressão Sinaptofisina/GAPDH. Não há diferença da expressão de Sinaptofisina entre os grupos experimentais. Os resultados estão representados como média \pm EPM. O # ($P < 0,05$) indica diferença significativa com relação ao grupo Naive. O * ($P < 0,05$) indica diferença significativa quando comparado ao grupo VEI. ROF 0,03 mg/kg (n=6); VEI (n=6); Naive (n=6).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou o efeito do ROF na aquisição e consolidação da memória de extinção. Na aquisição da memória encontramos um efeito do ROF de facilitar a extinção, pois, os animais tratados com a dose intermediária (0,03 mg/kg) apresentaram menor comportamento de congelamento quando comparados com grupo veículo. Já a maior dose (0,1 mg/kg), piorou a expressão da extinção no TE1, contudo, ambos os efeitos observados na aquisição são transitórios, afinal, no TE2 nenhum efeito do tratamento é observado. Um ponto importante é que estes efeitos não estão relacionados ao comportamento de ansiedade, pois, nas doses selecionadas o ROF não alterou nenhum dos parâmetros avaliados em 2 testes que avaliam o comportamento do tipo ansioso de roedores. Já nas etapas de consolidação, nossos achados apontaram que o ROF na dose intermediária (0,03 mg/kg) reduziu o percentual do tempo de congelamento dos animais no TE2, mas não no TE1. Este dado sugere que, nesta

dose, o ROF foi capaz de melhorar a persistência da memória de extinção. Afinal, os animais apresentaram menor comportamento de medo quando comparados ao grupo controle. Efeito que é restrito a administração tardia, ou seja, realizada 3 h após a sessão de extinção, já que as administrações realizadas 5 min e 6 h após a sessão de extinção não produziu nenhum efeito.

Quando o ROF foi administrado diretamente no córtex IL, o efeito do ROF na persistência da extinção é semelhante ao encontrado na administração sistêmica, indicando que esse efeito é dependente da atividade do córtex IL. Além disso, este efeito também é dependente da via de sinalização da PKA, pois, ao inibir sua atividade com o inibidor de PKA H89, o efeito que foi observado pela administração sistêmica de ROF é revertido. Também observamos que a administração de ROF aumentou a expressão de BDNF no córtex IL 11 dias após a sessão de extinção, mas modificar a expressão de Sinaptofisina e PSD95. Este conjunto de dados aponta um efeito específico do ROF na fase tardia da consolidação potencializando a persistência da memória de extinção.

5.1 A AUSÊNCIA DO EFEITO DO ROF NOS COMPORTAMENTOS ASSOCIADOS COM A ANSIEDADE E ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

A administração de ROF independente da dose não alterou a %TBA no LCE, sugerindo que, em nossas condições experimentais, mostrando que nas doses selecionadas para o estudo nenhum efeito do tipo ansiolítico ou ansiogênico foi observado. Além disso, o número de entradas nos braços fechados, em nenhuma das doses, apresentou diferença significativa quando comparados ao controle, dado que sugere que o ROF também não foi capaz de alterar o comportamento exploratório e locomotor.

Os resultados encontrados no LCE foram confirmados quando os animais foram submetidos ao TCE, afinal, mais uma vez, não foram observadas alterações na porcentagem de tempo gasto no compartimento claro, sugerindo que o ROF não causou mudanças no comportamento do tipo ansioso dos animais, ou seja, os animais tratados não apresentaram diferenças quando comparados ao grupo controle no %TCC, assim como, não foram observadas mudanças no NC entre os compartimentos.

Desta forma, nossos resultados mostram que, nas doses selecionadas, o ROF não interfere nos comportamentos exploratórios e do tipo ansioso dos animais, o que indica que os efeitos observados estão atrelados a interferências na memória. Adicionalmente, estudos anteriores, com estas mesmas doses, mostram que a administração de ROF não foi capaz de induzir êmese em roedores, sugerindo que estas doses apresentam efeitos colaterais reduzidos (VANMIERLO et al., 2016).

Diferente dos resultados encontrados neste estudo, um trabalho que utilizou camundongos *knockout* para a FDE-4A mostrou que estes animais, quando comparados ao grupo selvagem, apresentaram comportamento do tipo ansiogênico quando foram expostos ao LCE e TCE (HANSEN, CONTI & ZHANG, 2014). Além disso, outro estudo que utilizou camundongos *knockout* para FDE-4B indicou que os animais apresentaram comportamento tipo ansiolítico quando foram submetidos ao LCE, TCE e ao labirinto em T com urina de gato (teste que avalia a esquiva do animal ao braço com o odor do predador; MCGIRR et al., 2016).

Um ponto importante é que o ROF é um inibidor não seletivo para alguma isoforma de FDE-4, portanto, a ausência de efeitos de comportamento semelhante à ansiedade pode estar relacionada com esse fato. Outro ponto interessante, é que estudos *in vitro* indicam que em baixas concentrações o ROF apresenta maior afinidade pela isoforma 4B da FDE (HATZELMANN, 2010). Este dado auxilia na compreensão das diferenças entre resultados encontrados neste trabalho quando comparados com estudos que utilizaram outros inibidores de FDE-4, como o Rolipram e o Etazolato (ambos inibem a FDE de forma não seletiva), pois, quando administrados sistemicamente, estes inibidores induziram nos animais um comportamento do tipo ansiolítico (LI et al., 2009; JINDAL, MAHESH & BHATT, 2013). Contudo, estes estudos utilizaram doses muito superiores de inibidores de FDE-4. Por exemplo, Li et al. (2009) submeteu animais tratados com Rolipram nas doses de 0,31, 0,62, 1,25 mg/kg (i.p.) ao TCE, que apresentou efeito do tipo ansiolítico semelhante ao controle Diazepam no percentual tempo de exploração do compartimento claro com a administração da dose mais alta, e ao LCE, que aumentou em todas as doses o tempo de exploração do braço aberto em comparação ao controle. Da mesma maneira, Jindal, Mahesh & Bhatt (2013) utilizaram Etazolato nas doses 0,5 e 1 mg/kg (i.p.) e observou que, no LCE, houve

aumento do percentual de tempo explorando o braço aberto nas 2 doses, assim como, as duas doses aumentaram o tempo de exploração do compartimento claro. Desta forma, em ambos, foram observados comportamentos do tipo ansiolítico. O que sugere que a alteração da atividade das diferentes isoformas da FDE-4 pode desencadear diferentes respostas comportamentais relacionadas à ansiedade nos animais.

Portanto, pode-se inferir que, nas doses selecionadas, o ROF não é capaz de interferir nos comportamentos relacionados com a ansiedade. Esta ausência de efeito é importante, pois, os repertórios dos comportamentos de defesa e ansiedade apresentam mecanismos de expressão semelhantes (BRANDÃO et al., 2008; HYDE, RYAN & WATERS, 2019), além disso, o ROF apresenta prolongado tempo de meia-vida em humanos (17 horas; WEDZICHA, CALVERLEY & RABE, 2016). Desta forma poderia causar interferências nos efeitos encontrados no protocolo de condicionamento ao medo. Portanto, a ausência do efeito na ansiedade é fundamental para validar que os efeitos encontrados na extinção e nos testes da extinção são efetivamente relacionados com o aprendizado.

5.2 O EFEITO DO ROF NA AQUISIÇÃO DA EXTINÇÃO

Todos os animais quando submetidos à sessão de extinção, apresentaram redução do comportamento de congelamento, sugerindo que houve o aprendizado da extinção, pois, esta é caracterizada pela redução das respostas de medo frente ao EC, em nosso protocolo, o contexto (IZQUIERDO, 2016; HERRY et al., 2010; CHATTWAL et al., 2016). Portanto, ao expor os animais de forma prolongada ao contexto (20 min), como esperado, houve uma redução das respostas de medo. Esta redução é dependente da habituação ao contexto assim como a redução da memória associativa formada entre o EI e EC (KAMPRATH & WOTJAK, 2004). Além disso, o controle do experimento mantém baixos percentuais de congelamento no TE1 e TE2, sugerindo que, neste experimento a exposição por 20 min não promoveu o evento de recuperação espontânea nos animais.

Quando o ROF foi administrado 20 min antes da sessão de extinção, a dose intermediária de ROF (0,03 mg/kg) reduziu o tempo de congelamento dos animais durante o primeiro bloco de 4 min, dado que sugere a facilitação da aquisição durante a sessão de extinção. No entanto, este efeito foi transitório, uma

vez que não foram observadas diferenças entre o ROF (0,03 mg/kg) quando comparado com o grupo controle durante o TE1 e o TE2, sugerindo que, nesta dose, o ROF induziu apenas um efeito específico durante sessão. Autores argumentam que a redução da expressão do comportamento de medo durante a sessão de extinção está associada com a ausência da previsão do estímulo aversivo, sendo esta, a possível causa dos efeitos observados durante a sessão de extinção (PLENDL & WOTJAK, 2010). Curiosamente, a redução observada nesta dose, ocorre durante o início da extinção.

Em contrapartida, trabalhos anteriores mostraram que a mesma dose de rolipram, um inibidor de FDE-4, prejudicou a aquisição da extinção de sobressalto potencializada pelo medo (MULLER, HOFFMANN & CHERRY, 2010). Curiosamente, a maior dose de ROF (0,1 mg/kg) não alterou o comportamento de congelamento durante a sessão de extinção, mas aumentou o tempo de congelamento quando comparado ao controle um dia depois, no TE1, sugerindo que o ROF não afetou a aquisição da extinção, mas prejudicou sua consolidação. Resultado semelhante foi observado com o Rolipram, em que sua administração antes da aquisição da extinção aumentou a expressão do medo apenas um dia depois, promovendo um efeito entre as sessões (MULLER, HOFFMANN & CHERRY, 2010). No entanto, o aumento do medo induzido pelo ROF (0,1 mg/kg) não foi duradouro, uma vez que este efeito não foi observado após 10 dias.

Mesmo o ROF apresentando efeitos de melhora na dose de 0,03 mg/kg e de prejuízo na evocação da extinção na dose de 0,1 mg/kg, nenhum destes efeitos é persistente, tendo em vista que 10 dias depois, durante o TE2, os animais não apresentam diferenças comportamentais quando comparados com o grupo controle. Ao fazer um paralelo com a clínica, os efeitos mais interessantes para o paciente, são os persistentes, uma vez que, poderiam reduzir a expressão do medo em longo prazo, assim como, devem ser evitados os efeitos prejudiciais, como o efeito da maior dose de ROF (0,1 mg/kg) de aumentar a resposta de medo. Reforçando, portanto, a importância de se explorar o efeito de diversas doses, afinal, nossos resultados sugerem que diferentes doses de ROF podem desencadear respostas diferentes.

5.3 O EFEITO DO ROF NA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO.

5.3.1 O efeito do ROF na fase inicial da consolidação da extinção.

Assim como no experimento da aquisição, os grupos experimentais também reduziram o percentual de tempo de congelamento durante a sessão de extinção, contudo, os percentuais de medo apresentado por estes animais no TE1 e TE2 são aparentemente maiores do que os encontrados no experimento da aquisição (o mesmo comportamento se nos repete outros experimentos na consolidação da extinção, que serão discutidos posteriormente) sugerindo que estes animais apresentam recuperação espontânea da memória de medo. Conforme já descrito por Wotjak (2019) diversos fatores como a intensidade do EI e a qualidade do EC podem interferir no aprendizado da extinção. Portanto, este resultado sugere que há uma mudança na expressão da extinção dos animais quando a manipulação para o tratamento é realizada após a extinção.

Quando o ROF foi administrado 5 min após a sessão de extinção (fase inicial do processo de consolidação da extinção), independente da dose, o ROF não alterou o comportamento de congelamento dos animais no TE1 (um dia após a sessão de extinção) nem no TE2 (10 dias depois da sessão de extinção). Ao contrário de nossos resultados, estudos em que a inibição da FDE-4 foi realizada com o Rolipram infundido diretamente no hipocampo dorsal dos animais, imediatamente após a sessão de extinção no protocolo de esquiva inibitória, houve um aumento do comportamento de esquiva dos animais em relação ao grupo controle, ou seja, um aumento da resposta medo após a sessão de extinção (ROESLER et al., 2014). Segundo os autores, este efeito pode estar associado a uma mudança do processo de extinção para o de reconsolidação da memória de medo, sugerindo, portanto, que o efeito do Rolipram fortalece a memória de medo por aumentar a reconsolidação e não a extinção quando administrado nas fases mais iniciais da consolidação no hipocampo, o que sugere também que há diferença do efeito da inibição da FDE-4 em outras regiões. Principalmente no que diz respeito à participação do hipocampo para a formação da memória do medo, em que ocorre a associação do EC ao EI (no caso o contexto ao choque), no qual,

sua participação está mais associada às informações referentes ao reconhecimento do ambiente (WOTJAK, 2019).

Além disso, há evidências que propõe que os mecanismos de aquisição e consolidação de memória podem se sobrepor em alguns momentos após o aprendizado (AKKERMAN, BLOCKLAND & PRICKAERTS, 2015). Por exemplo, evidências sugerem que a transmissão colinérgica influencia a aquisição por pelo menos 12 minutos após o aprendizado, portanto, a administração de Donezepil, um inibidor de colinesterase, 2 minutos após o aprendizado do reconhecimento de objetos, melhorou o aprendizado de aquisição em vez da consolidação (AKKERMAN, BLOCKLAND & PRICKAERTS, 2016).

Não se sabe se os mecanismos de aquisição da extinção do medo e as fases iniciais da consolidação também se sobrepõem. Consequentemente, não se pode excluir que o aumento da expressão de medo induzido pela inibição da FDE-4 possa ser mediado por um efeito na aquisição da extinção, e não por uma potencialização da reconsolidação. Neste contexto, nossos resultados estão de acordo com estudos que, utilizando o teste de reconhecimento de objetos, sugeriram que a inibição da FDE-4 imediatamente após o treino (fase inicial de consolidação) não é capaz de melhorar o aprendizado dessa tarefa (RUTTEN et al., 2007). Ainda, o aumento do AMPc induzido pela inibição da FDE-4 apresentou-se como mais relevante para a fase tardia da consolidação da memória nesse teste. Por mais que diferenças nos protocolos precisem ser consideradas, tendo em vista a natureza da memória associada com o condicionamento do medo versus a do teste de reconhecimento de objetos, a ausência de efeito durante a fase inicial de consolidação era esperada.

A ausência do efeito da inibição da FDE-4 nas fases iniciais da consolidação pode estar associada a evidências de que a sinalização mediada pelo AMPc/PKA/CREB/BDNF está aumentada na fase tardia da consolidação. Tem sido visto que essa via de sinalização está associada com a atividade da FDE-4 (SHARMA et al., 2013) e com a manutenção das memórias de longa duração. Um estudo explorou a participação dos receptores α -adrenérgicos, com administração de noradrenalina imediatamente após a sessão de extinção, na região CA1 do hipocampo e mostrou que os animais apresentaram melhora na expressão da extinção comparados ao grupo controle 12 dias após a extinção, sugerindo a participação destes receptores nos mecanismos associados com a

persistência e manutenção da extinção. Ainda, quando os animais receberam propranolol (antagonista competitivo dos receptores β -adrenérgicos) diretamente na região CA1 os efeitos da noradrenalina de potencializar a persistência da extinção foram revertidos. Além disso, o mesmo efeito foi visto quando se inibiu a via do AMPc com rp-CAMPS (potente inibidor competitivo das quinases ativadas por AMPc). Adicionalmente, houve aumento da expressão de PKA e CREB fosforilado nos grupos que passaram pela extinção e receberam o tratamento, apontando os receptores β -adrenérgicos como um dos receptores envolvidos nos mecanismos de manutenção e persistência da extinção (CHAI et al., 2014). Além da participação hipocampal dos receptores β -adrenérgicos, já foi relatado também a sua atividade no córtex IL, pois, a administração de propranolol na região antes da extinção prejudicou a expressão da extinção (MUELLER, PORTER & QUIRK, 2008). Adicionalmente a estes achados, O'Dell et al. em 2010 publicou uma revisão de literatura levantando trabalhos que reforçam a participação dos receptores β -adrenérgicos e a via da sinalização da PKA na extinção. Alguns deles ressaltam a atividade dos inibidores de FDE-4 tendo em vista a sua capacidade de aumentar a sinalização da via da PKA e das β -arrestinas, que estão associadas com a fosforilação da ERK que também se apresenta como uma das vias de sinalização para a fosforilação da CREB (fator de transcrição fundamental para as modulações sinápticas).

Portanto estes achados que exploraram a participação receptores β -adrenérgicos na memória de extinção evidenciam a via da PKA como uma importante via de sinalização para a formação e manutenção da extinção, contudo, ainda faltam estudos para compreender os mecanismos envolvidos com estes efeitos. Principalmente, porque há 2 momentos em que há aumento da expressão da PKA, imediatamente após o aprendizado e entre 3-6 horas após o aprendizado (GIESE & MIZUNO, 2013). Desta forma, como nos primeiros minutos após o aprendizado da extinção a inibição da FDE-4 não apresentou efeito, buscou-se explorar o segundo momento em que há aumento da expressão da via da AMPc/PKA/CREB.

5.3.2 O efeito do ROF na fase tardia da consolidação da extinção.

Ao administrar o ROF na fase tardia da consolidação, 3 horas após o aprendizado, observou-se que a dose intermediária de ROF (0,03 mg/kg) foi capaz de potencializar a persistência da extinção, por reduzir a expressão do medo no TE2, que avalia a memória em longo prazo. Já no TE1 o ROF não foi capaz de causar nenhum efeito. Ainda, pode-se sugerir que o ROF foi capaz de prevenir a recuperação espontânea, pois o grupo que recebeu ROF (0,03 mg/kg) apresentou no TE2 uma porcentagem de tempo de congelamento semelhante aos últimos minutos da sessão de extinção, enquanto os outros grupos aumentaram consideravelmente a resposta de medo quando comparado com os últimos blocos da extinção. Além disso, este resultado está de acordo com estudos mostrando que a inibição da FDE-4 durante a fase tardia melhorou a consolidação da memória de reconhecimento de objetos, de localização de objetos e do labirinto aquático de Morris (RENEERKENS et al., 2009; RUTTEN et al., 2007; JABARIS et al., 2015). No entanto, nesses estudos, o efeito foi observado 24 horas após o tratamento e, em nossos achados, o efeito foi observado 10 dias após o TE1. Essas diferenças podem estar relacionadas à natureza da memória envolvida, ou seja, memória declarativa e espacial *versus* memória de extinção do medo condicionado.

Nosso resultado está de acordo com os resultados que indicam que camundongos *knockout* para FDE-4B apresentaram uma redução no comportamento de congelamento apenas após 7 dias da sessão de extinção (McGirr et al., 2016). Uma vez que o ROF tem uma maior afinidade pelo FDE-4B, estes efeitos podem estar preferencialmente relacionados com a inibição da isoforma FDE-4B (BOSWELL-SMITH & CAZZOLA, 2006; HATZELMANN et al., 2010; KAWAMATAWONG, 2017). Além disso, a FDE-4B é altamente expressa em regiões importantes para a consolidação da extinção em roedores, como os núcleos da amígdala, o hipocampo e o mPFC (PÉREZ-TORRES et al., 2000). No entanto, outras isoformas, como a FDE-4D e a FDE-4A, também são expressas no sistema nervoso central (LACKICS et al., 2010). Desta forma, não se pode afirmar que os efeitos encontrados durante a consolidação da extinção sejam derivados

de uma isoforma específica de FDE-4. Em conjunto, os presentes resultados sugerem que o FDE-4 pode estar controlando a persistência da extinção.

5.3.3 O efeito do ROF é restrito a janela de consolidação

Como estabelecido na literatura os mecanismos de plasticidade envolvidos com o processo de consolidação são limitados ao período de 6 horas após a aquisição da memória (FLEXNER et al., 1967). Desta forma, para confirmar que o efeito ROF anteriormente observado estava restrito ao tempo de consolidação, o efeito de tratamento do ROF 6 horas após a extinção foi avaliado. A ausência de efeito aponta que o ROF apresenta um efeito na persistência da extinção especificamente na fase tardia da consolidação da extinção e quando administrado no fim da janela de consolidação este efeito não é mais observado.

A persistência da memória depende de uma onda tardia de síntese protéica necessária para sustentar e armazenar a memória de longo prazo, sendo que este processo inicia nas fases mais tardias da consolidação e pode se estender a até 24 horas após o aprendizado (KATCHE et al., 2010; BEKINSCHTEIN et al., 2007). Assim, a administração de ROF às 6 horas, ao não apresentar mais alterações no comportamento de congelamento dos animais, sugere que os efeitos do ROF na persistência estão restritos a fase tardia da consolidação e provavelmente nas fases iniciais do processo de persistência, contudo, ainda é importante explorar os efeitos do ROF nas fases mais tardias da persistência, tendo em vista que ao administrar noradrenalina na região CA1 do hipocampo às 12 horas houve uma melhora na persistência da extinção, mas não a administração às 6 horas, efeito dependente dos receptores α adrenérgicos (CHAI et al., 2014).

5.3.4 O efeito do ROF administrado no córtex IL nas fases inicial e tardia da consolidação

Sendo o IL como uma das regiões fundamentais para a consolidação e evocação da memória de extinção (MILAD & QUIRK, 2002; SOTRES-BAYON et al., 2010), exploramos, portanto, o efeito do ROF administrado diretamente no IL aos 5 min e às 3 h após a sessão de extinção, ou seja, durante as fases inicial e tardia da consolidação da extinção, respectivamente.

Concordando com os resultados da administração sistêmica, o ROF administrado no IL na fase inicial da consolidação não foi capaz de alterar o comportamento dos animais nos teste TE1 e TE2, sugerindo, portanto, que a inibição da FDE-4 especificamente no IL na fase inicial da consolidação da extinção não produz efeitos na memória de extinção.

Já a infusão de ROF no IL durante a fase tardia da consolidação da extinção indicou uma redução significativa no tempo de congelamento observado no TE2, resultado muito semelhante ao encontrado quando o ROF foi administrado sistemicamente às 3 h, reforçando assim, a idéia de que a inibição da FDE-4 durante a fase tardia da consolidação pode potencializar a persistência da extinção. O grupo OUT, animais excluídos da análise por apresentarem o sítio de injeção fora do IL, apresentaram percentuais de congelamento semelhante ao grupo veículo. Sugerindo que o efeito de ROF depende da infusão no IL.

Esses efeitos são considerados dependentes do aumento da expressão de AMPc (MCGIRR et al., 2016). O AMPc está envolvido na fase tardia da LTP ativando a via de sinalização da PKA/CREB (VANMIERLO, CREEMERS & AKKERMAN, 2016). O CREB tem sido sugerido como um modulador positivo da memória (MONTI, BERTEOLLI & CONTESTABILE, 2006; MULLER, HOFMANN & CHERRY, 2010; JABARIS et al., 2015b), no entanto, seu papel na memória de extinção não é totalmente compreendido. O aumento da fosforilação de CREB foi observado na amígdala basolateral após a extinção do medo (SONG et al., 2018), mas alguns autores argumentam que a expressão de CREB nesta região é mais relevante para a reconsolidação do que a extinção (MONTI, BERTEOLLI & CONTESTABILE, 2006). Em relação ao córtex IL, a redução da fosforilação da CREB no IL também tem sido relacionada à reinstalação da memória de abuso de drogas causado pelo estresse (BRIAND et al., 2010), e no prejuízo da evocação da memória de extinção de drogas de abuso (KABIR et al., 2013). De relevância para os presentes achados, a potencialização da persistência da extinção induzida pela infusão de noradrenalina no hipocampo dorsal, 12 horas após a extinção, foi mediada por cAMP/PKA/CREB (CHAI et al., 2014). Curiosamente, alguns autores mostraram que camundongos transgênicos com atividade da PKA reduzida apresentaram melhor extinção de medo do que controles, no entanto, no dia seguinte ou após 21 dias, os mesmos animais apresentaram maior resposta ao medo (ISIEGAS et al., 2006).

Com estes resultados é possível sugerir que a via de sinalização de AMPc/PKA/CREB favorece o processo de extinção, dependendo da área do cérebro e da fase de processamento da memória, essa via é potencializada ou deprimida. Desta forma, sugerimos que, ao intensificar esta via tanto sistemicamente quanto no córtex IL na fase tardia da consolidação da extinção, pode-se potencializar a persistência da extinção.

5.3.5 O efeito do ROF é dependente da atividade da PKA

A fim de avaliar se o efeito do ROF está associado com a atividade da PKA e o efeito encontrado pela administração de ROF na fase tardia da consolidação, foi infundido H89, composto que já apresentou em estudos anteriores ser capaz de inibir a atividade da PKA (DAVIES et al., 2000; WU et al., 2015), diretamente no córtex IL. Os animais que receberam H89 tiveram o efeito do ROF administrado sistemicamente revertido. Além disso, o H89 infundido diretamente no córtex IL com a administração sistêmica de veículo não foi capaz induzir mudanças no comportamento de congelamento dos animais em relação aos animais que receberam apenas veículo, sugerindo que a administração do inibidor da PKA *per se* não foi capaz de alterar a memória de extinção. Desta forma, nossos dados apontam que o ROF, ao inibir a FDE-4 está aumentando a atividade da PKA, afinal, quando esta via de sinalização é bloqueada os efeitos encontrados pelo ROF foram revertidos.

Bailey, Kandel & Kausik (2004) discutiram em uma revisão de literatura o papel PKA como um facilitador dos processos envolvidos com a memória de longa duração, principalmente na ativação do CREB. Nossos resultados estão de acordo com esta hipótese, afinal, ao inibir a PKA durante a fase tardia da consolidação, o efeito de melhora da expressão da extinção no TE2, observado pelo ROF na dose de 0,03 mg/kg, é revertido. Desta forma, nossos resultados indicam a participação da PKA na modulação da resposta de ROF.

Contudo, ainda não é possível concluir que a inibição da FDE-4 dependa exclusivamente da atividade da PKA, pois, já é relatado na literatura que os inibidores de PKA podem também interferir em outras vias de sinalização como, por exemplo, a via das MAP quinases (DAVIES et al., 2000). Além disso, um estudo que verificou a formação da LTP em fatias de hipocampo mostrou que a

indução da LTP pela via do GMPc/PKG também é dependente da atividade da PKA (BOLLEN et al., 2014).

Adicionalmente, alguns inibidores de PKA, como o 8-Br-cAMP, apresentam estrutura semelhante à molécula de AMPc e podem, em elevadas concentrações, mimetizar a atividade de AMPc (POPPE et al, 2008). A concentração selecionada de H89 parece não desencadear um efeito semelhante ao encontrado com o 8-Br-cAMP, afinal, o H89, *per se*, não alterou o percentual de congelamento dos animais.

5.3.6 O efeito do ROF administrado na fase tardia da consolidação na expressão de BDNF, PSD95 e Sinaptofisina no córtex IL.

Como a via do AMPc/PKA induz a fosforilação do CREB e a transcrição de fatores relacionados à plasticidade sináptica, avaliamos também se o tratamento com ROF 0,03 mg/kg iria alterar a expressão de BDNF, PSD95 e sinaptofisina no córtex IL. A administração de ROF 3 horas após a sessão de extinção aumentou o BDNF no IL. O aumento da expressão do BDNF no córtex IL tem sido relacionado aos processos de consolidação da extinção, devido ao fato de ser um importante sinalizador para os processos plasticidade neuronal (SHARMA et al., 2013). Inclusive, sua participação no processo de extinção já foi mostrada em estudos *ex vivo* que apontaram que a administração do BDNF foi capaz de reverter à plasticidade que foi induzida pelo condicionamento, mimetizando o processo de extinção (SOLER-CEDEÑO et al, 2019.). Além disso, a utilização do 7,8-dihidroxi-flavona, agonista do receptor de tirosina quinase B (TrkB), receptor do BDNF, facilitou a extinção do medo sugerindo uma modulação pelo BDNF na aprendizagem e no processamento da memória de extinção (ANDERO et al., 2011). Esse resultado assemelha-se com o encontrado por Kataoka, et al. (2018) que observou que os animais que foram submetidos ao protocolo de única apresentação prolongada ao estresse (um modelo animal para o TEPT em que os animais são apresentados a diversos estressores em um único dia) apresentaram redução da expressão de BDNF e da fosforilação do TrkB, e quando o BDNF era infundido no córtex IL, esse déficit era revertido e a extinção facilitada.

Além disso, estudos indicam que o BDNF é necessário e suficiente para manter a memória de extinção acessível, pois, um estudo utilizando esquiva

inibitória demonstrou que a infusão de BDNF no hipocampo após a reativação da extinção melhorou a expressão da extinção tanto em 1 dia como 7 dias depois (RADISKE et al., 2015). Este efeito em parte semelhante ao visto em nossos resultados, pode estar associado com achados que indicam que o BDNF está relacionado com o aumento da expressão e atividade de uma isoforma atípica e autonomamente ativa da proteína quinase C (PKCa) presente apenas no SNC, a PKM ζ , um sinalizador chave da persistência da memória. (KELLY et al, 2007; SAKTOR & HELL, 2017). Inclusive um estudo que investigou estimulação da LTP, *in vitro*, em fatias de hipocampo de camundongos KO para BDNF verificaram em seus resultados que a manutenção de longo prazo da LTP é dependente da relação de PKM ζ com BDNF, afinal quando houve a reposição de BDNF a LTP foi potencializada e quando o peptídeo inibitório ζ (ZIP; antisense da PKM ζ) foi administrado, a manutenção da LTP foi prejudicada (MEI et al, 2011).

Um fato curioso, é que o aumento da atividade da PKM ζ está relacionado com a fase mais tardia da consolidação (MEI et al, 2011; SAKTOR & HELL, 2017), desta forma, este pode ser um possível mecanismo a ser explorado para explicar os efeitos observados pela administração de ROF na fase tardia da consolidação.

Outra evidência que aponta a atividade do BDNF como potencializador da extinção é um estudo que utilizou o proBDNF (precursor do BDNF maduro) diretamente infundido no córtex IL 5 dias após a extinção da sessão e demonstrou que os animais apresentaram menos comportamento de congelamento quando comparados com o grupo controle, enquanto o grupo que recebeu anticorpos anti-proBDNF apresentou maior tempo de congelamento em relação ao controle, sugerindo que o BDNF está associado com a manutenção da persistência da memória de extinção (SUN, LI & AN, 2018). Além disso, estudos anteriores indicaram que o aumento da sinalização do BDNF promoveu mudanças anatômicas e funcionais em regiões importantes para a manutenção da memória de medo e de extinção como: Hipocampo, amígdala, córtex anterior cingulado, nucleus accumbens e CPFvm (região homóloga em humanos ao córtex IL de roedores), reforçando a importância do BDNF para expressão da memória aversiva e de extinção (GREEN, CORSI-TRAVALI & NEUMEISTER, 2013).

Outra possibilidade pode estar associada com o delineamento experimental, pois, um estudo demonstrou que ao aumentar a concentração cerebral de magnésio com a ingestão na água de magnésio l treonato, houve um

aumento dos níveis de CREB, BDNF e sinaptofisina no córtex IL (ABUMARIA et al., 2011). Contudo, neste experimento, os animais foram eutanasiados 24 horas após o aprendizado, enquanto, em nosso protocolo os animais foram eutanasiados 11 dias após o aprendizado da extinção e do tratamento.

Nossos resultados indicaram também que não houve alterações na expressão de Sinaptofisina e PSD95 pela administração de ROF quando comparados com a administração de veículo, sugerindo que o aumento de BDNF não está diretamente associado com as alterações morfológicas dos neurônios no IL e sim por outros mecanismos de sinalização. Contudo, houve uma redução da expressão BDNF do grupo veículo quando comparado ao Naive, assim como, houve redução da PSD95 tanto no grupo ROF e quanto no veículo quando comparados com o Naive. Esta redução pode estar relacionada à exposição ao protocolo de condicionamento de medo ao contexto e possivelmente com as diferenças funcionais encontradas entre o PL e o IL na expressão da memória de medo, sendo que, o PL é uma estrutura fundamental para a discriminação de ambientes aversivos, enquanto o IL apresenta maior atividade para a discriminação de ambientes seguros (CORCHES et al., 2019).

Além disso, a PSD95 apresenta um papel fundamental na formação da memória de medo, pois a utilização de ZL007, um composto que prejudica a ligação de PSD95 com o óxido nítrico sintase (fundamental para o fortalecimento da LTP), quando administrado sistemicamente prejudicou a formação da memória de medo e a administração diretamente na amígdala prejudicou a LTP (LI et al., 2018). Curiosamente, outro trabalho que utilizou animais KO para PSD95 indicou prejuízos no aprendizado e expressão da extinção quando comparados com os animais sem a alteração (FITZGERALD et al., 2014). Ainda, outro estudo que utilizou o protocolo de condicionamento auditivo verificou que independente do tratamento anterior à extinção com fluoxetina, houve um aumento da expressão tanto de Sinaptofisina quanto de PSD95 no IL 1 semana após a extinção. Esta diferença pode estar relacionada tanto com o fato de que o estímulo condicionado nos protocolos é diferente (contexto *versus* som), quanto de que em nosso protocolo os animais foram expostos ao TE1 e TE2 antes da eutanásia, enquanto no protocolo dos autores a eutanásia foi realizada 1 semana após a extinção sem a reapresentação ao estímulo. Além disso, os autores demonstraram que após a extinção tanto os marcadores que indicam aumento de sinapses excitatórias,

como o GluA2 (subunidade do receptor AMPA), quanto os marcadores que indicam o aumento das sinapses inibitórias, como exemplo GABA (A), estão aumentados, sugerindo que tanto os processos de plasticidade da depressão de longa duração (LTD, do inglês long-term depression) como o da LTP são importantes para a extinção (POPOVA et al., 2014). Outro estudo que corrobora com esta hipótese indicou que a expressão de BDNF no hipocampo ventral (vHIP) e a sinalização dependente de BDNF para o CPFm participam da regulação da extinção, pois, a administração tanto no PL quanto no IL de anti-BDNF prejudicou a evocação da extinção no protocolo de esquiva inibitória. Além disso, há aumento da expressão de BDNF nas vias vHIP-PL e vHIP-IL e quando há redução da expressão de BDNF pelos neurônios do vHIP, a extinção é prejudicada (ROSAS-VIDAL et al., 2018).

Portanto mais estudos são necessários para compreender como estas mudanças morfológicas e mecanismos de plasticidade podem estar envolvidos com a expressão da extinção e quais regiões estão envolvidas na consolidação e na persistência da extinção, afinal, com o passar do tempo a expressão da memória extinção passa a depender de outras regiões que recebem projeções do IL como, por exemplo, a amígdala, o vHIP e os núcleos do tálamo (TROYNER, BICCA & BERTOGLIO, 2018, DO-MONTE et al., 2015). É possível que essas regiões que recebem projeções do IL durante a consolidação da extinção também apresentem mudanças morfológicas devido o aumento da sinalização de BDNF no IL.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados encontrados neste trabalho estão ilustrados na figura 13. Em resumo, nossos achados apontam que o ROF, administrado na fase tardia da consolidação da memória de extinção, é capaz de melhorar a persistência da extinção. Efeito dependente da atividade do córtex IL e da atividade da PKA. Além disso, mostramos que a administração sistêmica de ROF na fase tardia da consolidação foi capaz de aumentar a expressão de BDNF no córtex IL, mas sem alterar a expressão dos marcadores de plasticidade sináptica sinaptofisina e PSD95.

Adicionalmente, relatamos que assim como a memória de medo, a memória de extinção também apresenta mecanismos tardios de síntese protéica para a sua manutenção. Mostramos também que a PKA apresenta um papel fundamental nessa modulação, pois, ao se inibir a PKA com H89, houve a reversão do efeito observado por ROF. Além disso, mostramos que o tratamento com ROF aumentou a expressão de BDNF no IL 11 dias depois da extinção. Estes dados sugerem que há uma mudança funcional do CREB durante o processo de consolidação, pois a inibição de FDE-4 apresenta um efeito específico na fase tardia da consolidação. Contudo, estudos adicionais, são necessários para avaliar qual é efetivamente a participação do CREB na manutenção da extinção. Principalmente porque, avaliamos em nosso trabalho sinalizadores anteriores e posteriores ao CREB, mas não o CREB efetivamente.

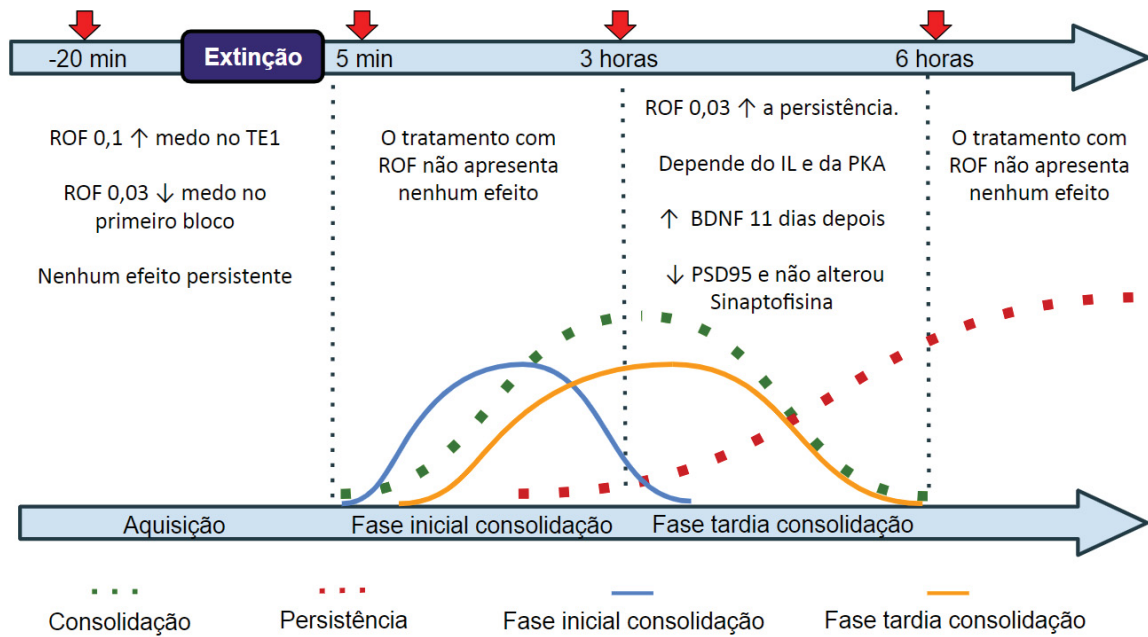


Figura 13. Os efeitos do ROF na extinção. As setas vermelhas indicam a administração de ROF. Na fase inicial há aumento de proteínas que participam da melhora da transmissão do sinal, enquanto na fase tardia, há maior expressão de proteínas envolvidas no modelamento sináptico. A administração de ROF 20 min antes da extinção não apresentou efeitos persistentes. Na consolidação, os efeitos do ROF são limitados à fase tardia da consolidação. Na fase inicial e no fim da janela de consolidação, o ROF não apresentou nenhum efeito.

O ROF é uma droga promissora para potencialização da memória de extinção, contudo ainda são necessários estudos adicionais avaliando como ocorre a modulação da memória de medo, afinal, neste trabalho, mostramos que o efeito do ROF é intimamente relacionado com a dose e o tempo de administração do fármaco. Um ponto importante de ressaltar para os estudos com o ROF é a sua segurança terapêutica, visto que já é aprovado para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica.

Este trabalho também levantou indagações importantes no que diz respeito aos mecanismos associados ao efeito do ROF, como exemplo, a participação da inibição da FDE-4 em outras regiões encefálicas associadas à formação, consolidação e persistência da extinção. Neste sentido, é possível também que o ROF possa interferir nos mecanismos associados com a separação de padrão, função hipocampal responsável por diferenciar aprendizados semelhantes, em que estudos mostram uma relação do aprendizado da extinção com os mecanismos de separação de padrão (BENEVENTO et al, 2017; BURGER et al, 2019).

Um ponto evidenciado neste trabalho é a observação em longo prazo das interferências farmacológicas na extinção, visto que, poucos trabalhos observam o comportamento dos animais dias após a extinção e o tratamento. Além disso, em maioria, os trabalhos ficam limitados ao tratamento nas fases de aquisição e fases iniciais da consolidação a extinção. Contudo, nosso trabalho mostrou que a extinção também apresenta mecanismos de plasticidade tardios que são fundamentais para a sua expressão. Desta forma, explorar os mecanismos dependentes do tempo para o efeito dos fármacos é um fator que deve ser considerado ao estruturar um delineamento experimental.

Portanto, ainda são necessários outros estudos para compreender os mecanismos envolvidos com formação, consolidação e persistência da extinção, para assim, propor interferências farmacológicas capazes de amplificar este aprendizado e possivelmente melhorar a terapia de exposição prolongada. Neste cenário, o ROF é um excelente candidato para estudos futuros, reforçando que, a dose e o tempo são fundamentais para a compreensão de seu efeito.

REFERÊNCIAS

ABUMARIA, N., YIN, B., ZHANG, L., LI, X.Y., CHEN, T., DESCALZI, G., ZHAO, L., AHN, M., LUO, L., RAN, C., ZHUO, M., LIU, G. Effects of elevation of brain magnesium on fear conditioning, fear extinction, and synaptic plasticity in the infralimbic prefrontal cortex and lateral amygdala. **The Journal of Neuroscience**, 31(42):14871-81. 2011.

AKKERMAN, S., BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J. Possible overlapping time frames of acquisition and consolidation phases in object memory processes: a pharmacological approach. **Learning & Memory**, 23: 29-37. 2015.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2013). The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V). **Artmed**, 271-280.

ANDERO, R., HELDT, S.A., YE, K., LIU, X., ARMARIO, A., RESSLER, K.J. Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning. **The American Journal of Psychiatry**, 68(2):163-72. 2011.

BAILEY, C.H., KANDEL, E.R., SI, K. The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. **Neuron**, 44(1): 49-57. 2004.

BALDI, E., LORENZINI, C. A., BUCHERELLI, C. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, 81: 162-166. 2004.

BARAD, M., BOURTCHOULADZE, R., WINDER, D. G., GOLAN, H., KANDEL, E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95:15020-1502. 1998.

BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. BDNF and memory formation and storage. **The Neuroscientist**, 14(2): 147-56. 2008a.

BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., KATCHE, C., SLIPCZUK, L., ROSSATO, J.I., GOLDIN, A., IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105(7): 2711-6. 2008b

BENDER, A.T., BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, 58(3): 488-520. 2006.

BENEVENTO, M., OOMEN, C.A., HORNER, A.E., AMIRI, H., JACOBS, T., PAUWELS, C., FREGA, M., KLEEFSTRA, T., KOPANITSA, M.V., GRANT, S.G., BUSSEY, T.J., SAKSIDA, L.M., VAN DER ZEE, C.E., VAN BOKHOVEN, H., GLENNON, J.C., KASRI, N.N. Haploinsufficiency of EHMT1 improves pattern separation and increases hippocampal cell proliferation. **Scientific Reports**. 7: 40284. 2017.

BERNABEU, R., CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP/protein kinase A/CREB-P signalling pathway in memory consolidation of an avoidance task in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30(8): 961-5. 1997.

BERNIER, B. E., LACAGNINA, A. F., AYOUB, A., SHUE, F., ZEMELMAN, B. V., KRASNE, F. B., DREW, M. R. Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction. **The Journal of Neuroscience**, 37: 6359-6371. 2017.

BERRY, K.P., NEDIVI, E. Spine Dynamics: Are They All the Same?. **Neuron**, 96(1): 43-55. 2017.

BLANCHARD, R. J., BLANCHARD, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 68: 129-135. 1969.

BLOKLAND, A., DUINEN, M. A. V., SAMBETH, A., HECKMANA, P. R. A., LAHU M. T. G., UZ, T., PRICKAERTS, J. Acute treatment with the PDE4 inhibitor roflumilast improves verbal word memory in healthy old individuals: a double-blind placebo-controlled study. **Neurobiology Aging**, 77:37-43. 2019.

BLOODGOOD, D. W., SUGAM J. A., HOLMES, A., KASH T. L. Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. **Translational Psychiatry**. 8: 60. DOI 10.1038/s41398-018-0106-x. 2018.

BOLLEN, E., PUZZO, D., RUTTEN, K., PRIVITERA, L., DE VRY, J., VANMIERLO, T., KENIS, G., PALMERI, A., D'HOOGHE, R., BALSCHUN, D., STEINBUSCH, H.M., BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J. Improved long-term memory via enhancing

cGMP-PKG signaling requires cAMP-PKA signaling.
Neuropsychopharmacology, 39(11):2497-505. 2014.

BOSWELL-SMITH, V., CAZZOLA, M., PAGE, C. P. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline?. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 117: 1237-1243. 2006.

BOURTCHOULADZE, R., ABEL, T., BERMAN, N., GORDON, R., LAPIDUS, K., KANDEL, E.R. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. **Learning & Memory**, 5(4-5): 365-74. 1998.

BOUTON, M. E., MOODY, E. W. Memory processes in classical conditioning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 28(7):663-674. 2004.

BOUTON, M.E. Context and behavioral processes in extinction. **Learning & Memory**, 11(5): 485-94. 2004.

BOUTON, M.E., WESTBROOK, R.F., CORCORAN, K.A., MAREN, S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. **Biological Psychiatry**, 60(4): 352-60. 2006.

BOWLER, R.M., ADAMS, S.W., GOCHEVA, V.V., LI, J., MERGLER, D., BRACKBILL, R., CONE, J.E. Posttraumatic Stress Disorder, Gender, and Risk Factors: World Trade Center Tower Survivors 10 to 11 Years After the September 11, 2001 Attacks. *Journal of Trauma Stress*, 30(6):564-570.

BRANDÃO, M.L., ZANOVELI, J. M., RUIZ-MARTINEZ, R.C., OLIVEIRA, L.C., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. **Behavioral Brain Research**, 188: 1-13. 2008.

BRESLAU, N., DAVIS, G.C., ANDRESKI, P., PETERSON, E. Traumatic events and posttraumatic stress disorder in an urban population of young adults. **Archives of General Psychiatry**, 48(3): 216-22. 1991.

BRIAND, L. A., VASSOLER, F. M., PIERCE, R. C., VALENTINO, R. J., BLENDY, J. A. Ventral tegmental afferents in stress-induced reinstatement: the role of cAMP response element-binding protein. **The Journal of Neuroscience**, 30: 16149-16159. 2010

BURGER, A.M., VAN DIEST, I., VAN DER DOES, W., KORBEE, J.N., WAZIRI, N., BROSSCHOT, J.F., VERKUIL, B. The effect of transcutaneous vagus nerve stimulation on fear generalization and subsequent fear extinction. **Neurobiology of Learning and Memory**. 161: 192-201. 2019.

CAREAGA, M.B.L., GIRARDI, C.E.N., SUCHECKI, D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, 71: 48-57. 2016.

CHAI, N., LIU, J. F., XUE, Y. E., YANG, C., YAN, W., WANG, H. M., LUO, X. Y., SHI, H. S., WANG, J. S., BAO, Y. P., MENG, S. Q., DING, Z. B., WANG, X. Y., LU, L. Delayed noradrenergic activation in the dorsal hippocampus promotes the long-term persistence of extinguished fear. **Neuropsychopharmacology**, 39: 1933-1945. 2014.

CHANG, C.H., MAREN, S. Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. **Behavioral Neuroscience**, 124(3): 391-7. 2010.

CHATTWAL, J. P., STANEK-RATTINER, L., DAVIS, M., RESSLER, K. J. Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. **Nature Neuroscience**, 9:870–872. 2006.

CORCHES, A., HIROTO, A., BAILEY, T.W., SPEIGEL, J.H., PASTORE, J., MAYFORD, M., KORZUS, E. Differential fear conditioning generates prefrontal neural ensembles of safety signals. **Behavioral Brain Research**. 360: 169-184. 2019.

CORCORAN, K. A., QUIRK, G. J. Recalling safety: cooperative functions of the ventromedial prefrontal cortex and the hippocampus in extinction. **CNS Spectrums**. 12(3): 200-6. 2007.

CREAMER, M., BURGESS, P., MCFARLANE, A.C. Post-traumatic stress disorder: findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well-being. **Psychological medicine**, 31(7):1237-47. 2001.

DA SILVA, T. R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J., ANDREATINI, R., STERN, C. A. J. Evidence for an expanded time-window to mitigate a reactivated fear memory by tamoxifen. **European Neuropsychopharmacology**, 26: 1601-1609. 2016.

DAVIES, S.P., REDDY, H., CAIVANO, M., COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochemical Journal**, 351: 95-105. 2000.

DO-MONTE, F. H., MANZANO-NIEVES, G., QUIÑONES-LARACUENTE, K., RAMOS-MEDINA, L., QUIRK, G. J. Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. **The Journal of Neuroscience**, 35: 3607-3615. 2015.

DUNSMOOR, E., PAZ, R. Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. **Biological Psychiatry**, 78: 336-343. 2015.

DUVARCI, S., PARE, D. Amygdala microcircuits controlling learned fear. **Neuron**, 82(5): 966-80. 2014.

ETKIN, A., WAGER, T.D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **The American Journal of Psychiatry**, 164(10): 1476-88. 2007.

FANSELOW, M.S. From contextual fear to a dynamic view of memory systems. **Trends Cognitive Science**, 14: 7-15. 2010.

FINKBEINER, S., TAVAZOIE, S.F., MALORATSKY, A., JACOBS, K.M., HARRIS, K.M., GREENBERG, M.E. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. **Neuron**, 19(5): 1031-47. 1997.

FITZGERALD, P.J., PINARD, C.R., CAMP, M.C., FEYDER, M., SAH, A., BERGSTROM, H.C., GRAYBEAL, C., LIU, Y., SCHLÜTER, O.M., GRANT, S.G., SINGEWALD, N., XU, W., HOLMES, A. Durable fear memories require PSD95. **Molecular Psychiatry**, 20(7): 901-12. 2015.

FLAVELL, C.R., LAMBERT, E.A., WINTERS, B.D., BREDY, T.W. Mechanisms governing the reactivation-dependent destabilization of memories and their role in extinction. **Frontiers in behavioral neuroscience**, 7(214). 2013.

FLEXNER, L. B., FLEXNER, J.B., STELLAR, E. Memory and cerebral protein synthesis in mice as affected by graded amounts of puromycin. **Experimental Neurology**, 13: 264-272. 1967.

FONTANEZ-NUIN, D.E., SANTINI, E., QUIRK, G.J., PORTER, J.T. Memory for fear extinction requires mGluR5-mediated activation of infralimbic neurons. **Cerebral Cortex**, 21(3): 727-35. 2011.

GHAVAMI, A. HIRST, W. D., NOVAK, T. J. Selective Phosphodiesterase (PDE)-4 Inhibitors. **Drugs in R&D**, 7: 63-71. 2006.

GIEMBYCZ M.A., FIELD S.K. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD. **Drug Design, Development and Therapy**, 4:147-58. 2010.

GIESE, K.P., MIZUNO, K. The roles of protein kinases in learning and memory. **Learning & Memory**, 20(10): 540-52. 2013.

GOOSSENS, L., SUNAERT, S., PEETERS, R., GRIEZ, E.J., SCHRUIERS, K.R. Amygdala hyperfunction in phobic fear normalizes after exposure. **Biological Psychiatry**, 62(10): 1119-25.

GREEN, C.R., CORSI-TRAVALI, .S., NEUMEISTER, A. The Role of BDNF-TrkB Signaling in the Pathogenesis of PTSD. **Journal of Depression & Anxiety**, S4:006. 2013

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, 294(5544):1024-30. 2001.

HALPIN, D.M. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, 3(4): 543-61. 2008.

HANSEN, R. T., CONTI, M. ZHANG, H. T. Mice deficient in phosphodiesterase-4A display anxiogenic-like behavior. **Psychopharmacology**, 231: 2941-2954. 2014.

HASCOET, M. BOURIN, M. (2009) The mouse light-dark box test. Mood and Anxiety **Related Phenotypes in Mice**, 197-223.

HATZELMANN, A., MORCILLO, E. J., LUNGARELLA, G., ADNOT, S., SANJAR, S., BEUME, R., SCHUFT, C., TENOR, H. The preclinical pharmacology of roflumilast – A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 23(4): 235-256. 2010.

HAUBRICH, J., MACHADO, A., BOOS, F.Z., CRESTANI, A.P., SIERRA, R.O., ALVARES, L.O., QUILLFELDT, J.A. Enhancement of extinction memory by pharmacological and behavioral interventions targeted to its reactivation. **Scientific Reports**, 7(1):10960. 2017.

HAYES, J.P., VANELZAKKER, M.B., SHIN, L.M. Emotion and cognition interactions in PTSD: a review of neurocognitive and neuroimaging studies. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, 6: 89. 2012.

HERRY, C., FERRAGUTI, F., SINGEWALD, N., LETZKUS, J.J., EHRLICH, I., LÜTHI, A. Neuronal circuits of fear extinction. **The European Journal of Neuroscience**, 31(4): 599-612. 2010.

HOFMANN, S. G. Enhancing exposure-based therapy from a translational research perspective. **Behaviour Research and Therapy**, 45: 1987-2001. 2007.

HUGHES, K. C., SHIN, L. M. Functional neuroimaging studies of posttraumatic stress disorder. **Expert Review Neurotherapeutics**, 11: 275-85. 2011.

HYDE, J., RYAN, K.M., WATERS, A.M. Psychophysiological Markers of Fear and Anxiety. **Current Psychiatry Reports**, doi.org/10.1007/s11920-019-1036-x. 2019.

ISIEGAS, C., PARK, A., KANDEL, E. R., ABEL, T., LATTAL, K. M. Transgenic Inhibition of Neuronal Protein Kinase A Activity Facilitates Fear Extinction. **The Journal of Neuroscience**, 26: 12700-12707. 2006.

IZQUIERDO, I., FURINI, C. G. R., MYSKIW, G. C. Fear memory. **Physiological reviews**, 96: 695-750. 2016.

IZQUIERDO, I., MEDINA, JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, 68(3):285-316. 1997.

JABARIS, S. G. S. L., SUMATHY H., KUMAR, S. R., NARAYANAN, S., THANIKACHALAM S., BABU, C. S. Effects of rolipram and roflumilast, phosphodiesterase-4 inhibitors, on hypertension-induced defects in memory function in rats. **European Journal of Pharmacology**, 746: 138-147. 2015a.

JABARIS, S. G. S. L., SUMATHY, H., GIRISH, R., NARAYANAN, S., SUGUMAR, M., BABU, S. C., THANIKACHALAM, S., THANIKACHALAM, M. Phosphodiesterase-4 inhibitors ameliorates cognitive deficits in deoxycorticosterone acetate induced hypertensive rats via cAMP/CREB signaling system. **Brain Research**. 1622: 279-291. 2015b.

JINDAL, A., MAHESH, R., BHATT, S. Anxiolytic-like effect of etazolate, a type 4 phosphodiesterase inhibitor in experimental models of anxiety. **Indian Journal of Experimental Biology**, 51: 444-449. 2013.

KABIR, Z. D., KATZMAN, A. C., KOSOFSKY, B. E. Molecular mechanisms mediating a deficit in recall of fear extinction in adult mice exposed to cocaine in utero. **PLOS one**, 8: e84165. 2013.

KAMPRATH, K., WOTJAK, C.T. (2004) Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. **Learning & Memory**, 11(6): 770-86.

KANAGARATNAM, P., ASBJØRNSSEN, A.E. Executive deficits in chronic PTSD related to political violence. **Journal of Anxiety Disorders**, 21(4): 510-25. 2007.

KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. **Bioscience Reports**, 21(5): 565-611. 2001.

KATAOKA, T., FUCHIKAMI, M., NOJIMA, S., NAGASHIMA, N., ARAKI, M., OMURA, J., MIYAGI, T., OKAMOTO, Y., MORINOBU, S. Combined brain-derived neurotrophic factor with extinction training alleviate impaired fear extinction in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Genes, Brain, and behavior**, e12520. 2018.

KATCHE, C., BEKINSCHTEIN, P., SLIPCZUK, L., GOLDIN, A., IZQUIERDO, I.A., CAMMAROTA, M., MEDINA, J.H. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107(1): 349-54. 2010.

KAWAMATAWONG, T. Roles of roflumilast, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, in airway diseases. **Journal of Thoracic Disease**, 9: 1144-1154. 2017.

KELLY, M.T., CRARY, J.F. AND SACKTOR, T.C. Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, 27(13): 3439-3444. 2007.

KESSLER, R.C., SONNEGA, A., BROMET, E., HUGHES, M., NELSON, C.B. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, 52(12):1048-60. 1995.

KIDA, S. Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. **Psychopharmacology**, 236(1): 49-57. 2019.

KING, G., BAKER, K. D., BISBY, M. A., CHAN, D., COWAN, C. S. M., STYLIANAKIS, A. A., ZIMMERMANN, K. S., RICHARDSON, R. Precision medicine approach to pharmacological adjuncts to extinction: a call to broaden research. **Psychopharmacology**, 236: 143-161. 2019.

KLAVIR, O., GENUD-GABAI, R., PAZ, R. Low-frequency stimulation depresses the primate anterior-cingulate-cortex and prevents spontaneous recovery of aversive memories. **The Journal of Neuroscience**, 32(25):8589-97. 2012.

KNOTT, E.P., ASSI, M., RAO, S.N., GHOSH, M., PEARSE, D.D. Phosphodiesterase Inhibitors as a Therapeutic Approach to Neuroprotection and Repair. **International Journal of Molecular Neurosciences**, 18(4). pii: E696. 2017.

KOENIGS, M., GRAFMAN, J. Posttraumatic stress disorder: the role of medial prefrontal cortex and amygdala. **The Neuroscientist**, 15(5): 540-8. 2009.

LAKICS, V., KARRAN, E. H., BOESS, F. G. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. **Neuropharmacology**, 59: 367-374. 2010.

LAURENT, V., WESTBROOK, R.F. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. **Learning & Memory**, 16(9): 520-9. 2009.

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

LEE, S., KIM, S.J., KWON, O.B., LEE, J.H., KIM, J.H. Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. **Frontiers in Neural Circuits**, 7:129. 2013.

LI, L.P., DUSTRUDE, E.T., HAULCOMB, M.M., ABREU, A.R., FITZ, S.D., JOHNSON, P.L., THAKUR, G.A., MOLOSH, A.I., LAI, Y., SHEKHAR, A. PSD95 and nNOS interaction as a novel molecular target to modulate conditioned fear: relevance to PTSD. **Translational Psychiatry**. 8(1): 155. 2018

LI, Y. F., HUANG, Y., AMSDELL, S. L., XIAO, L., O'DONNELL, J., ZHANG H. T. Antidepressant- and Anxiolytic-like Effects of the Phosphodiesterase-4 Inhibitor Rolipram on Behavior Depend on Cyclic AMP Response Element Binding Protein-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, 34: 2404-2419. 2009.

LIKHTIK, E., STUJENSKE, J.M., TOPIWALA, M.A., HARRIS, A.Z., GORDON, J.A. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nature Neuroscience**, 17(1): 106-13. 2014.

LINGAWI, N. W., LAURENT, V., WESTBROOK, R. F., HOLMES, N. M. The role of the basolateral amygdala and infralimbic cortex in (re)learning extinction. **Psychopharmacology**, 236: 303-312. 2019.

LISBOA, S.F., VILA-VERDE, C., ROSA, J., ULIANA, D.L., STERN, C.A.J., BERTOGLIO, L.J., RESSEL L.B., GUIMARAES F.S. Tempering aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. **Psychopharmacology**. 236:201–226. 2019.

LUCHKINA, N. V., BOLSHAKOV, V. Y. Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity–fear memory connection. **Psychopharmacology**, 236: 163-182. 2019.

MAMIYA, N., FUKUSHIMA H., SUZUKI, A., MATSUYAMA, Z., HOMMA, S., FRANKLAND, P. W., KIDA, S. Brain Region-Specific Gene Expression Activation Required for Reconsolidation and Extinction of Contextual Fear Memory. **The Journal of Neuroscience**, 29: 402-413. 2009.

MCGAUGH J. L. Memory-a century of consolidation. **Science**, 287:248-25. 2000.

MCGIRR, A., LIPINA, T. V., MUN, H. S., GEORGIU, J., AL-AMRI, A.H., NG E., ZHAI, D., ELLIOTT, C., CAMERON, R.T., MULLINS, J. G. L., LIU, F., BAILLIE, G. S., CLAPCOTE, S. J., RODER, J. C. Specific Inhibition of Phosphodiesterase-4B Results in Anxiolysis and Facilitates Memory Acquisition. **Neuropsychopharmacology**, 41: 1080-1092. 2016.

MEI, F., NAGAPPAN, G., KE, Y., SACKTOR, T.C., LU, B. BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKM ζ . **PLoS One**, 6(6):e21568. 2011.

MICHOPOULOS, V., NORRHOLM, S. D., JOVANOVIC, T. (2015). Diagnostic Biomarkers for Posttraumatic Stress Disorder: Promising Horizons from Translational Neuroscience Research. **Biological Psychiatry**, 78: 344-53.

MIDDEI, S., HOUELAND, G., CAVALLUCCI, V., AMMASSARI-TEULE, M., D'AMELIO, M., MARIE, H. CREB is necessary for synaptic maintenance and learning-induced changes of the AMPA receptor GluA1 subunit. **Hippocampus**, 23(6): 488-99. 2013.

MILAD, M.R., QUIRK, Q. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, 420: 70-74. 2002.

MILAD, M.R., QUIRK, G.J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. 63:129-51. **Annual Review of Psychology**, 63: 129-51. 2012.

MONFILS, M.H., COWANSAGE, K. K., KLANN, E., LE DOUX, J. E. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. **Science**, 324: 951-955. 2009.

MONTI, B., BERTEOTTI, C., CONTESTABILE, A. Subchronic Risperidone Delivery Activates Hippocampal CREB and Arc, Enhances Retention and Slows Down Extinction of Conditioned Fear. **Neuropsychopharmacology**, 31: 278-286. 2006.

MORRISON F. G., RESSLER, K. G. From the neurobiology of extinction to improved clinical treatments. **Depression & Anxiety**, 31: 279-290. 2014.

MUELLER, D., PORTER, J. T., QUIRK, G. J. Noradrenergic Signaling in Infralimbic Cortex Increases Cell Excitability and Strengthens Memory for Fear Extinction. **The Journal of Neuroscience**, 28: 369-375.

MULLER, E. M., HOFMANN, S. G., CHERRY, J. A. The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram disturbs expression and extinction of conditioned fear in mice. **Neuropharmacology**, 59: 1-8. 2010.

MYERS, K.M., DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular psychiatry**, 12: 120-150. 2007

NEVE, K.A. Novel features of G protein-coupled receptor kinase 4. **Molecular Pharmacology**, 69(3): 673-6. 2004.

O'DELL, T.J., CONNOR, S.A., GELINAS, J.N., NGUYEN, P.V. Viagra for your synapses: Enhancement of hippocampal long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors. **Cellular Signalling**, 22(5):728-36. 2010.

OLFF, M., KOCH, S.B., NAWIJN, L., FRIJLING, J.L., VAN ZUIDEN, M., VELTMAN, D.J. Social support, oxytocin, and PTSD. **European Journal of Psychotraumatology**, 5: 26513. 2014.

ORSINI, C.A., MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 36(7): 1773-802. 2012.

PAGE, C.P., SPINA, D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, 12(3): 275-86. 2012.

PAREDES, D., MORILAK, D. A Rodent Model of Exposure Therapy: The Use of Fear Extinction as a Therapeutic Intervention for PTSD. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 13: 46. 2019.

PAVLOV, I. P. (1927). *Conditioned Reflexes*. London: Oxford University Press.

PAXINOS, G., WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact sixth ed. Academic Press, San Diego. 2009.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E., BRILEY. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **The Journal of Neuroscience Methods**, 14(3): 149-167. 1985.

PENG, P., SUN, H., ZHANG, X., LIU, G., WANG, G. Effects of Selective Phosphodiesterases-4 Inhibitors on Learning and Memory: A Review of Recent Research. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 70: 83-85. 2014.

PÉREZ-TORRES, S., MIRÓ, X., PALACIOS, J. M., CORTÉS, R., PUIGDOMÉNECH, P., MENGOD G. Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and [³H]rolipram binding autoradiography: Comparison with monkey and rat brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 20: 349-374. 2000

PETERS, J., DIEPPA-PEREA, L.M., MELENDEZ, L.M., QUIRK, G.J. Induction of Fear Extinction with Hippocampal-Infralimbic BDNF. **Science**. 328: 1288-1290. 2010

PHELPS, E.A., DELGADO, M.R., NEARING, K.I., LEDOUX, J.E. Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. **Neuron**, 43(6): 897-905. 2004.

PLENDL, W., WOTJAK, C. T. (2010) Dissociation of within- and between-Session Extinction of Conditioned Fear. **The Journal of Neuroscience**, 30: 4990-4998.

POPOVA, D., ÁGÚSTSDÓTTIR, A., LINDHOLM, J., MAZULIS, U., AKAMINE, Y., CASTRÉN, E., KARPOVA, N.N. Combination of fluoxetine and extinction treatments forms a unique synaptic protein profile that correlates with long-term fear reduction in adult mice. **European Neuropsychopharmacology**, 24(7): 1162-74. 2014.

POPPE, H., RYBALKIN, S.D., REHMANN, H., HINDS, T.R., TANG, X.B., CHRISTENSEN, A.E., SCHWEDE, F., GENIESER, H.G., BOS, J.L.,

DOSKELAND, S.O., BEAVO, J.A., BUTT, E. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. **Nature Methods**, 5(4):277-8. 2008.

QUIRK, G.J., RUSSO, G.K., BARRON, J.L., LEBRON, K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. **The Journal of Neuroscience**, 20(16): 6225-31. 2000.

RADISKE, A., ROSSATO, J.I., KÖHLER, C.A., GONZALEZ, M.C., MEDINA, J.H., CAMMAROTA, M. Requirement for BDNF in the reconsolidation of fear extinction. **The Journal of Neuroscience**, 35(16): 6570-4. 2015.

RENEERKENS, O. A. H., RUTTEN, K., STEINBUSCH, H. W. M., BLOKLAND. A., PRICKAERTS, J. (2009) Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. **Psychopharmacology**, 202: 419-443.

RESCORLA, R.A. Are associative changes in acquisition and extinction negatively accelerated?. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, 27(4): 307-15. 2001.

RESCORLA, R.A. Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. **Learning & Behavior**, 32(4):401-8. 2004.

RESCORLA, R.A., HETH, C.D. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, 1(1): 88-96. 1975.

RESNICK, H.S., KILPATRICK, D.G., DANSKY, B.S., SAUNDERS, B.E., BEST, C.L. Prevalence of civilian trauma and posttraumatic stress disorder in a representative national sample of women. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, 61(6):984-91. 1993.

ROBERTSON, E.M. New Insights in Human Memory Interference and Consolidation. **Current Biology**, 22: R66-R71. 2012.

ROESLER, R., RELON G. K., MAURMANN, N., SCHWARTSMANN, G., SCHRÖDER, N., AMARAL, O. B., VALVASSORI, S., QUEVEDO, J. A phosphodiesterase 4-controlled switch between memory extinction and strengthening in the hippocampus. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 8(91):1-8. 2014.

ROSAS-VIDAL, L.E., LOZADA-MIRANDA, V., CANTRES-ROSARIO, Y., VEGA-MEDINA, A., MELENDEZ, L., QUIRK, G.J. Alteration of BDNF in the medial prefrontal cortex and the ventral hippocampus impairs extinction of avoidance. **Neuropsychopharmacology**, 43(13): 2636-2644. 2018.

RUSSO, A. S., LEE, J., PARSONS, R. G. Individual variability in the recall of fear extinction is associated with phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in the infralimbic cortex. **Psychopharmacology**, <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05195-2>. 2019.

RUTTEN, K., PRICKAERTS, J., HENDRIX, M., F. VAN DER STAAY, J., ŞIK, A. BLOKLAND, A. Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: Studies using selective phosphodiesterase type 2, 4 and 5 inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, 558: 107-112. 2007.

SACKTOR, T.C., HELL, J.W. The genetics of PKM ζ and memory maintenance. **Science Signaling**, 10(505). pii: eaao2327. 2017.

SANFORD, M. Roflumilast In Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Adis Drug Profile**, 70: 1615-1627. 2010.

SANTINI, E., SEPULVEDA-ORENGO, M., PORTER, J.T. Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, 37(9): 2047-56. 2012.

SHARMA, S., KUMAR, K., DESHMUKH, R., SHARMA, P.L. Phosphodiesterases: Regulators of cyclic nucleotide signals and novel molecular target for movement disorders. **European Journal of Pharmacology**, 714(1:3): 486-497. 2013.

SIERRA-MERCADO, D., PADILLA-COREANO, N., QUIRK, G.J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, 36(2): 529-38. 2011.

SINGEWALD, N., SCHMUCKERMAIR, C., WHITTLE, N., HOLMES, A., RESSLER, K.J. Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, 149: 150-190. 2015.

SOLER-CEDEÑO, O., TORRES-RODRÍGUEZ, O., BERNARD, F., MALDONADO, L., HERNÁNDEZ, A., PORTER, J.T. Plasticity of NMDA Receptors at Ventral Hippocampal Synapses in the Infralimbic Cortex Regulates Cued Fear. **eNeuro**, 6(2): 354-18. 2019.

SONG, Z., CHEN, H., XU, W., WU, S., ZHU., G. Basolateral amygdala calpain is required for extinction of contextual fear-memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 155: 180-188. 2018.

SOTRES-BAYON, F., BUSH, D.E., LEDOUX, J.E. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. **Learning & Memory**, 11(5): 525-35. 2004.

SOTRES-BAYON, F., QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: More than just extinction. **Current opinion in neurobiology**, 20: 231-235. 2010.

STERN C. A. J., GAZARINI, L., VANVOSSSEN, A. C., ZUARDI, A. W., ROPERH I. G., GUIMARÃES, F.S., TAKAHASHI, R.N., BERTOGLIO, L.J. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. **European Neuropsychopharmacology**, 25: 958-965. 2015.

STERN, C. A. J., DA SILVA, T. R., RAYMUNDI, A. M., DE SOUZA, C. P., HIROAKI-SATO, V. A. KATO, L., GUIMARÃES, F. S. ANDREATINI, R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. **Neuropharmacology**, 125: 220-230. 2017.

- STERN, C. A. J., GAZARINI, L., TAKAHASHI, R. L., GUIMARÃES, F. S., BERTOGLIO, L. J. On Disruption of Fear Memory by Reconsolidation Blockade: Evidence from Cannabidiol Treatment. **Neuropsychopharmacology**, 37: 2132–2142. 2012.
- STERN, C.A., DO-MONTE, F.H., GAZARINI, L., CAROBREZ, A.P., BERTOGLIO, L.J. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, 170(1): 214-22. 2010.
- STOJEK, M. M., MCSWEENEY L. B., RAUCH S. A. M. Neuroscience Informed Prolonged Exposure Practice: Increasing Efficiency and Efficacy Through Mechanisms. **Frontiers Behavioral in Neuroscience**. 12(281): 1-12. 2018.
- SUN, W., LI, X., AN, L. Distinct roles of prelimbic and infralimbic proBDNF in extinction of conditioned fear. **Neuropharmacology**, 131: 11-19. 2018.
- TAKANO, A., UZ, T., GARCIA-SEGOVIA, J., TSAI, M., LAHU, G., AMINI, N., NAKAO, R., JIA, Z., HALLDIN, C. A nonhuman primate PET study: measurement of brain PDE4 occupancy by roflumilast using (R)-[(11)C]rolipram. **Molecular Imaging and Biology**. 20: 615-622. 2018.
- TROYNER, F., BICCA, M.A., BERTOGLIO, L.J. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. **Hippocampus**, 28(8): 602-616. 2018.
- VAN DUINEN, M. A., SAMBETH, A., HECKMAN, P. R. A., SMIT, S., TSAI, M., LAHU, G., UZ, T., BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J. Acute administration of roflumilast enhances immediate recall of verbal word memory in healthy young adults. **Neuropharmacology**, 131: 31-38. 2018.
- VANMIERLO, T., CREEMERS, P., AKKERMAN, S., VAN DUINEN, M., SAMBETH, A., DE VRYA J., UZ, T., BLOKLAND, A. J., PRICKAERTS, J. The PDE4 inhibitor roflumilast improves memory in rodents at non-emetic doses. **Behavioural Brain Research**, 303: 23-33. 2016.
- VIDAL-GONZALEZ, I., VIDAL-GONZALEZ, B., RAUCH, S.L., QUIRK, G.J. (2006) Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learning & Memory**, 13(6): 728-33.
- WALF, A. A., FRYE, C. A. The use of elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, 2(2): 322-328. 2007.
- WANG, B., JIN, X., KUANG, X., TIAN, S. Chronic administration of parecoxib exerts anxiolytic-like and memory enhancing effects and modulates synaptophysin expression in mice. **BMC Anesthesiology**, 17: 152. 2017.
- WEDZICHA, J. A., CALVERLEY, P. M. A., RABE, K. F. Roflumilast: a review of its use in the treatment of COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, 11: 81-90. 2016.
- WOOD, M., ADIL, O., WALLACE, T., FOURMAN, S., WILSON, S.P., HERMAN, J.P., MYERS, B. Infralimbic prefrontal cortex structural and functional connectivity with the limbic forebrain: a combined viral genetic and optogenetic analysis. **Brain Structure and Function**, 224(1): 73-97. 2019.

WOTJAK, C.T. Sound check, stage design and screen plot - how to increase the comparability of fear conditioning and fear extinction experiments. **Psychopharmacology**, 236(1): 33-48. 2019.

WU, X., ZHANG, J.T., LIU, J., YANG, S., CHEN, T., CHEN, J.G., WANG, F. Calcitonin gene-related peptide erases the fear memory and facilitates long-term potentiation in the central nucleus of the amygdala in rats. **Journal of Neurochemistry**, 135(4): 787-798. 2015.

XIE, M.J., ISHIKAWA, Y., YAGI, H., IGUCHI, T., OKA, Y., KURODA, K., IWATA, K., KIYONARI, H., MATSUDA, S., MATSUZAKI, H., YUZAKI, M., FUKAZAWA, Y., SATO, M. PIP3-Phldb2 is crucial for LTP regulating synaptic NMDA and AMPA receptor density and PSD95 turnover. **Scientific Reports**, 9(1): 4305. 2019.