

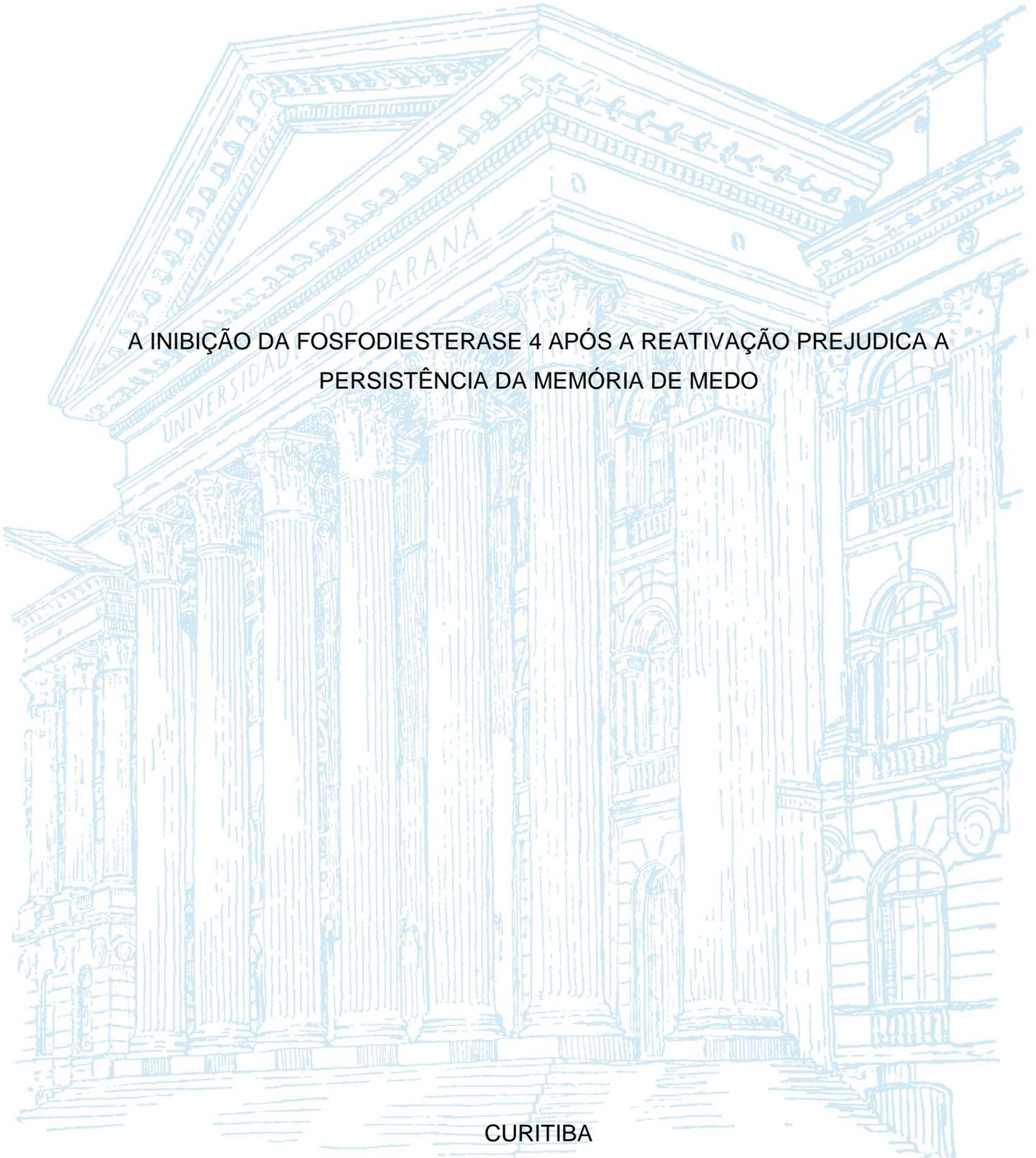
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUZEN TORTATO FURTADO DE SOUZA

A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 4 APÓS A REATIVAÇÃO PREJUDICA A
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO

CURITIBA

2019



SUZEN TORTATO FURTADO DE SOUZA

A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 4 APÓS A REATIVAÇÃO PREJUDICA A
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Aparecida Jark Stern

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

SUZEN TORTATO FURTADO DE SOUZA

A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 4 APÓS A REATIVAÇÃO PREJUDICA A
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de graduação em biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em biomedicina.

Prof.^a Dr.^a / Msc. Cristina Aparecida Jark Stern
Orientador(a) – Departamento de Farmacologia, UFPR

Prof.^a Dr.^a / Msc. Janaína Menezes Zanovelli
Departamento de Farmacologia, UFPR

Prof. Dr. / Msc. Roberto Andreatini
Departamento de Farmacologia, UFPR

Curitiba, 09 de dezembro de 2019.

À luz, direção e estrutura da minha vida: minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Silméri Oberg Tortato Tiburtius, pela paciência, amor, cuidado, carinho, dedicação e por todo investimento (financeiro, moral e sentimental). Por ter dado tudo o que pôde de si para garantir tudo o que eu tenho e tudo o que eu sou, pedindo em troca apenas para que eu fosse bem-sucedida nos estudos. Por, certas vezes, ter acreditado mais em mim do que eu mesma e, principalmente, por ser abrigo nos dias de tempestade e parque nos dias de sol.

À minha avó, Silma Oberg Tortato, por me aguentar nos picos de estresse da faculdade e por cuidar de mim mesmo quando eu não quis cuidados.

À minha avó, Antônia Beraldo de Souza, pelas orações e por sempre torcer por mim.

Ao meu avô materno, Alvino Carbonar Tortato (*in memoriam*), por ter sido um bom exemplo e pelo pouco e significativo tempo que passamos juntos.

Ao meu avô paterno, Luiz Furtado de Souza (*in memoriam*), pelos conselhos de avô, pelo incentivo ao trabalho, pela honradez e por sentir orgulho de quem eu sou e de quem eu me tornei.

Ao meu irmão, Saulo Tiburtius, pelos serviços de professor particular, banco 24 horas, táxi, *delivery* de materiais da faculdade, por pagar alguns cafés da manhã e pelos conselhos de irmão mais velho que me ajudaram muito ao longo da minha trajetória.

À minha irmã de coração, Geovana Marcela Vicente, pela delicadeza, bondade e também por nunca se esquecer de mim.

Às minhas irmãs, Beatriz Furtado de Souza e Isadora Furtado de Souza, por me amarem e saberem que o que eu sinto por elas é muito forte e me impulsiona a querer ser sempre exemplo.

Aos demais familiares, em especial tios e primos que ficaram felizes com o meu ingresso na Biomedicina e torceram por mim.

Ao meu namorado, amigo e parceiro de “crimes lícitos”, Sérgio da Costa Lins Junior, por colorir uma vida que estava cinza, pela bondade, por ter um coração de porta aberta que permite o meu livre trânsito sempre com liberdade, lealdade, honestidade, amizade e fidelidade. Pelo espaço e respeito à minha individualidade, pelos conselhos, puxões de orelha, por sempre me apoiar e ter me trazido felicidade

quando eu mais precisei, além de sempre me impulsionar a crescer tanto no âmbito sentimental, quanto no profissional.

Ao meu amigo de infância e irmão de outra mãe, Yago Metring Francalacci Espínola Gravina, por toda a alegria que emitiu especialmente nas vezes em que eu já estava saturada.

À minha também amiga de infância e também irmã de outra mãe, Giulia Cristina de Souza, por sempre se preocupar comigo e nunca deixar de pensar em mim, mesmo com mil e uma coisas acontecendo nas nossas vidas que impossibilitassem o contato.

À Leila An An Sun Deng, uma das melhores pessoas que já conheci, por ser um exemplo de esforço, sucesso e dedicação. Pela amizade verdadeira, carinho, por me aceitar do jeito que eu sou e nunca se esquecer de mim, independentemente do tempo ou distância.

À Yu por ser exclusivamente a Yu e nunca me esquecer. Pelos encontros aleatórios no biológicas ou no ônibus e por partilhar conversas ainda mais aleatórias sobre matérias afins dos nossos cursos.

Aos meus amigos de faculdade, Caio Henrique Agostini de Sá, pelo companheirismo, parceria, sinceridade e puxões de orelha quando precisei; Gabriel Pereira, pelas piadas secas, comentários sempre válidos e oportunos, por ter me abraçado quando precisei e por ser um bom modelo profissional a se seguir; Guilherme Augusto Rossato, por ser símbolo de resistência e superação, por ser um bom amigo e uma excelente pessoa; Luan Leone Barros Costa, pela maneira leve e engraçada de lidar com as coisas da vida, pelos comentários filosóficos estranhos que, de alguma maneira ou outra, me fizeram pensar e repensar sobre muitas coisas que influenciaram decisões importantes; Pedro Luis Beloni Ferreira, por ter sido um bom parceiro de trabalhos acadêmicos, em especial o primeiro, que nos trouxe risadas e boas memórias, por ser uma pessoa doce, empática, compreensiva e que transmite muita calma; Rodrigo Beckmann Marques, por me suportar conversando ininterruptamente em meios de transporte desde 2015 e não cometer homicídio, por ter sido uma pessoa humana quando eu mais precisei, pela paciência, bondade e por ser exemplo de organização e foco; e, Sofia Tomaselli Arioni, por ser a amiga mais "parça" que eu tive, transmitir boas energias e pelo espírito de "alma leve" que torna as coisas mais fáceis e alegres.

À Profª Drª Débora do Rocio Klisiovicz, por ser empática, humana e ver o aluno como uma pessoa ao todo e enxergar potencial em cada um deles; por me cativar a ser docente passando todo o seu amor pela profissão.

Ao Profº Drº Marcelo de Meira Santos Lima pela chance que me deu em iniciar na área das neurociências. Por toda a ajuda que os seus alunos e meus ex-colegas de trabalho me proporcionaram, em especial, a Jéssica Ilkiw Lopes e Patrícia dos Santos, por toda a paciência, dedicação e disponibilidade que tiveram em me guiar nos trabalhos que apresentei.

À Profª Drª Cristina Aparecida Jark Stern, minha “mãe de laboratório”, por ter me aceitado como sua orientanda, por ver o meu potencial, por ser uma orientadora presente e me dar a chance de aprender, possibilitando, a partir da sua linha de pesquisa e pelo seu modo de orientar, o meu crescimento tanto como profissional, tanto como pessoa.

Ao Jeferson Machado Batista Sohn, meu “irmão mais velho de laboratório”, que, com todos os “puxões de orelha”, me fez crescer como profissional e como pessoa. Agradeço muito os *feedbacks*, as palavras de incentivo, e, principalmente, de alguma forma, por enxergar e mostrar para mim todo o meu potencial, me ajudando bastante. Cada palavra dita, mesmo que às vezes ríspida, serviu de aprendizado e será algo que eu levarei comigo pelo resto da minha vida, pra qualquer coisa.

À Ana Maria Raymundi, por ser um amor de pessoa e me ajudar nos experimentos quando eu precisei, mesmo, muitas vezes, eu não pedindo.

À Thaís por ter sido uma boa companhia nos experimentos e ter me ajudado muito a fazê-los quando eu mais precisei.

À Mariana cuja ajuda foi essencial para a prática de alguns experimentos.

Aos demais colegas de laboratório que sempre são muito gentis, solícitos e legais.

À Profª Drª Janaína Zanovelli por ter me acolhido, entendido e aconselhado quando eu precisei. Também a agradeço por aceitar participar da banca para o meu TCC II.

Ao Profº Drº Roberto Andreatini, por ter sempre se mostrado solícito nas disciplinas que ministrou e por ter aceitado o convite para ser a minha banca do TCC II.

À Dra. Lauriete, que ajudou a segurar todo o fardo da graduação, me reorganizou e me reestruturou. Por ela me mostrar que eu sou muito mais do que eu pensava ser, me ajudando com o autoconhecimento e a lidar com as minhas limitações.

Ao Dr. Alessandro, por ter dado um dos melhores conselhos que já ouvi e por me mostrar que alguns fármacos, apesar de auxiliarem com o reequilíbrio neuroquímico cerebral, não agem como deuses miraculosos capazes de nos reestruturar quando nos deixamos em dívida conosco mesmo.

Àqueles que dedicam a vida (ou parte dela) a estudar alternativas para melhorar a qualidade de vida humana.

E, por último, a todos aqueles que me ajudaram em algum momento da graduação, mas que, por qualquer motivo – seja afastamento, pouco contato ou distância – torceram por mim e me apoiaram, garantindo o meu crescimento.

*“Buscas ouro nativo entre a ganga da vida.
Que esperança infinita
no ilusório trabalho...
Para cada pepita,
quanto cascalho!” (Helena Kolody)*

RESUMO

O roflumilaste (ROF) é um inibidor seletivo da fosfodiesterase 4 (PDE4) que potencializa a via de sinalização intracelular que envolve o AMPc, segundo mensageiro importante para a consolidação da memória de medo, a qual é o componente central do estopim para o desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Sabendo que a consolidação e a reconsolidação partilham vias comuns, mas são processos distintos, e que a reconsolidação é um alvo para o TEPT, já que esta é um processo de reestabilização de uma memória que pode ter sofrido modificação, faz-se necessário entender o efeito da inibição da fosfodiesterase na reconsolidação da memória condicionada de medo. Deste modo, ratos Wistar machos (270-320g) foram submetidos ao protocolo de condicionamento do medo ao contexto cujas sessões (familiarização – que consiste na exposição do animal ao contexto apenas para a exploração; condicionamento do medo – no qual se aplicam choques leves nas patas para a instalação do medo; evocação – reinsertão do animal ao contexto sem o estímulo aversivo para analisar e modular o medo, e teste A₁ – no qual são verificadas as consequências da análise e modulação do medo do dia anterior) aconteceram separadamente em uma janela de 24 h cada. O teste A₂, no qual as consequências da sessão de evocação são analisadas depois da metabolização completa do fármaco, ocorreu dez dias depois. O ROF (0,01, 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg) ou veículo (VEI) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 5 min, 30 min e 3 h após a evocação dessa memória por 3 min. O comportamento de congelamento foi posteriormente analisado e expresso como média ± E.P.M. O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA#1161. Os resultados mostraram que quando administrado 5 min após a sessão de evocação, o ROF nas doses de 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg reduziu o percentual de congelamento no teste A₂, mas não no teste A₁. Tal efeito não foi encontrado nos resultados da administração sistêmica de ROF ou VEI 30 min e 3h após a sessão de evocação. Esses achados sugerem que a inibição da fosfodiesterase prejudica a persistência de memória de medo original quando inibida nos momentos iniciais da reconsolidação.

Palavras-chave: Transtorno do Estresse Pós-Traumático; fosfodiesterase-4; roflumilaste; condicionamento do medo ao contexto; reconsolidação; memória de medo.

ABSTRACT

Roflumilast (ROF) is a selective inhibitor of phosphodiesterase 4 (PDE4) that enhances the intracellular signaling pathway involving cAMP, an important second messenger for, which is a central component to fuse for development of posttraumatic stress disorder (PTSD). It is known that consolidation and reconsolidation share common pathways even though being distinct processes. Furthermore, the reconsolidation is a target to treat the posttraumatic stress disorder, therefore it is necessary to understand the effect of phosphodiesterase inhibition on the reconsolidation of fear-conditioned memory. Thus, male Wistar rats (270-320g) underwent the protocol of contextual fear conditioning whose sessions ((familiarization – animal exposure to the context just for exploration; fear conditioning – to induce mild foot shocks to onset fear; evocation - reinsertion of the animal into the context without the aversive stimulus to analyze and modulate fear, and test A₁ – to analyse modulation of fear from the previous day)) took place 24-h apart. Test A₂ occurred ten days later, wherein same parameters of test A₁ was analysed, but when the drug was completely metabolized. ROF (0.01, 0.03, 0.1 and 0.3 mg/kg) or vehicle (VEI) were administered intraperitoneally (i.p.) 5 min, 30 min and 3 h after memory retrieval, a session that lasted 3 min. Freezing behavior was analyzed and expressed as mean \pm E.P.M. The experimental protocol was approved by CEUA # 1161. The results showed that when administered 5 min after the retrieval session, the ROF at the doses of 0.01, 0.03 and 0.1 mg/kg, reduced the percentage of freezing behavior in the test A₂, but not in test A₁. Such effect wasn't observed in the results of systemic administration of ROF or VEI 30 min and 3 h after the retrieval session. Together, these findings suggest that phosphodiesterase inhibition impairs memory persistence when inhibited at the initial phase of memory reconsolidation.

Keywords: Posttraumatic Stress Disorder; phosphodiesterase-4 (PDE4); roflumilast; contextual fear conditioning; reconsolidation; fear memory.

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- AMPc - Monofosfato de Adenosina Cíclico
- CaMK - Proteína Quinase Calmodulina-Dependente
- CRE - Elemento de Resposta ao AMPc (do inglês, *Cyclic-AMP Response Element*)
- CREB - Fator de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMPc (do inglês, *Cyclic-AMP Response Element Binding*)
- DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- ERK - Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês, *Extracellular-signal Regulated Kinases*)
- GMPc - Monofosfato de Guanosina Cíclico
- iPDE4 - Inibidor da Fosfodiesterase 4
- MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
- NMDA - N-metil-D-aspartato
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PDE4 - Fosfodiesterase 4 (do inglês, *Phosphodiesterase-4*)
- PKA - Proteína Quinase A (do inglês, *Protein Kinase A*)
- ROF - Roflumilaste
- TEP - Terapia de Exposição Prolongada
- TEPT - Transtorno do Estresse Pós-Traumático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	21
1.2 OBJETIVOS	21
1.2.1 Objetivo geral	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 MEMÓRIA DE MEDO.....	23
2.1.1 O protocolo de condicionamento do medo.....	23
2.1.2 Estruturas cerebrais relacionadas	23
2.1.3 Formação e consolidação de memória.....	24
2.1.4 Reconsolidação	26
2.2 ROFLUMILASTE.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS.....	27
3.2 DROGAS.....	28
3.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO.....	28
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS	29
4.1 EXPERIMENTO 1.....	29
4.2 EXPERIMENTO 2.....	30
4.3 EXPERIMENTO.....	32
5 DISCUSSÃO	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	40
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A memória é um processo biológico cujo objetivo é armazenar informações obtidas a partir de algum aprendizado prévio para que estas então sejam evocadas e retidas com o propósito de aprimorar tal experiência. Esse processo requer as etapas de aquisição (estágio inicial no qual se adquire primeiramente as informações), trazendo como consequência a formação da memória que em seguida resultará na etapa de consolidação, a qual, a partir do processo de evocação, garante a recapitulação posterior dessa experiência para rebuscar a tomada de decisão do indivíduo e ocasionar a possível alteração de seu comportamento (POO *et al*, 2016, BISAZ *et al*, 2014, REDISH e MIZUMORI, 2015, STERN e ALBERINI, 2013).

É de suma importância mencionar que os mecanismos de memória possuem íntima relação com o tempo de retenção. Quando a memória inicialmente se forma, ela é ainda instável e independe de síntese de proteínas, que é o que medeia a sua retenção. As memórias de curto prazo possuem baixo tempo de retenção quando comparadas à de longo prazo porque estas últimas passam pelo processo de consolidação, no qual, por conta de vários mecanismos e vias moleculares de síntese proteica, garantem a potenciação de longo prazo (do inglês, *LTP*, “*Long Term Potentiation*”), um processo de plasticidade sináptica responsável pelo fortalecimento do traço de memória, e, por conseguinte, pela sua estabilidade.

Além da classificação quanto ao tempo de retenção, outra pertinente refere-se à sua natureza, a qual inclui as memórias de trabalho, as declarativas ou não-declarativas e a emocional – que aqui recebe destaque por estar relacionada com a memória condicionada de medo, foco desta pesquisa (BREM *et al*, 2013).

Por mais que pareça intuitivo afirmar que uma memória estável não é um processo dinâmico, tal afirmação contém um erro crasso. De acordo com Przybylski e Sara (1997), algumas memórias, quando evocadas, podem se tornar novamente instáveis, tornando-se lábeis e suscetíveis a alterações para novamente serem estabilizadas, indicando a ocorrência de outro processo importantíssimo para a manutenção da memória: a reconsolidação.

A reconsolidação atualiza as memórias de modo a modificar o que foi formado na consolidação. Isso é importante quando se trata de doenças que necessitem da modulação da memória para o seu tratamento, especialmente quando se trata de

situações de difícil intervenção, como a dependência à drogas de abuso (que envolve os sistemas de recompensa e prazer, dificultando principalmente a adesão do indivíduo) ou no caso do Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) – desencadeado pela formação de uma memória de medo condicionada a um evento traumático, a qual, por sua vez, é bastante estável e, portanto, difícil de ser modulada.

Além disso, existe certa complexidade quando se trata de memória e medo, porque, primeiramente, isso se dá por serem dois processos distintos que se associam por vias neurofisiológicas capazes de garantir a responsividade do indivíduo acerca de um determinado estímulo. Outro ponto é que existe diferença entre os componentes inatos e aprendidos que geram confusão pelo fato de o medo ser uma emoção (portanto, inerente ao ser) com o de que ele pode ser inato (no caso, não aprendido; advindo de nascença, como, por exemplo, o medo de um animal feroz que se aproxima). Apesar do caráter negativo, o medo é visto como uma emoção necessária, considerada um estado que intervém nos conjuntos de estímulos, estes interpretados como ameaças reais ou potenciais, dependentes do contexto e respostas comportamentais, funcionando, assim, como um estado de alerta capaz de inibir e/ou alertar o indivíduo em situações perigosas que possam ou não oferecer risco à vida. (IZQUIERDO *et al*, 2016, ADOLPHS, 2014).

Em consonância com o que foi dito anteriormente, descreve-se o aprendizado como um processo no qual se adquire novos conhecimentos, ideias ou comportamentos, decorrente de vias conscientes ou não. Um dos métodos de aprendizado inconsciente é o condicionamento clássico, dito como um processo de pareamento de uma resposta automática a um determinado estímulo. Um dos trabalhos mais conhecidos acerca do condicionamento clássico é o de Ivan Pavlov, que, não intencionalmente, estudando aspectos da fisiologia digestória, descobriu a relação entre a salivação do cão (resposta) ao prenúncio de comida (estímulo condicionado) a partir de um som (estímulo incondicionado). Assim, o condicionamento clássico também pôde ser chamado de condicionamento pavloviano (REHMAN *et al*, 2019).

Cita-se como exemplo de condicionamento pavloviano realizado em laboratório, o condicionamento do medo ao contexto – técnica que tem por finalidade colocar um roedor em uma caixa onde foram aplicados choques leves nas patas. O animal naturalmente faz a associação entre os estímulos (choque e contexto, nesse

caso) e aprende a prever os eventos adversos, passando a reagir com medo. Neste caso, o estímulo condicionado é o contexto (a caixa) e o estímulo incondicionado é o choque. Ainda quanto ao protocolo, 24 h após o animal passar pela sessão de condicionamento, ele é submetido novamente à mesma caixa em que foram dados os choques, no mesmo ambiente (sessão de exposição ao contexto). Nesse caso, o animal é apenas reinserido na caixa durante a sessão exibindo como resposta de medo o congelamento.

No decorrer de uma sessão de exposição ao contexto, quanto mais tempo o animal permanecer na caixa, maior a tendência de diminuir o tempo de congelamento. Isso acontece devido ao fenômeno da extinção, que conceitualmente se baseia em um novo aprendizado sobre um determinado contexto, e, não necessariamente o esquecimento. Em outras palavras, o animal passa por uma nova aquisição de memória, agora já não mais aversiva, a qual se sobrepõe à memória aversiva, fazendo com que a resposta de medo deste animal diminua. Tal processo é relevante em terapias como a Terapia de Exposição Prolongada (TEP), a qual é fundamentada a partir da exposição do indivíduo a um contexto semelhante capaz de remeter o indivíduo a experiência traumática, e, assim, fazer com que a memória seja extinta. Dados do nosso grupo e ainda não publicados mostraram que o roflumilaste, um inibidor de fosfodiesterase 4, injetado sistemicamente ou infundida na região do infralímbico, após 3 h da sessão de extinção foi capaz de potencializar a persistência da memória de extinção. Contudo, existe alguns problemas que envolvem este processo, como a recuperação espontânea, renovação, reaquisição rápida e reintegração da memória original, mostrando que mesmo após esse processo de novo aprendizado, a associação entre estímulo condicionado e incondicionado não é rompida, remetendo à necessidade de utilização de outros procedimentos. A reconsolidação, então, aparece neste caso como uma alternativa viável justamente pela sua característica de modulação e atualização do aprendizado consolidado, facilitando, deste modo, a manutenção da associação entre os estímulos (SOHN *et al*, submetido para publicação, LINGAWI *et al*, 2018, IZQUIERDO *et al*, 2016, SHECHNER *et al*, 2014).

Embora necessário, muitas vezes o estado geral de medo pode ser exacerbado, causando prejuízos para a vida do ser em questão, como no TEPT, desenvolvido em situações onde foi presenciado um evento traumático tão significativo emocionalmente a ponto de desencadear a sintomatologia da doença

que se caracteriza pelos *flashbacks*, pesadelos, o reviver da experiência traumática, problemas do sono, depressão, isolamento social, culpabilização, incapacidade de se recordar de eventos importantes, entre outros (BISSON *et al*, 2016; BISSON, 2010).

Apesar de ainda pouco eficazes, existem algumas terapias farmacológicas (associadas muitas vezes à psicoterapia) que auxiliam no tratamento do TEPT. A metodologia deste processo, em pesquisas básicas laboratoriais, envolve a reexposição de um animal a um contexto por um curto período de tempo. Essa reexposição curta desestabiliza a memória já consolidada, então capaz de ser modificada por interferências na reconsolidação. Em humanos, tenta-se aplicar a mesma lógica para indivíduos com TEPT, onde o profissional, a partir do relato do paciente, ativa estados afetivos a partir de emoções positivas de modo a atualizar a memória de medo com informações seguras, permitindo, portanto, a substituição da memória de medo por uma série de outras memórias sem medo (SMITH *et al*, 2017, NADER; EINARSSON, 2010, KRYSTAL, 2017).

Em cada procedimento terapêutico utilizado, seja ele embasado na extinção ou reconsolidação, pode ser necessária a utilização de alguns fármacos. Um exemplo citado por Smith *et al* (2017) engloba a utilização de agonistas parciais de receptores NMDA capazes reduzir ou melhorar a função destes receptores que estão relacionados com a extinção. Smith *et al* (2017) também citam que o propranolol, um beta-bloqueador, pode ser uma alternativa promissora para prejudicar a reconsolidação de memórias traumáticas, e que, a rapamicina, um inibidor do alvo da rapamicina quinase em mamíferos (mTOR), rompe a reconsolidação de memórias de medo mediadas pela amígdala e hipocampo.

Visto a utilização de fármacos como facilitadores de terapias para o TEPT, nota-se a relevância dos estudos das vias neuroquímicas associadas, já que estas seriam o alvo do tratamento farmacológico, nos levando a concluir, inclusive, que a aquisição e a consolidação são etapas fundamentais para os métodos (reconsolidação e extinção) que embasam as psicoterapias. Portanto, pelo fato de a consolidação ser um processo dependente de LTP, e esta, por sua vez, decorrer da atividade de componentes genéticos como o CREB [Elemento de Resposta ao AMPc (Monofosfato de Adenosina Cíclico)], se faz necessário reforçar a importância de entender tais mecanismos moleculares, os componentes que deles participam e os fármacos que podem ser promissores para modular a consolidação. Deste modo,

destaca-se de modo muito importante a via do AMPc, levando em conta o seu papel como segundo mensageiro responsável por modular a cascata de sinalização da formação de LTP – a qual garante a estabilização da memória a longo prazo a partir do CREB, que, como seu próprio nome sugere, responde às concentrações de AMPc. O CREB é um fator de transcrição que se liga a um elemento de resposta do DNA que está em uma região de controle gênico, favorecendo a transcrição e determinando sua expressão que resultaria em aumento da produção sináptica a partir do crescimento dendrítico. Sua regulação ocorre a partir da fosforilação pelas enzimas Proteína Quinase A (PKA), Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) e pela Proteína Quinase Calmodulina-dependente (CaMK), mais bem descritas na seção 2.1.3. Enfatiza-se, assim, que o AMPc é um componente-chave no processo de consolidação de memória (KANDEL, 2012).

Sabe-se que a enzima fosfodiesterase 4 (PDE4) é responsável por hidrolisar o AMPc interrompendo a sinalização celular que guia esses processos de consolidação. Fármacos da classe dos inibidores da PDE4 (iPDE4) são capazes de inibir tal enzima, favorecendo o aumento da concentração de AMPc e, como consequência, o processo de plasticidade sináptica (KANDEL 2012; BAILEY *et al.*, 1996; IMPEY *et al.*, 1996). Desse modo, seria interessante a utilização de um iPDE4 depois de induzir a labilização da memória de medo a partir do processo de reconsolidação.

No entanto, a maioria dos iPDE4 causam muitos efeitos colaterais, o que poderia resultar em baixa adesão do fármaco pelos pacientes. Dentre esses efeitos, podemos citar principalmente os distúrbios gastrointestinais, como êmese e diarreia. Felizmente, foi lançado o roflumilaste, um fármaco da classe dos iPDE4 capaz de diminuir esses efeitos ocasionados pela inibição mais seletiva da fosfodiesterase 4. Sendo assim, formula-se a hipótese de que roflumilaste, ao inibir a fosfodiesterase 4 após a labilização da memória, irá prejudicar a reconsolidação, e, conseqüentemente, atenuar a memória de medo.

1.1 JUSTIFICATIVA

O Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (2013), define o TEPT como uma doença psiquiátrica relacionada com a exposição de um indivíduo a um evento traumático extremo, como o estupro, combate ou acidentes que ameacem a vida. O estudo de Marmar *et al.* (2015) fortalece essa ideia por revelar que, mesmo após 40 anos, 11% dos veteranos da guerra do Vietnã permaneciam com prejuízos funcionais desencadeados pela persistente sintomatologia. Entre civis, o abuso na infância e o estupro são os maiores causadores de TEPT (YEHUDA *et al.*, 2015).

Um relatório publicado pela OMS (2018) afirma que o Brasil é o sétimo país com a maior taxa de homicídios das Américas, indicando 31,3 mortes a cada 100 mil habitantes. Isso mostra que os índices de violência são altos e que muito possivelmente a prevalência de TEPT é alta, já que a doença tem forte associação com a violência.

Vale dizer que essa pesquisa é de extrema relevância, especialmente porque apesar da vasta quantidade de informações que abordem sobre a neurobiologia do TEPT, ainda há limitações quanto à farmacoterapia relacionada ao transtorno, especialmente também pelos modelos existentes e aceitos se mostrarem um tanto quanto ineficazes (KRYSTAL *et al.*, 2017).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes doses e tempos de administração do inibidor de PDE4, roflumilaste, no processo de reconsolidação da memória, avaliando os efeitos sobre o comportamento dos animais submetidos ao protocolo de condicionamento do medo ao contexto.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o efeito da inibição sistêmica da PDE 4 na reconsolidação, nos cinco primeiros minutos.

b) Avaliar o efeito da inibição sistêmica da PDE 4 na reconsolidação, nos trinta primeiros minutos.

c) Avaliar o efeito da inibição sistêmica da PDE4 na reconsolidação, após três horas da sessão de evocação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Como abordado na introdução, o transtorno do estresse pós-traumático é um distúrbio psiquiátrico que decorre de uma experiência traumática fazendo com que o indivíduo acometido pela doença expresse medo de forma exacerbada e a partir disso tenha redução da sua qualidade de vida ou até mesmo venha a desencadear outros distúrbios.

Portanto, ao falarmos de TEPT, vemos a forte associação da doença com os estudos relacionados à memória de medo, e assim, se faz necessário saber sobre os mecanismos moleculares dos processos envolvidos para que se possa pensar em uma abordagem terapêutica interessante. Dentre eles, podemos incluir a consolidação e a reconsolidação, sendo este último, em especial, o alvo principal do trabalho, pensando especialmente na utilização de um inibidor da fosfodiesterase (roflumilaste) como uma alternativa farmacológica para o tratamento da doença.

Sendo assim, na sequência seguem tópicos que explicam sobre a memória de medo (exemplos de condicionamento, aquisição, consolidação, reconsolidação), o próprio TEPT, terapias relacionadas, inibidores da fosfodiesterase 4 e sobre a hipótese que circunda o tema deste trabalho, que seria a utilização deste fármaco na reconsolidação da memória de medo.

2.1 MEMÓRIA DE MEDO

A memória de medo é uma ferramenta importante para o estudo do TEPT que pode ser aplicada a partir das formas de condicionamento de medo cuja ideia é induzir medo no animal e testar alguma abordagem terapêutica, via neuronal ou o envolvimento de certas regiões do cérebro com os processos de consolidação, reconsolidação ou extinção da memória de medo.

2.1.1 O protocolo de condicionamento do medo

O condicionamento do medo ao contexto envolve a inserção de um roedor em uma caixa (estímulo condicionado – EC) que induz choque (estímulo incondicionado – EI). O protocolo normalmente é realizado em cinco dias (STERN *et al.*, 2012). No primeiro, o animal é familiarizado com a caixa, de modo que apenas seja inserido na caixa por três minutos. No segundo, são aplicados consecutivos choques leves nas patas que variam em número e intensidade conforme o objetivo do trabalho. No dia seguinte, o animal é reexposto à caixa sem a apresentação do estímulo e seu tempo de permanência na caixa também depende do objetivo do trabalho. Sessões curtas de evocação (2 – 5 minutos) induzem o processo de reconsolidação, enquanto sessões longas (15 – 30 minutos) promove a extinção (STERN *et al.*, 2018). Curiosamente, existe um período entre sete e quinze minutos no qual não se obtém resultados independentemente da metodologia se relacionar com reconsolidação ou com a extinção (FRANZEN *et al.*, 2019). Mais detalhes sobre reconsolidação da memória de medo serão elucidados na seção 2.1.4.

2.1.2 Estruturas cerebrais relacionadas

A amígdala é um conjunto de núcleos em formato de amêndoa responsável por interpretar o estímulo aversivo e expressar o medo. O núcleo basolateral (BLA) é dividido em basal e lateral, enquanto o central (CeA), divide-se em lateral e medial. O lateral funciona como um “sistema de entrada” do estímulo aversivo, e é responsável por receber as informações de medo e processá-las para regiões corticais que irão interpretar a informação. Posteriormente, essas regiões controlarão o núcleo CeA, região que funciona como um “sistema de saída”,

enviando as informações para regiões específicas capazes de formular a resposta de medo, como o congelamento, modulado também pela substância cinzenta periaquedutal (IZQUIERDO *et al.*, 2016; PONNUSAMY e POULOS, 2007; CURZON *et al.*, 2009).

Além da amígdala, a memória envolve especialmente a região do hipocampo dorsal. Os processos de aquisição e evocação (onde se faz a associação entre o estímulo condicionado e incondicionado) normalmente se relacionam com a CA3, enquanto os processos de consolidação estão vinculados à CA1 (CURZON *et al.*, 2009, DAUMAS *et al.*, 2005). Além disso, Anagnostaras *et al.* (2001) indicam que lesões no hipocampo dorsal causam deficiência severa na memória recente, mesmo que alguns fatores enfraqueçam esse argumento, como o fato de que apenas ocorre a deficiência no congelamento contextual de animais lesionados e a perturbação dramática e temporalmente estável do medo ao contexto.

Outras estruturas importantes além da amígdala e hipocampo são as regiões do córtex pré-frontal medial, como o córtex pré-límbico, cuja atividade na evocação da memória induz a labilização, e, portanto, a reconsolidação da memória de medo (STERN *et al.*, 2014). Contudo, Tronson *et al.* (2012) mostraram que o córtex pré-frontal não é tão relevante para ativar a via do AMPc/PKA/CREB na reconsolidação, mais bem descritos na seção 2.1.3 e 2.1.4.

2.1.3 Formação e consolidação de memória

Estudos mostraram a relação de catecolaminas com o TEPT, sendo a noradrenalina a mais relevante para este trabalho porque este neurotransmissor se liga aos receptores β -adrenérgicos, os quais, por conseguinte, ativam a adenilato ciclase, responsável pela síntese de AMPc. O consequente aumento deste segundo mensageiro, ativa a PKA fazendo com que ocorra dissociação das subunidades catalíticas das subunidades reguladoras da proteína. Para o armazenamento da memória, as subunidades catalíticas fosforilam diferentes substratos nos terminais sinápticos, como canais de potássio e proteases responsáveis pela excitose, disponibilizando e liberando-as em maior quantidade. Repetidamente, essa fosforilação aumenta ainda mais a concentração de AMPc, levando a formas mais duradouras de plasticidade sináptica. Isso tudo faz com que a subunidade catalítica recrute o p42 e a MAPK de modo que eles migrem ao núcleo onde eles fosforilam

fatores de transcrição e ativam a expressão gênica necessária para induzir a memória de longo prazo. A atividade local da PKA pode ser neutralizada por proteínas fosfatases, como a PP1 e a calcineurina, que atuam como fatores que restringem de modo inibitório a formação de memória. Deste modo, existe um equilíbrio entre as atividades da quinase e da fosfatase em uma dada sinapse, causando bloqueio de sinais sinápticos que atingem o núcleo e, portanto, pode regular o armazenamento e a recuperação de memória (TRONSON e TAYLOR, 2007, KANDEL, 2012).

A PKA fosforila um fator de transcrição importante para formar a memória de longo prazo, o CREB, que, assim ativado, se liga a um elemento de resposta do DNA contido na região controle de um gene, favorecendo a atividade da RNA polimerase e determinando, deste modo, quando e em que nível um gene é expresso. Isso promove um aumento da formação de novos botões sinápticos favorecendo a consolidação de memória, como mostra a figura 1 (TRONSON e TAYLOR, 2007, KANDEL, 2012).

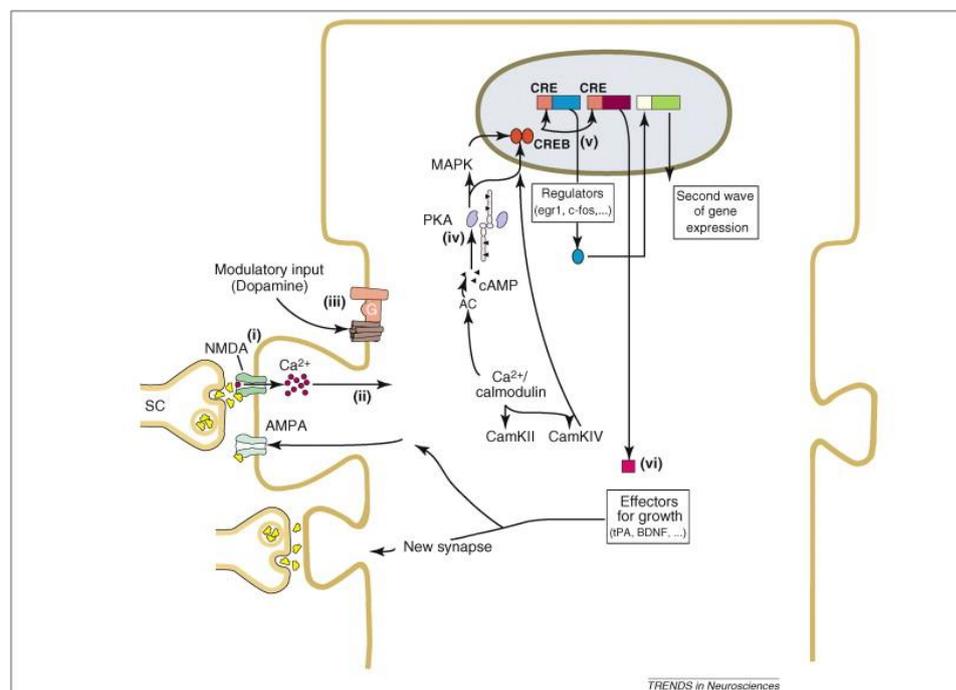


Figura 1. Formação de novo botão sináptico a partir a fosforilação do CREB (BENITO e BARCO, 2010).

2.1.4 Reconsolidação

Como mencionado, os aumentos dos níveis do CREB promovem fortalecimento sináptico e garantem a consolidação e o todo o processo ocorre de maneira semelhante na reconsolidação. Tanto na reconsolidação quanto na extinção, quando os níveis de AMPc aumentam, a atividade do CREB também aumenta. Os fatores de transcrição são fosforilados a partir de quinases a montante, e, dentre elas, recebe destaque a PKA, devido às suas funções bem estabelecidas na consolidação por de fatores de transcrição como o CREB. Além disso, a PKA é importante para a reconsolidação, já que estudos indicaram que a inibição de PKA na BLA prejudica memórias de medo ao som ou de gosto, além de que a ativação da enzima na mesma região aumenta a consolidação dessas memórias. Também foi visto que a ativação da PKA após a reativação pode fortalecer memórias. É importante destacar que os aprimoramentos da reconsolidação que mantêm ou fortalecem a memória após a reativação suportam o papel crucial dos mecanismos específicos implicados pelos estudos de perda de função, apoiando a hipótese de que a reconsolidação é um processo de armazenamento (TRONSON e TAYLOR, 2007).

Uma memória consolidada, estável, pode passar inicialmente por um processo de desestabilização e reestabilização dependente de síntese de proteínas, durante a qual as memórias são ativadas no estado lábil, alteradas, e, assim, armazenadas. O estímulo condicionado é apresentado na fase de evocação e em seguida podem ocorrer modificações e manipulações da memória. Após a apresentação do estímulo condicionado, existe uma janela de reconsolidação de menos de seis horas, em que ocorre a atualização dessa memória, assim como na consolidação. Essa manipulação garante que possa acontecer melhora dos indivíduos com TEPT e é uma ferramenta importante para o tratamento (TRONSON e TAYLOR, 2007).

O processo de reestabilização requer a ativação da expressão gênica mediada por CREB, mas, apesar de ser regulada por mecanismos moleculares semelhantes, ainda são parcialmente distintos dos envolvidos na consolidação. Até o momento, o receptor NMDA contendo a subunidade GluN2B, a degradação proteica dependente de proteassoma, os canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L, a proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), os receptores canabinóides CB1, calcineurina, receptores muscarínicos e receptores dopaminérgicos D1/D5 se

mostraram necessários para a desestabilizar a memória após a evocação. Os receptores AMPA podem ser permeáveis ao cálcio ou não. Estes, são responsáveis por aspectos neuroquímicos da memória de longo prazo. Estudos mostraram que a endocitose dos receptores AMPA impermeáveis ao cálcio que contém GluA2 nas membranas pós-sinápticas da amígdala lateral parece ser necessária para a desestabilização da memória de medo após a recuperação, enquanto que a ativação dos receptores AMPA permeáveis ao cálcio que não contém GluA2 é necessária para a reconsolidação da memória (HONG *et al*, 2013). Outro fato importante é que foi demonstrado que nem sempre a recuperação de memória leva à desestabilização e reconsolidação e que esses fatores dependem da força e da idade da memória, assim como a duração da recuperação da memória. (SUZUKI *et al*, 2004).

2.2 ROFLUMILASTE

O roflumilaste é um inibidor da PDE4 que foi aprovado em 2011 como um anti-inflamatório auxiliar no tratamento da DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica). Em comparação com o rolipram, foi capaz de reduzir os efeitos eméticos acentuados, especialmente por ser efetivo em baixa dose. Como efeitos colaterais, podemos incluir diarreia, perda de peso, dor abdominal e cefaleia (PRICKAERTS *et al*, 2017).

Inibidores da fosfodiesterase (iPDE) exercem efeito a jusante por meio da modulação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e AMPc, responsáveis por transferir um sinal extracelular como resposta celular não estruturais (como a ligação de um neurotransmissor ao seu receptor, mobilização de receptores) ou estruturais (geração de receptores e/ou formação de sinapses). O GMPc implica na ativação de proteínas quinases e o AMPc, a ativação adicional de fatores de transcrição específicos, como o CREB, por exemplo. Ambas as respostas aumentam a eficácia da transdução de sinal e podem ter papel na plasticidade neuronal, incluindo a LTP. Dentre a classe das fosfodiesterases, pode-se destacar a PDE4, enzima bastante expressa no cérebro, tanto de ratos como de humanos, especialmente no córtex frontal e no hipocampo – regiões importantes para a memória. A função dessa enzima seria degradar o segundo mensageiro AMPc – responsável por ativar a PKA, a qual, por conseguinte, fosforila a Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMPc (pCREB), induzindo a expressão de genes responsivos a CREB, os quais estão relacionados com a plasticidade sináptica, memória e cognição (VANMIERLO *et al*, 2016, VAN DUINEN *et al*, 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos (nascidos e criados no biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil) pesando 270-320 g e com idade aproximada de 14-16 semanas. Os animais foram armazenados em caixas de acrílico (50 x 30 x 15 cm) em grupos de 5 animais, mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas e receberam comida e água à

vontade. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética de utilização animal da UFPR sobre o número de protocolo #1161.

3.2 DROGAS

O roflumilaste (doado pela Universidade de Maastricht, Holanda; 0,01, 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg) foi dissolvido em 90% de solução salina e 10% de tween 80.

3.3 CONDICIONAMENTO DO MEDO AO CONTEXTO

O protocolo de condicionamento do medo ao contexto foi realizado em uma caixa de alumínio, com a parede frontal e a tampa superior de acrílico transparente (26 x 31.5 x 21 cm; Insight, Brasil), denominada Contexto A. O piso de barras de metal inoxidável (3 mm de diâmetro e afastadas 0,9 mm centro a centro) esteve conectado a uma fonte de choque. Todos os experimentos foram realizados no período vespertino.

Primeiramente os animais foram submetidos à sessão de familiarização, que garante a exploração livre durante 3 min. No dia seguinte, os animais foram submetidos a sessão de condicionamento, onde receberam três choques nas patas de 0,7 mA, 60 Hz, por 3 s, com intervalo de 30 s entre os choques permanecendo mais 30 s nesta caixa antes de retornar à sua caixa moradia.

No dia seguinte, os animais foram expostos a sessão de evocação, na qual os animais novamente permaneceram na caixa de condicionamento 3 min sem a apresentação do estímulo incondicionado (choque), com a finalidade de induzir a reconsolidação da memória de medo. 24 horas depois, os animais foram submetidos ao teste A₁ com exposição à caixa de condicionamento por 3 min novamente sem a apresentação de estímulo incondicionado.

Dez dias após o teste A₁, os animais foram submetidos ao teste no contexto A pela segunda vez na mesma caixa por 3 min (teste A₂). Depois de cada sessão, as caixas foram limpas com um lenço de papel embebido em solução aquosa de etanol a 10%. O roflumilaste (0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg) ou veículo (VEI) foram administrados i.p. no tempo de 5 minutos, 30 minutos e 3 h após a sessão de evocação.

O parâmetro utilizado para avaliar o medo dos animais é o comportamento de congelamento, definido como ausência total de movimentos do corpo e da cabeça, desconsiderando os que estejam relacionados com a respiração (BLANCHARD E BLANCHARD, 1969). O comportamento foi continuamente registrado durante a sessão de evocação, teste A₁ e o teste A₂ por meio de uma câmera de vídeo. O tempo de congelamento em cada período foi quantificado (em segundos) com o auxílio de um cronômetro.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. do percentual de tempo de congelamento e submetidos ao teste de análise de variância unidirecional ou de medidas repetidas (ANOVA). Em seguida foi aplicado o teste post hoc de Newman-Keuls. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa Statistica 12 e a formulação gráfica pelo programa Prisma 7.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

Os efeitos da administração sistêmica de roflumilaste nas doses de 0,01, 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg foram avaliados em três etapas de tempo: cinco minutos, trinta minutos e três horas após a sessão de evocação. A partir do teste de variância unidirecional com medidas repetidas (ANOVA), pôde-se observar efeito significativo do fator do tratamento [$F(4,42) = 6,0756$; $P = 0,0060$] e da reexposição ao contexto [$F(2,84) = 45,715$; $P = 0,0000$]. Além disso, ocorreu interação entre os fatores tratamento e repetição [$F(2,84) = 2,9452$; $P = 0,00596$]. Pela análise do teste de post hoc de Newman-Keuls, o tratamento com ROF nas doses de 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg, reduziu o percentual do tempo de congelamento em comparação ao grupo controle durante o teste A₂, conforme evidenciado na figura 1. Não houve diferença entre os grupos durante a evocação da memória ou durante o teste A₂, sugerindo

que o bloqueio da PDE 4 5 min após a reativação da memória prejudica a persistência da memória de medo.

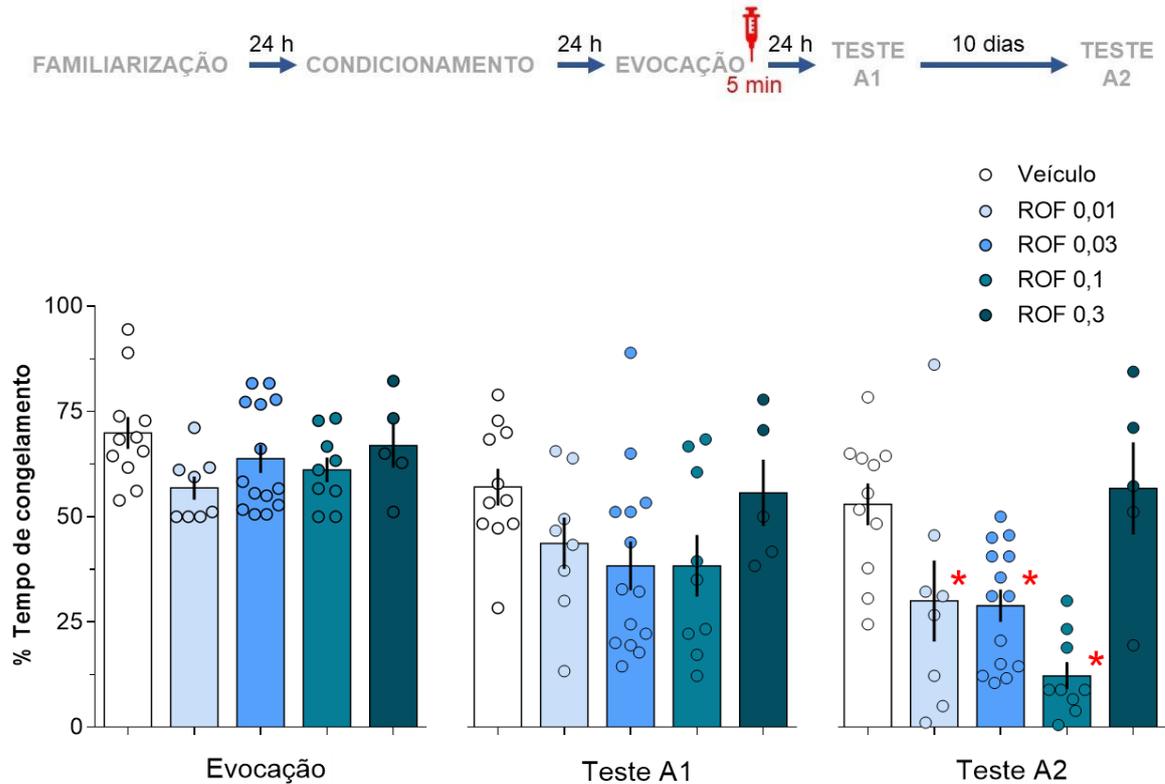


Figura 2. Efeitos da inibição da PDE4 5 min após a sessão de evocação. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental, em que a seta vermelha, indica o tratamento com o ROF. Os gráficos representam o percentual do tempo de congelamento apresentado pelos animais durante a sessão de evocação, teste A₁ e teste A₂. A sessão de evocação indica não existir diferenças prévias entre os grupos. No teste A₁, o tratamento, em nenhuma das doses, foi capaz de apresentar efeito. Já no teste A₂, os tratamentos com as doses de 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg reduziram o tempo de congelamento dos animais em comparação ao grupo controle. As barras representam a média \pm EPM do percentual do tempo de congelamento dos animais. Os pontos, indicam o percentual de congelamento apresentado individualmente pelos animais durante o teste. O * indica $P < 0,05$ em comparação ao controle do mesmo grupo, após o teste de post hoc de Newman-Keuls.

4. 2 EXPERIMENTO 2

O passo seguinte foi analisar o efeito do ROF administrado 30 min após a sessão de evocação. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve diferença significativa para a interação entre o fator tratamento e exposição ao contexto [$F(4, 22) = 1,0457$; $P = 0,40640$] e nem para o tratamento [$F(4, 22) =$

0,52875; $P = 0,7158$]. Contudo, na reexposição, o efeito foi observado [$F(1, 22) = 19,426$; $P = 0,00022$]. O teste de post hoc apontou que não houve diferença entre os grupos controle e tratamento.

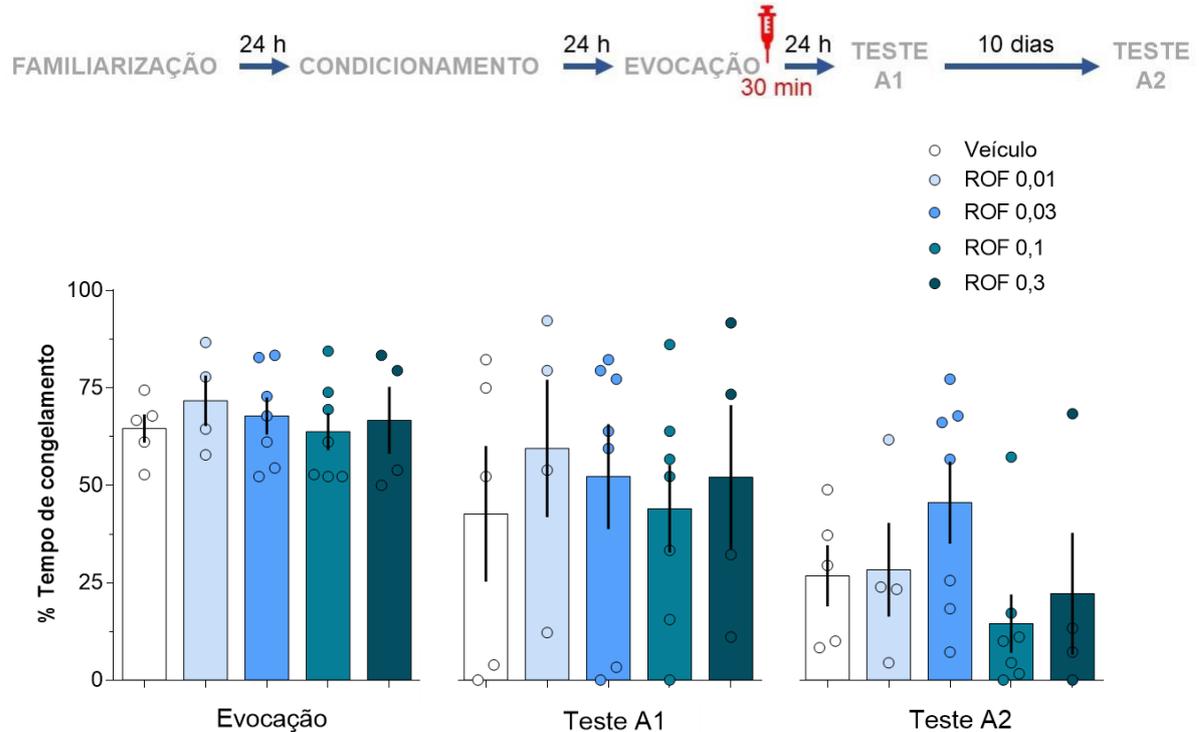


Figura 3. Efeitos da inibição da PDE4 administrada sistemicamente 30 min após a sessão de evocação. O esquema representa o delineamento experimental, em que a seta vermelha indica o tratamento com ROF. Os gráficos representam o percentual do tempo de congelamento apresentado pelos animais durante a sessão de evocação, teste A₁ e teste A₂. A sessão de evocação indica não existir diferenças prévias entre os grupos. Nenhuma das doses avaliadas apresentaram efeito no teste A₁, tampouco no teste A₂. As barras representam a média ± EPM do percentual do tempo de congelamento dos animais e o percentual de congelamento individual dos animais durante os testes estão indicados pelos pontos.

4. 3 EXPERIMENTO 3

A última etapa envolveu a análise dos possíveis efeitos de ROF administrado 3 horas após a sessão de evocação (figura 3). A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve diferença significativa para a interação entre o fator tratamento e exposição ao contexto [$F(8,60) = 0,205042$; $P = 0,98885$] e, do mesmo modo, não houve efeitos do tratamento [$F(4,30) = 0,2790$; $P = 0,97113$]. No entanto, houve diferença significativa da a reexposição ao contexto [$F(2,60) = 39,851$; $P = 0,000001$].

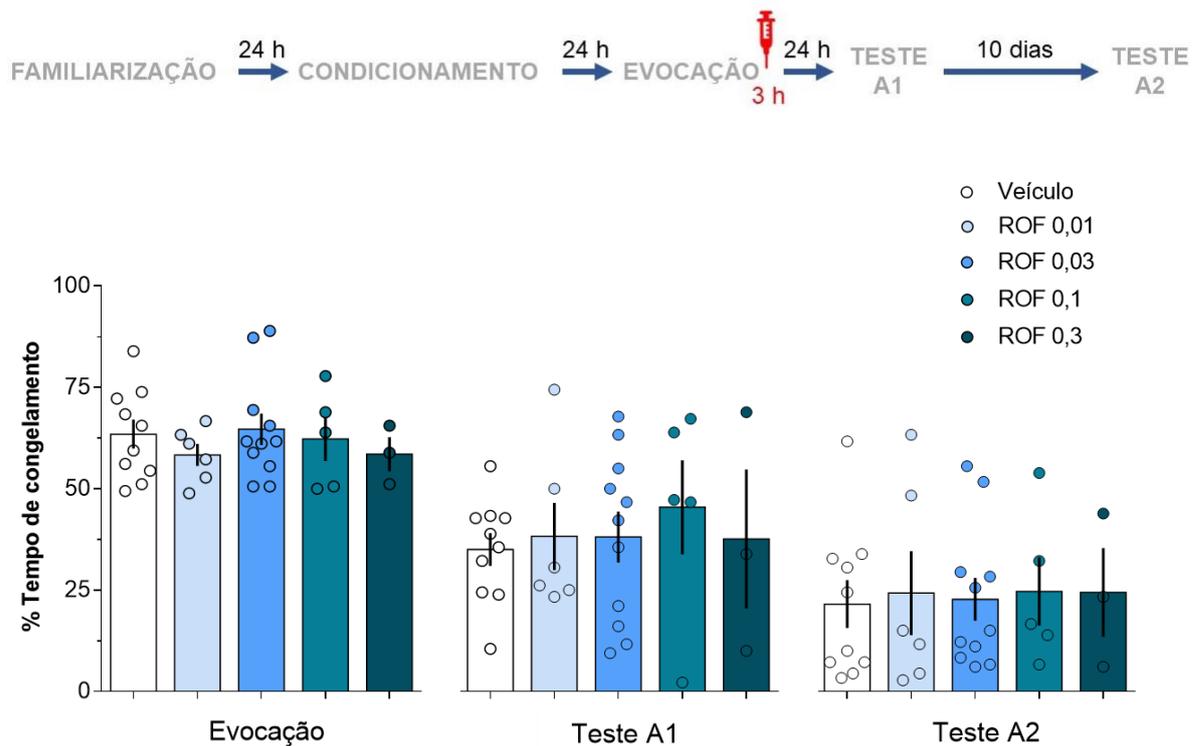


Figura 4. Efeitos da inibição da PDE4 administrada sistemicamente 3 h após a sessão de evocação. O esquema acima do gráfico representa o delineamento experimental, em que a seta vermelha indica o tratamento com ROF. Os gráficos representam o percentual do tempo de congelamento apresentado pelos animais durante a sessão de evocação, teste A₁ e teste A₂. A sessão de evocação indica não existir diferenças prévias entre os grupos. Nenhuma das doses avaliadas apresentaram efeito no teste A₁, tampouco no teste A₂. Enquanto as barras representam a média \pm EPM do percentual do tempo de congelamento dos animais, o percentual de congelamento individual dos animais durante os testes está indicado pelos pontos.

5 DISCUSSÃO

Pouco está descrito na literatura sobre o papel da fosfodiesterase 4 na reconsolidação da memória, especialmente quando se fala em condicionamento do medo ao contexto. Do que foi buscado na literatura, muitas referências indicam que a PKA é crucial para o processo de reconsolidação (KRAWCZYK *et al*, 2016, TRONSON, 2012), contudo, nenhuma dessas fontes menciona a relação nesse processo e a enzima PDE4, que é a molécula-alvo deste trabalho.

Os principais resultados encontrados nesse trabalho mostraram que as doses de ROF 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg, quando administradas sistemicamente cinco

minutos após a evocação, foram as que apresentaram redução do percentual de congelamento dez dias depois do tratamento. Como esse efeito não foi observado 24 h após a evocação, mas, sim, somente dez dias depois, pode-se sugerir um efeito sobre a persistência de memória e não sobre a reconsolidação.

Sabe-se que o AMPc medeia a sinalização da PKA, a qual pode diretamente ou indiretamente fosforilar o fator de transcrição CREB. Essa via é descrita no trabalho de Waltereit e Weller (2003) e mostra que quando ativada, a PKA atua ativando a Ras (que por sua vez ativa a Raf) e a Rap-1 (que irá ativar a B-Raf). Quando ativadas, Raf e B-Raf ativam a MEK, que, assim, irá ativar a p44/42-MAPK (também conhecida como ERK). Essa via indireta também favorece a fosforilação do CREB.

Nossos dados se assemelham aos resultados de Krawczyk *et al* (2016), que utilizou a esQUIVA inibitória como protocolo e concluiu que um inibidor da ERK (PD098059) quando infundido no hipocampo dorsal 3 h depois da reativação não alterou a reconsolidação 24 h após o teste, mas diminuiu o tempo de retenção da memória, revelando alteração na persistência de memória. Essa similaridade mostra a possibilidade da inibição da PDE4 na fase inicial da reconsolidação pode estar relacionada com uma possível inibição da ERK três horas mais tarde e essa condição gerar prejuízo na retenção de memória dez dias depois. Zhang *et al* (2004) revelaram que a infusão de um inibidor da fosfodiesterase (rolipram) na região CA1 do hipocampo de ratos reverte os déficits de memória causados pelo inibidor da MEK. Isso se mostra contraditório à primeira vista, mas as diferenças de detalhes nos protocolos utilizados em cada um dos trabalhos [como, por exemplo, a utilização de camundongos no primeiro e ratos no segundo; o tipo de inibidor utilizado; o fato de Zhang *et al* (2004) utilizarem a esQUIVA inibitória como protocolo] e também o fato de não existir inibidores específicos para ERK1 ou ERK2, as quais exercem papéis diferentes nos processos de memória (KRAWCZYK, 2019), pode ser a causa dessa contradição. Outra hipótese é que a inibição da PDE4 nos cinco primeiros minutos pode desencadear a inibição da ERK 3 h depois já que, hipoteticamente, a PDE4 poderia regular outras moléculas envolvidas na regulação da ERK. No caso da reconsolidação, uma diminuição da concentração de PDE4, ocasionaria aumento inicial da concentração de AMPc nos primeiros minutos e faria com que a ERK também fosse aumentada nesse tempo. Três horas depois, a ERK, que já atingiu o seu pico máximo de atividade, começa a ser inibida por outras moléculas, podendo,

inclusive, ser inibida pela própria PDE4. Como isso tudo é incerto, o mais correto seria confirmar essas hipóteses futuramente com análises moleculares ou até mesmo utilizando o mesmo protocolo de Krawczyk (2016) que envolve inibição da ERK.

Assim como o papel da PDE4 na reconsolidação ainda é um assunto bastante inexplorado, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que levam à persistência de memória (KRAWCZYK, 2019). Sabe-se que a sinalização da ERK, de modo semelhante ao do PKA, aumenta a LTP, e, conseqüentemente, a memória de longo prazo. Estudos verificaram que a inibição da sinalização de ERK no hipocampo dorsal bloqueia a formação de memória de longo prazo, mas não interfere na memória de curto prazo. Outro ponto é que os níveis de AMPc podem estimular ou inibir a sinalização de ERK, indicando que as vias se relacionam, além de que, como foi mencionado anteriormente, a inibição da PDE4 pode reverter os efeitos decorrentes inibição da sinalização da ERK (ZHANG *et al*, 2004). Portanto, o nosso trabalho complementa os trabalhos de Krawczyk *et al* (2016), Krawczyk *et al* (2019) e Zhang *et al* (2004) por mostrar que, quando inibida nos cinco primeiros minutos da reconsolidação da memória de medo, a PDE4 prejudica a persistência da memória de medo.

Outro achado interessante é que o percentual do tempo de congelamento dos animais tratados com a dose de 0,3 mg/kg está igual ao grupo controle, reforçando a ideia de que a curva dose-efeito da PDE4 tem um padrão, que seria expresso em formato de U, que concorda com os dados de Heckman *et al* (2018).

Quanto aos dados referentes a administração de ROF 30 minutos depois da sessão evocação, notou-se que apesar da inibição ter ocorrido em uma fase inicial da reativação da memória, como em cinco minutos, os resultados se diferiram, indicando que mecanismos distintos podem estar atuando na fase inicial da reconsolidação.

Sohn *et al* (2019, submetido para publicação), a partir do protocolo de extinção da memória de medo condicionada ao contexto, mostrou que a administração de ROF interfere com a persistência da extinção quando administrado 3 h, mas não 5 minutos após a sessão de extinção. A extinção é um processo de novo aprendizado e conseqüente formação de nova memória, a qual irá competir com a antiga a partir de uma exposição longa ao contexto na sessão de evocação. Os resultados de Sohn *et al* (2019, submetido para publicação) diferem dos

encontrados neste trabalho, muito possivelmente devido aos processos de aprendizados estabelecidos em cada um, já que o tempo de exposição ao contexto na extinção é mais longo do que o tempo de exposição na reconsolidação (3 min). De qualquer forma, ambos trabalhos enfatizam que o tempo de administração do ROF é um componente-chave para os efeitos da inibição da PDE4 nos processos de memória de medo, especialmente em termos de persistência de memória. Ainda, em conjunto esses resultados sugerem que o tempo de evocação é relevante para a ativação de vias onde a PDE4 irá atuar, no entanto, esses mecanismos precisam ser investigados.

Um trabalho de Roesler *et al* (2014), cujo protocolo envolve esquivas ativas, mostrou que a administração de rolipram (outro inibidor da PDE4) diretamente no hipocampo dorsal, imediatamente após a extinção, aumentou a resposta de medo dos animais no dia seguinte e que esta interferência farmacológica poderia fortalecer o processo de reconsolidação e não de extinção. Os autores sugerem que isso ocorre porque de acordo com os experimentos de Kim *et al* (2014), neurônios amigdalares que apresentam alta expressão de CREB (os quais, neste experimento, tiveram sua ativação induzida) – revelaram recuperar uma memória de medo já estabelecida e desencadear um processo de reorganização semelhante à reconsolidação. Contudo, nossos dados mostraram que o ROF não interferiu na reconsolidação quando injetado sistemicamente na fase inicial deste processo, ou seja, cinco minutos após a sessão de evocação. A explicação para isso pode ser a relação com o tipo de inibidor de fosfodiesterase utilizado por eles, que se difere do nosso. Além das diferenças como a via de administração (i.p. – em que a droga seria menos seletiva à PDE4 cerebral, já que esta molécula está presente em outras células e o inibidor se ligaria às moléculas de diferentes partes do corpo – vs intra-hipocampal, que seria mais seletiva à PDE4 hipocampal) e o protocolo experimental usado, condicionamento de medo vs esquivas. Comparado ao rolipram, o roflumilaste se mostra muito mais seletivo para a PDE4.

Alguns estudos podem explicar ainda mais a contradição dos nossos dados com os verificados na literatura. Li *et al* (2009) utilizaram animais *knockout* para β -arrestina-2, revelando que a interação entre esta proteína e a PDE4D são fundamentais para a consolidação de memória, porque estes animais, quando submetidos ao protocolo de condicionamento ao som, apresentaram menor percentual de congelamento comparado ao grupo selvagem. O grupo sugere que a

interação destas moléculas é importante para limitar a ativação da PKA e mostra que 5 min e 30 min após a sessão de condicionamento, a expressão da β -arrestina-2 e da PDE4D é aumentada.

O processo de reconsolidação pode tanto fortalecer a memória de medo original quanto enfraquecê-la. Isso pode estar relacionado com o papel da β -arrestina-2, uma proteína citosólica que medeia a dessensibilização de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), classe a qual se incluem os receptores β -adrenérgicos, que, quando ativados, causam aumento intracelular de AMPc, e, portanto, são relevantes para este estudo (LIM *et al*, 2018, KIDA, 2009, DEWIRE *et al*, 2007, TOHGO *et al*, 2001). Deste modo, estima-se que a interação do ROF com a PDE4 prejudique a interação da PDE4 com a β -arrestina-2, e, portanto, explique um provável mecanismo envolvido com o prejuízo da memória ocasionado pela administração de ROF. Outro ponto é que Li *et al* (2009) observou prejuízos de memória mais recente, e, assim se faz necessário estudar melhor o envolvimento deste mecanismo com a persistência de memória, descrita por Katche *et al* (2010) e Bekinschtein *et al* (2008) como uma onda de síntese proteica que ocorre tardiamente, necessária para sustentar as memórias de longo prazo.

Em consonância com o que descrevem alguns estudos, o fato de as doses aqui utilizadas não exibirem efeito 24 h após a administração, mas, sim, somente dez dias depois, também pode estar relacionado com a labilidade de memória. Sabendo que o mecanismo de ação do ROF tem como objetivo indireto aumentar a disponibilidade de AMPc intraneuronal e conseqüentemente aumentar a atividade da PKA, Lim *et al* (2018) sugerem que essa enzima pode fosforilar canais iônicos aumentando o influxo de cálcio mediado por receptores NMDA, causando hiperexcitabilidade celular, em neurônios da CA1, por exemplo, desencadeando a desestabilização da memória de longo prazo. É importante lembrar que a evocação da memória de medo causa liberação de noradrenalina hipocampal, estimulando os receptores β -adrenérgicos e, por conseguinte, aumentando a liberação de AMPc na célula (LIM *et al*, 2018). Portanto, quando administradas as doses de 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg passado cinco minutos da evocação (figura 1), o ROF favoreceria maior disponibilidade de AMPc na reconsolidação fazendo com que a memória fosse desestabilizada e se tornasse novamente disponível para alterações ou até mesmo para serem descartadas. Esse exemplo citado reforça outros estudos que falam que não necessariamente a inibição da PDE4 exerce efeito pró-cognitivo (LIM *et al*,

2018). Richter *et al* (2013) descreve que para que tal efeito ocorra, a sinalização fisiológica deve ser relativamente curta para induzir as respostas celulares apropriadas e que amplificar o AMPc transitório pode ser útil, de fato, para mediar benefícios terapêuticos, mas, quando esse segundo mensageiro excede os limites fisiológicos, pode desregular toda a sinalização levando a mecanismos compensatórios, além de que até mesmo seu efeito *per se* pode revelar um efeito deletério na memória.

Quando administrado 30 min ou 3 horas após a sessão de evocação (figura 2), as doses de ROF 0,01, 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg não modificaram o tempo de congelamento dos animais em relação ao grupo controle em nenhum dos testes subsequentes. Isso enfatiza a hipótese de que além do seu papel na estabilidade de memória na reconsolidação da memória, a PKA exerce função na labilidade dessa memória, corroborando para sua manutenção ou descarte dependendo do tempo em que se aplica o inibidor de PDE4: quando aplicado cinco minutos após a sessão de evocação, favorece a labilização pelo processo estar no início e não depender tanto da CREB, enquanto que quando aplicado 3 h após, esse processo de desestabilização poderia até ocorrer, mas com menos afinco, já que a via estaria mais voltada para a fosforilação da CREB pela PKA e os processos de plasticidade sináptica para a reestabilização da memória estariam acontecendo (LIM *et al.*, 2018, RICHTER *et al*, 2013).

Curiosamente, quando administrado 3 horas após uma sessão de evocação mais longa, i. e., 20 minutos, o ROF potencializou a persistência da memória de extinção (SOHN *et al*, 2019, submetido para publicação). Novamente, esses dados sugerem que o tempo de evocação parece ser importante na indução de mecanismos distintos, e que por consequência, fazem com que a inibição da PDE4 gere efeitos semelhantes, i.e., redução do congelamento, mas em momentos diferentes.

Assim, de modo geral sugere-se que dois mecanismos distintos podem governar os dados aqui dados obtidos: (1) a interação da PDE4 com a β -arrestina-2 e (2) a hiperexcitabilidade neuronal e consequente desestabilização promovida pela fosforilação de canais iônicos pela PKA. Tais fatores indicam que a reconsolidação se distingue da extinção não somente pelo tempo de evocação da memória, mas pelas vias de sinalização intracelular envolvidas e que o tempo é o componente-chave para entender os efeitos da inibição da fosfodiesterase independentemente do

processo de memória a ser estudado. Em comum, tanto os resultados obtidos a partir do protocolo de extinção, como o de reconsolidação, sugerem um papel da PDE4 na persistência da memória de medo (Figura 4). No entanto, como e se de fato, a PDE4 tem essa função, ainda permanece por ser investigado.

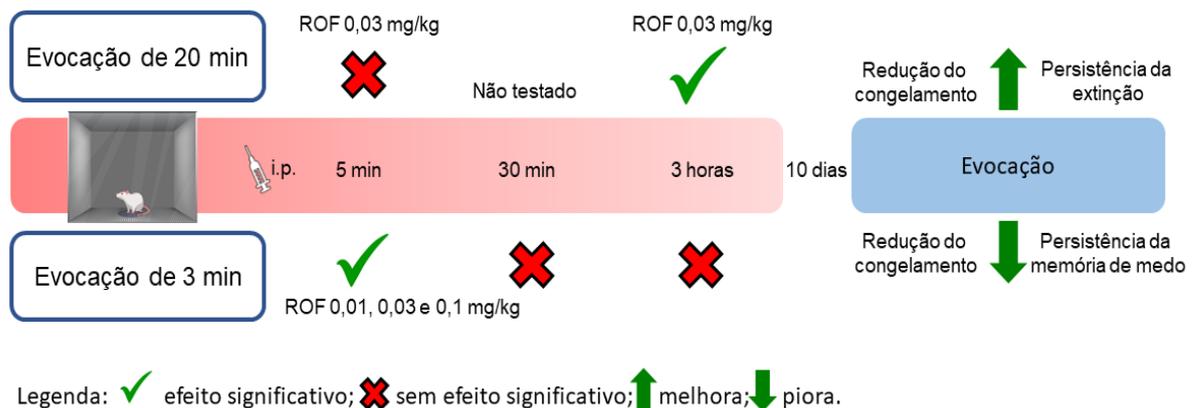


Figura 4. A fofosdiesterase 4 como molécula da persistência da memória. A administração sistêmica de ROF após diferentes tempos de evocação, 3 ou 20 min, e em diferentes momentos, 5 min ou 3 horas, reduz o tempo de congelamento por interferir na persistência da memória de medo original ou por melhorar a persistência da memória de extinção.

Certamente, ainda é necessário realizar estudos de cunho molecular para confirmar as hipóteses postuladas ao longo desta discussão. Mesmo assim, todos os trabalhos utilizados para reforçar os dados deste estudo indicam que o roflumilaste tem se mostrado como uma alternativa farmacológica viável para o tratamento do TEPT associado a intervenções psicoterapêuticas, levando em consideração que a inibição da PDE4 favorece a diminuição da retenção da memória de medo a longo prazo. Sua aplicação clínica em relação ao tempo de evocação deveria estar em consenso com a abordagem psicoterapêutica utilizada, adaptando o tempo de exposição ao contexto de acordo com o protocolo utilizado (no caso da reconsolidação, uma exposição curta e na extinção, exposição longa). Isso é relevante pois indica a importância de uma atuação multiprofissional entre pesquisadores, psiquiatras e psicólogos para esclarecer o tempo em que o fármaco é administrado e o paciente é exposto ao contexto.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho traz um novo olhar para o entendimento da neurobiologia do TEPT, já que fornece um melhor entendimento do papel da PDE4 na reconsolidação da memória de medo, um mecanismo que serve para sustentar as memórias ao longo do tempo, mas que também pode ser usado como alvo terapêutico. Considerando que o roflumilaste é uma droga já usada clinicamente, ele apresenta um bom perfil de segurança clínica, apesar dos inúmeros efeitos colaterais (náusea, vômito, diarreia, perda de apetite, cefaleia e insônia). Após ser confirmado que a PDE4 participa da persistência da memória de medo, possíveis testes em seres humanos serão muito mais rápidos e seguros.

Além do impacto no entendimento da neurobiologia do TEPT, esse trabalho fortaleceu as relações de colaboração entre a UFPR e a Universidade de Maastricht, na Holanda, já que o roflumilaste é sintetizado na Holanda e fornecido através de uma colaboração que existe com o Dr. Jos Prickaerts. Assim, a internacionalização da UFPR também é fortalecida através desse projeto.

Muito pode se concluir a partir dos resultados encontrados. Primeiro, que a PDE4 tem se mostrado cada vez mais como uma proteína de persistência de memória, já que além dos nossos dados, esse tipo de efeito foi encontrado no trabalho de Sohn *et al* (2019, submetido para publicação). Em segundo lugar, o efeito do fármaco está intimamente ligado ao tempo de administração e do tempo de exposição ao contexto na sessão de evocação. Isso também é enfatizado por Sohn *et al* (2019, submetido para publicação).

Em resumo, conclui-se que quando administrado na fase inicial da reconsolidação, especificamente 5 minutos após a sessão de evocação, o ROF prejudica a persistência de memória nas doses de 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg, sendo a mais eficaz a última. Contudo, esse efeito não é encontrado quando o ROF é administrado 30 minutos, ainda na fase inicial da reconsolidação, além de também não ser encontrado 3 horas após a sessão de evocação, indicando que duas vias diferentes podem estar relacionadas a esse processo.

Além disso, os achados deste trabalho são importantes para direcionar novas pesquisas futuras acerca do papel da PDE4 na reconsolidação da memória de medo, já que se postulam muitas hipóteses sobre o papel da PDE4 como mediadora

da β -arrestina e da ERK na persistência de memória, algo inédito na literatura e bastante relevante quando se fala em processos de memória.

Deste modo, a confirmação dessas hipóteses por meio de técnicas moleculares é vista como uma necessidade futura, já que o conteúdo acerca desse assunto é escasso na literatura e os resultados comportamentais encontrados são importantes, mas não são suficientes.

REFERÊNCIAS

- ADOLPHS, R.. The biology of fear. **Current biology**. Vol. 23, n. 2, jan. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595162/>.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA PSIQUIÁTRICA. **Diagnóstico e Manual Estatístico de Doenças Mentais - DSM V**. 5 ed. Washington: Associação Americana psiquiátrica, 2013.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S.. Hippocampus and contextual fear conditioning: recente controversies and advances. **Hippocampus**, v. 11, n. 1, p. 8-17, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11261775>
- BAILEY, C.H.; BARTSCH, D.; KANDEL, E. R.. Toward a molecular definition of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 3445–13452, 1996.
- BENITO, E.; BARCO, A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. **Trends in neurosciences**, v. 33, n. 5, p. 230-240, 2010.
- BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. BDNF and memory formation and storage. **The Neuroscientist**, 14(2): 147-56. 2008.
- BISAZ, R.; TRAVAGLIA, A.; ALBERINI, C. M.;. The neurological bases of memory formation: from physiological conditions to psychopathology. **Psychopathology**, v. 47, n. 6, p. 347-356, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246028/>.
- BISSON, J. I.. Post-traumatic stress disorder. **BMJ Clinical evidence**, v. 2010, n. 1005, fev. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2907597/>.
- BISSON, J. I.; COSGROVE, S.; LEWIS, C.; ROBERTS, N.. Post-traumatic stress disorder. **The BMJ jornal**, v. 351, nov. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663500/>.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **Journal of Comparative Physiological Psychology**. v. 68, p.129-135, 1969.
- BREM, A.; RAN, K.; PASCUAL-LEONE, A.. Learning and memory. **Handbook of clinical neurology**, v. 116, p. 693-737, 2013. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4248571/>
- COWAN, N.. What are the differences between long-term, short-term, and working memory?. **Progress in brain research**, v. 169, p. 323-338, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2657600/>.

CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWMAN, K. E.. Cued and contextual fear conditioning for rodents. In: BUCCAFUSCO, J. J. (Ed. 2). **Methods of behavior analysis in neuroscience**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>.

DAUMAS, S.; HALLEY, H; FRANCÉS, B.; LASSALLE, J. M.. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. **Learning memory**, v. 12, n. 4, p. 375-382, jul. 18.

DEWIRE, S. M.; AHN, S.; LEFKOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K.. Beta-arrestins and cell signaling. **Annual Review of Physiology**, v. 69, p. 483-510, 2007.

DUVARCI, S.; NADER, K.. Characterization of fear memory reconsolidation. **The journal of neuroscience: the official journal of Society for Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9269-9275, out. 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496662>.

FRANZEN, J.; GIACHERO, M.; BERTOGLIO, L. J.. Dissociating Retrieval-Dependent Contextual Aversive Memory Processes in Female Rats: Are there cycle-dependent differences?. **Neuroscience**, v. 406, p. 542-553, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/332320798_Dissociating_Retrieval-Dependent_Contextual_Aversive_Memory_Processes_in_Female_Rats_Are_there_cycle-dependent_differences

HAUBRICH, J.; NADER, K.. Memory Reconsolidation, **Current topics in behavioral neurosciences**, v.37, p. 151-176, 2018.

HASSELMO, M. E.. The Role of Hippocampal Regions CA3 and CA1 in Matching Entorhinal Input With Retrieval of Associations Between Objects and Context: Theoretical Comment on Lee et al. (2005). **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 1, p.342-345, 2005.

IMPEY, S; MARK, M.; VILLACRES, E. C.; POSER, S.; STORM, D. R. Induction of CRE-Mediated Gene Expression by Stimuli That Generate Long-Lasting LTP in Area CA1 of the Hippocampus. **Neuron**, v. 16, p.973-982, 1996.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C.R.G.; MYSKIW, J.C. Fear memory. **Physiology Reviews**. Rockville, v. 96, p. 695-750, 2016.

JOHANSEN, J. P.; CAIN, C. K.; OSTROFF, L. E.; LEDOUX, J. E.. Molecular mechanisms of fear learning and memory. **Cell Press**, v. 147, n. 3, p 509-524, out. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411012074?via%3Dihub>.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2 and CPEB. **Molecular Brain**, v.5, n.14, mai. 2012.

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**, v. 107, p. 49-54, 2010.

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

KIM, J.; KWON, J. T.; KIM, J. S.; JOSSELYN, S. A.; HAN, J. H. Memory recall and modifications by activating neurons with elevated CREB. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 65-72, 2014.

KRAWCZYC, M. C.; MILAN, J.; BLAKE, M. G.; FELD, M.; BOCCIA, M. M. Reconsolidation-induced memory persistence: Participation of late phase hippocampal ERK activation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 133, p.79-88, 2016.

KRAWCZYC, M. C.; NAVARRO, N.; BLAKE, M. G.; ROMANO, A.; FELD, M.; BOCCIA, M. M. Relevance of ERK1/2 post-retrieval participation on memory processes: insights in their particular role on reconsolidation and persistence of memories. **Frontiers of molecular neurosciences**, v. 12, n. 35, p.12-95, 2019.

KRYSTAL, J. H.; DAVIS, L.; NEYLAN, T. C.; RASKIND, M. A.; SCHNURR, P.; STEIN, M. B.; VESSICCHIO, J.; SHINER, B; GLEASON, T. D.; HUANG, G. D.. Its time to address the crisis in the pharmacotherapy of post-traumatic stress disorder: a consensus statement of the PTSD psychopharmacology working group. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 51-59, out. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322317313628>

LEDOUX, J. E.. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845062>.

LEE, J. L. C.; NADER, K.; SCHILLER, D. An update on memory reconsolidation updating. **Trends in cognitive sciences**, v. 21, n. 7, p. 531-545, jul. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5605913/>.

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**. V. 8, n. 1, p.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. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 2404-2419, 2009.

LIM, C.; KIM, J.; KWAK, C.; LEE, J.; JANG, E. H.; OH, J.; KAANG, B. β -Adrenergic signaling is required for the induction of a labile state during memory reconsolidation. **Brain Research Bulletin**, v. 141, p. 50-57, jun. 2018.

LINGAWI, N. W.; LAURENTI, V.; WESTBROOK, F. R.; HOLMES, N. M.. The role of the basolateral amygdala and infralimbic cortex in (re)learning extinction. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 302-3012, 2018.

MAREEN, S.. Neurobiology of pavlovian fear conditioning. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 897-931, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520922>.

NADER, K.; EINARSSON, E. O.. Memory reconsolidation: na update. **Annals of New York Academy Sciences**, v. 1191, p. 27-41, mar. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392274>.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, Geneva: Organização das Nações Unidas, 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272596/9789241565585-eng.pdf?ua=1&ua=1>.

PAXINOS , G.; WATSON, C. **The rat brain**. Academic Press: Watham, 7 ed., 2013.

PONNUSAMY, R.; POULOS, A. M.; FANSELOW, M. S.. Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 147, n. 4, p. 919-927, jun. 2007.

POO, M.; PIGNATELLI, M.; RYAN, T. J.; TONEGAWA, S.; BONHOEFFER, T.; MARTIN, K. C.; RUDENKO, A.; TSAI, L.; TSIEN, R. W.; FISHELL, G.; MULLINS, C.; GONÇALVES, T.; SHTRAHMAN, M.; JOHNSTON, S. T.; GAGE, F. H.; DAN, Y.; LONG, J.; BUZSÁKI, G.; STEVENS, C. What is memory? The present state of the engram. **BMC biology**, v. 14, n. 40, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4874022/>

PRICKAERTS, J.; HECKMAN, P. R. A.; BLOCKLAND, A.. Investigational phosphodiesterase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 26, n. 9, p. 1033-1048, set. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28772081>

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J.. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural Brain Research**, v. 84, n. 1-2, p. 241-246, mar. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432896001532?via%3Dihub>

REDISH, A. D.; MIZUMORI, S. J. Y.. Memory and decision making. **Neurobiology and learning memory**, v. 117, p.1-3, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4428655/pdf/nihms680818.pdf>

REHMAN, I.; MAHABADI, N.; REHMAN, C. I.. Classical conditioning. **StatPearls**, jun., 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470326/>

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**, v. 8, n. 91, p. 1-8. 2014.

SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E.. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. **The Journal of Neuroscience**, vol. 20, p. 1-5, 2000. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/20/18/RC96.full.pdf>.

SCHAFE, G. E.; NADER, K.; BLAIR, H. T.; LEDOUX, J. E.. Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 9, p. 540-546, set. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016622360001969X?via%3Dihub>.

SCHECHNER, T.; HONG, M.; BRITTON, J. C.; PINE, D. S.; FOX, N. A.. Fear conditioning and extinction across development: Evidence from human studies and animal models. **Biological psychology**, v. 100, p. 1-12, jul. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4629237/#R57>.

SMITH, N. B.; DORAN, J. M.; SIPPEL, L. M.; HARPAZ-ROTEM, I. Fear extinction and memory reconsolidation as critical components in behavioral treatment for posttraumatic stress disorder and potential augmentation of these processes. **Neuroscience letters**, v. 649, p. 170-175, mai. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030439401730006X?via%3Dihub>.

SOHN, J. M. B.; DE SOUZA, S. T. F.; RAYMUNDI, A. M.; OLIVEIRA, R. M. M. W.; PRICKAERTS, J.; STERN, C. A. J.. Improved extinction persistence requires late-phase cAMP-PKA signaling in the infralimbic cortex. **Neurobiology of learning and memory**, submetido para publicação.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; VANVOSSSEN, A. C.; HAMES, M. S.; BERTOGLIO, L. J. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learning and Memory**, v. 21, n. 2, p. 14-20, fev. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867715/pdf/SternLM032631.pdf>

STERN, C. A. J.; DE CARVALHO, C. R.; BERTOGLIO, L. J.; TAKAHASHI, R. N.. Effects of cannabinoid drugs on aversive or rewarding drug-associated memory extinction and reconsolidation. **Neuroscience**, v. 1, n. 370, p. 62-80, fev. 2018

STERN, S. A.; ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory enhancement. **Wiley and interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 5, n. 1, p. 37-53, jan. 2013.

SUZUKI, A.; JOSSELYN, S. A.; FRANKLAND, P. W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A. J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **Journal of neuroscience**, v. 24, n. 20, p. 4787-4795, mai. 2004. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/content/24/20/4787.long>

TOHGO, I.; PIERCE, K. L.; CHOY, E. W.; LEFKOWITZ, R. J.; LUTRELL, L. M. Beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits

ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9429-9436, 2002.

TRONSON, N. C.; TAYLOR, J. R.. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nature reviews neuroscience**, v. 8, p. 262-275, 2007.

TRONSON, N. C.; WISEMAN, S. L.; NEVE, R. L.; NESTLER, E. J.; OLAUSSON, P.; TAYLOR, J. R.. Distinctive roles for amygdalar CREB in reconsolidation and extinction of fear memory. **Learning and memory**, v. 19, p. 178-181, 2012.

VAN DUINEN, M. A.; SAMBETH, A.; HECKMAN, P. R. A.; SMITH, 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**, v. 131, p. 31-38, mar. 2018. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390817306160?via%3Dihub>

VANMIERLO, T.; CREEMERS, P.; AKKERMAN, S.; DUINEN, M.; SAMBETH, A.; DE VRY, J.; UZ, T.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J.. The PDE4 inhibitor roflumilast improves memory in rodents at non-emetic doses. **Behavioural brain research**, v. 303, p. 26-33, abr. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432816300262?dqid=api_sd_search-api-endpoint

VILLAIN, H.; BENKAHOUT, A.; BIRMES, P.; FERRY, B.; ROULLET, P. Influence of early stress on memory reconsolidation: implications for post-traumatic stress disorder treatment. **PLoS One**, v. 13, n.1, jan. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5774817/>.

WALTEREIT, R. e WELLER, M. Signalling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. **Molecular neurobiology**, v. 27, p. 99-107, 2003.

YEHUDA, R.; HOGE, C. W.; MCFARLANE, A. C.; VERMETTEN, E.; LANIUES, R. A.; NIEVERGELT, C. M.; HOBFOLL, S. E.; HOENEN, K. C.; NEYLAN, T. C.; HYMAN, S. E.. Post-traumatic stress disorder. **Nature reviews disease primers**, v. 1, out. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201557>.

ZHANG, H.; ZHAO, Y.; HUANG, Y.; DORAIRAJ, N. R.; CHANDLER, L. J.; O'DONELL, J. M.. Inhibition of the Phosphodiesterase 4 (PDE4) Enzyme Reverses Memory Deficits Produced by Infusion of the MEK Inhibitor U0126 into the CA1 Subregion of the Rat Hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 1432–1439, 2004.