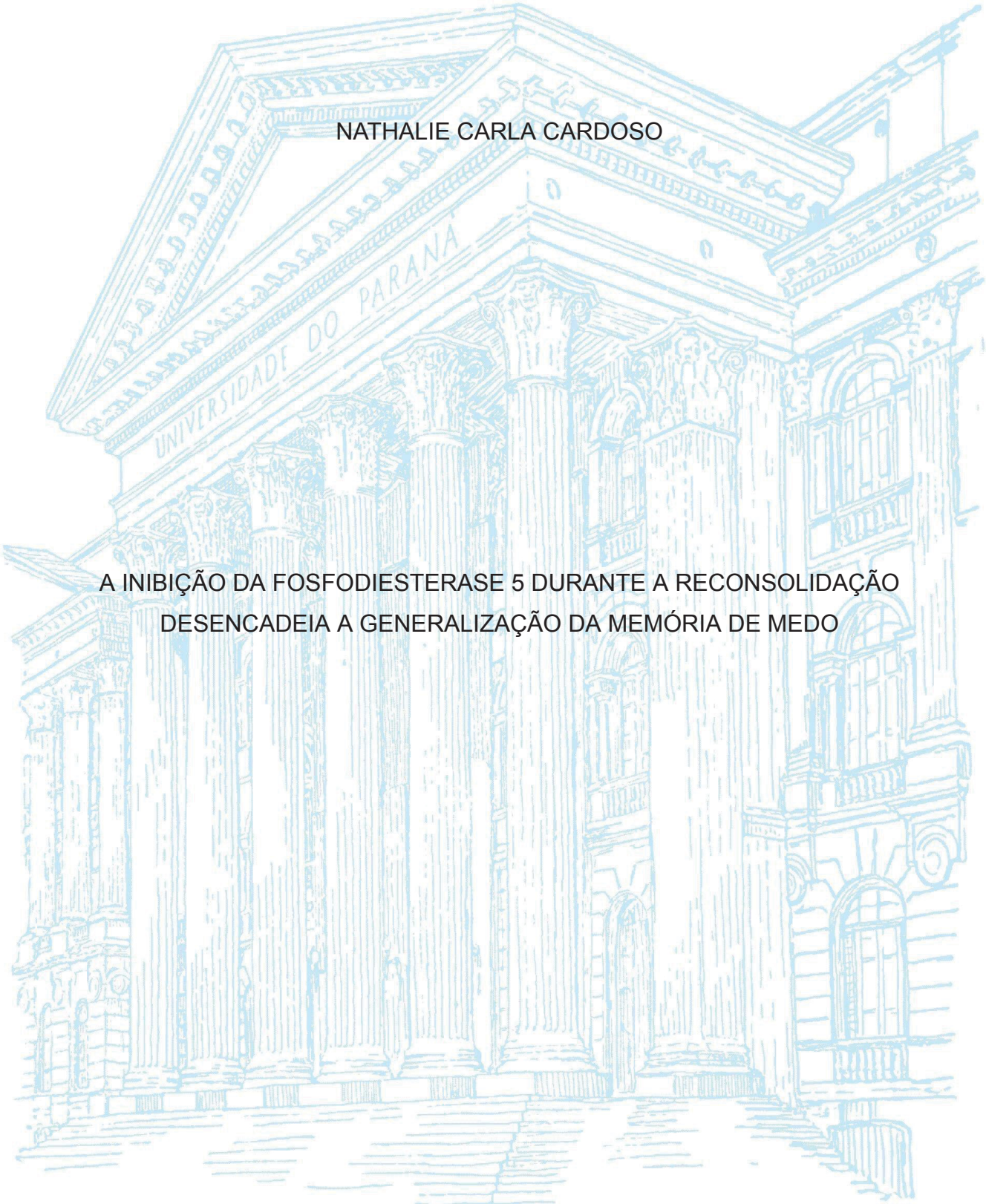
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHALIE CARLA CARDOSO



A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 5 DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO DESENCADEIA A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

CURITIBA

2024

NATHALIE CARLA CARDOSO

A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 5 DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO DESENCADEIA A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

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: Profª. Dra. Cristina A. Jark Stern
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Gazarini

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Cardoso, Nathalie Carla
A inibição da fosfodiesterase 5 durante a reconsolidação desencadeia a generalização da memória de medo / Nathalie Carla Cardoso. – Curitiba, 2024.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
Orientadora: Profª. Dra. Cristina A. Jark Stern.
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Gazarini.

1. Inibidores de fosfodiesterase. 2. Neurônios nitrérgicos. 3. Giro do cíngulo. 4. Memória. 5. Medo. I. Stern, Cristina A. J. II. Gazarini, Lucas. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATHALIE CARLA CARDOSO** intitulada: **A INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 5 DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO DESENCADEIA A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO**, sob orientação da Profa. Dra. CRISTINA APARECIDA JARK STERN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 30 de Agosto de 2024.

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 15:57:48.0
CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 09:20:36.0
QUELEN IANE GARLET
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 14:11:15.0
SABRINA FRANCESCA DE SOUZA LISBÔA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profª Drª Cristina Stern e ao meu coorientador Prof. Dr. Lucas Gazarini, por todo o suporte, orientação e contribuições essenciais ao longo deste trabalho. Sou grata também por todo o apoio ao longo da minha jornada acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, pela colaboração que permitiu a aquisição dos vetores virais, essenciais para parte desta pesquisa. À Profª Drª Lyvia Lintzmaier Petiz por sua assistência com a técnica de quimiogenética. Ao técnico Israel Henrique Bini pelo suporte na obtenção na microscopia do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência - UFPR (Ctaf).

À toda a equipe do Fear Memory Lab: Ana Maria, Bruna, Jeferson, Mariana Furtado, Letícia Ramalho, Daiane, Gabriel, Mayara, Mateus e Manoela. Em especial à Ana Maria que me ensinou muito no mestrado, agradeço por toda a parceria na padronização de técnicas, por ler e reler as minhas coisas como se fossem suas e por tornar toda a rotina muito mais leve com a sua companhia. Além de toda a ajuda no dia a dia, sou especialmente grata ao Mateus, por dividir a mesma sinapse comigo por tanto tempo, e a Manoela, por ser um abraço para o meu coração, meus dias são muito mais divertidos com a amizade de vocês.

À minha família, em especial a minha irmã Stephanie e ao meu cunhado e padrinho Vinicius por todo o carinho e apoio, por acreditarem em mim e me darem forças para eu nunca desistir dos meus sonhos. À minha mãe, por sua presença, carinho e conselhos durante este período. Ao meu pai, pela base sólida que perpetua até hoje. Aos demais familiares que sempre me incentivaram e estiveram presentes.

Agradeço ao meu namorado Lucas por todo o amor, companheirismo, compreensão e ajuda, por estar comigo em cada comemoração e em cada momento difícil. Esse processo foi muito mais leve e a vida muito mais divertida com você ao meu lado. À Letícia Dalla Vechia por ser incentivo, ensinamento e conforto, e aos demais amigos que fazem da minha vida mais feliz e leve. À minha psicóloga por todo o suporte que vai além do âmbito profissional, que foi e é essencial em muitos aspectos da minha vida.

Agradeço à Deus e à Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, a quem recorri em muitas novenas, e quem me concedeu força, sabedoria e paciência em todo o processo.

Agradeço à CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro. Adicionalmente, à CAPES e à FINEP agradeço por fornecerem financiamento para os equipamentos de microscopia no Ctaf.

À todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho e para minha formação.

“...Enquanto o tempo leva a vida embora como vento,
a memória traz de volta o que realmente importa…”

O que a memória ama, fica eterno - Adélia Prado

RESUMO

A generalização da memória de medo é caracterizada pelo prejuízo da capacidade de discriminar estímulos de perigo e de segurança, uma característica marcante de transtornos psiquiátricos, como o transtorno do estresse pós-traumático. A discriminação de contextos é facilitada pelo processo de separação de padrão, que minimiza a sobreposição entre os traços de memória que representam experiências semelhantes. A superconsolidação da memória de medo e o prejuízo na separação de padrão são fatores associados à generalização do medo. Além disso, com o tempo, as memórias tendem a se tornar mais generalizadas, um processo dependente do córtex cingulado anterior (CCA). Interferências nos processos de consolidação e reconsolidação da memória também influenciam a generalização do medo. Entretanto, a reconsolidação, processo induzido pela evocação da memória, ainda é pouco investigada neste sentido. Molecularmente, a via de sinalização do óxido nítrico e do GMPc tem sido implicada na generalização, pois seu aumento favorece respostas generalizadas de medo. A atividade da fosfodiesterase 5 (PDE5) regula a via do GMPc, mas ainda não está claro se a atividade da PDE5 durante a reconsolidação afeta a generalização da memória de medo. Esse trabalho teve como objetivo investigar se a inibição da PDE5 durante a reconsolidação recente afeta a generalização da memória de medo ao longo do tempo. Para isso, ratos *Wistar* machos adultos foram submetidos ao condicionamento de medo ao contexto e receberam veículo ou vardenafil (VAR; inibidor seletivo de PDE5) 0,3 ou 1 mg/kg i.p. 5 minutos após a evocação da memória recente. Grupos independentes de animais foram testados no contexto condicionado (Teste A) e, no dia seguinte, em um contexto neutro (Teste B) nos pontos de tempo recente, intermediário ou remoto, 1, 12 ou 21 dias após a evocação, respectivamente. Três dias após o Teste B foi realizado o teste de separação de padrão de objetos (SPO). A inibição da PDE5 durante a reconsolidação não alterou a expressão da memória de medo no Teste A, mas induziu a generalização nos pontos de tempo intermediário e remoto, observada pelo aumento do congelamento nos grupos VAR 1 durante o Teste B. Nenhum efeito foi observado para os testes no ponto de tempo recente. Além disso, foi observado um prejuízo no SPO no grupo VAR 1 quando avaliado no ponto de tempo remoto, sugerindo um prejuízo na separação de padrão. Esses efeitos não foram observados quando a evocação foi omitida ou a administração foi feita fora da janela de reconsolidação (6 horas após a evocação). A inibição quimiogenética do CCA durante a reconsolidação recente preveniu os efeitos da inibição da PDE5 no ponto de tempo remoto, sugerindo que a atividade do CCA é necessária para que a inibição da PDE5 durante a reconsolidação recente desencadeie a generalização da memória de medo ao longo do tempo. Em conjunto, esses resultados sugerem que a inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória recente recruta a atividade do CCA, levando à generalização da memória de medo e ao prejuízo da separação de padrão ao longo do tempo.

Palavras-chave: inibidores de fosfodiesterase; via nitrérgica; separação de padrão; córtex cingulado anterior.

ABSTRACT

Fear memory generalization is characterized by the impaired ability to discriminate between unsafe and safe stimuli, a feature of psychiatric disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD). Context discrimination is facilitated by the pattern separation process, which minimizes the overlap between memory traces that represent similar experiences. Fear memory overconsolidation and impaired pattern separation can contribute to fear generalization. Moreover, over time, memories tend to become more generalized, a process dependent on the anterior cingulate cortex (ACC). Interfering with consolidation and reconsolidation processes can also induce fear generalization. However, reconsolidation, a process induced by memory recall, is still less investigated in this context. The nitric oxide and cGMP signaling pathway has been implicated in generalization, as increasing your signaling contributes to generalized fear responses. The activity of phosphodiesterase 5 (PDE5) regulates the cGMP pathway, but it is still unclear whether PDE5 activity during reconsolidation is involved in fear memory generalization. This study aimed to investigate whether the inhibition of PDE5 during recent reconsolidation affects the generalization of fear memory over time. Thus, adult male Wistar rats were submitted to contextual fear conditioning and received vehicle or vardenafil (VAR; a selective PDE5 inhibitor) at 0.3 or 1 mg/kg i.p. 5 minutes after recent memory retrieval. Independent groups of animals were tested in the conditioned context (Test A) and, the following day, in a neutral context (Test B) at recent, intermediate, or remote time points, 1, 12, or 21 days after retrieval, respectively. The object pattern separation (OPS) test was performed three days after Test B. PDE5 inhibition during reconsolidation did not change the fear memory expression in Test A, but induced generalization at intermediate and remote time points, observed by increased freezing in the VAR 1 groups during Test B. No effect was observed in tests at the recent time point. Additionally, impairment in OPS was observed in the VAR 1 group when evaluated at the remote time point. These effects were not observed when retrieval was omitted or administration was done outside the reconsolidation window (6 hours after retrieval). Chemogenetic inhibition of the ACC during recent reconsolidation prevented the effects of PDE5 inhibition at the remote time point, suggesting that ACC activity is necessary for PDE5 inhibition during recent reconsolidation to trigger the generalization of fear memory over time. These results suggest that PDE5 inhibition during the reconsolidation of recent memory recruits ACC activity, triggering fear memory generalization and impairing pattern separation over time.

Key-words: phosphodiesterase inhibitors; nitrergic pathway; pattern separation; anterior cingulate cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A memória classificada em declarativa e não declarativa, com seus subtipos. 13

Figura 2. O condicionamento de medo ao contexto. 14

Figura 3. A memória classificada quanto à sua duração. 15

Figura 4. Os processos de memória ilustrados a nível de engrama. 18

Figura 5. O processo de reconsolidação e extinção da memória aversiva. 20

Figura 6. A generalização no condicionamento de medo ao contexto. 27

Figura 7. O processo de consolidação sistêmica. Ilustração representando a alocação de uma memória de medo contextual em ratos. 29

Figura 8. Via de sinalização do GMPc no neurônio pré- e pós-sináptico. 30

Figura 9. Ilustração representando o delineamento do protocolo de separação de padrão de objetos (SPO). 37

Figura 10. Representação da expressão viral para a inibição quimiogenética. 39

Figura 11. Desenho experimental adotado no experimento 1. 40

Figura 12. Desenho experimental adotado no experimento 2. 41

Figura 13. Desenho experimental adotado no experimento 3. 41

Figura 14. Desenho experimental adotado no experimento 4. 42

Figura 15. Desenho experimental adotado no experimento 5. 43

Figura 16. Efeitos da inibição da PDE5 5 minutos após a evocação na generalização da memória. 45

Figura 17. Efeitos da inibição da PDE5 5 minutos após a evocação da memória de medo no teste de separação de padrão de objetos (SPO). 48

Figura 18. Efeitos da inibição da PDE5 após uma sessão de não-evocação. 50

Figura 19. Efeitos da inibição da PDE5 6 horas após a evocação. 52

Figura 20. Efeitos da inibição da PDE5 sob a inibição quimiogenética do CCA. 53

Figura 21. Possível mecanismo de participação do CCA na generalização dependente do tempo desencadeada pela inibição da PDE5. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA – Análise de variância
AMPA – Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiônico
BDNF – Fator neurotrófico derivado de cérebro
BLA – Amígdala basolateral
CAMKII – Proteína quinase II dependente de cálcio
CCA – Córtex cingulado anterior
CeA – Núcleo central da amígdala
CREB – Proteína de ligação do elemento responsivo ao AMPc
C21 – Composto 21
CPFm – Córtex pré-frontal medial
DSM-V – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5
DREADD – *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*
EC – Estímulo condicionado
EI – Estímulo incondicionado
ERK – Quinase regulada por sinal extracelular
EPM – Erro padrão da média
GD – Giro denteado
GC – Guanilil Ciclase
GCs – Guanilil Ciclase solúvel
GMP – Guanosina monofosfato
GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico
HD – Hipocampo dorsal
HV – Hipocampo ventral
ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LTD – Depressão de longa duração
LTP – Potenciação de longa duração
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
PDE – Fosfodiesterase
PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PKG – Proteína quinase G

PBS – Tampão salina-fosfato

PFA – Paraformaldeído

PSD-95 – *Postsynaptic Density Protein 95*

RC – Resposta condicionada

RI – Resposta incondicionada

SPO – Separação de padrão de objetos

TEPT – Transtorno do Estresse Pós-Traumático

VAR – Vardenafil

VEI – Veículo

η^2 – Eta quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **13**
1.1 A MEMÓRIA: CONCEITOS, TIPOS E PROCESSOS 13
1.1.1 Os tipos de memória 13
1.1.2 A consolidação da memória 17
1.1.3 A reconsolidação da memória 19
1.1.4 A extinção da memória 21
1.2 A MEMÓRIA DE MEDO 22
1.2.1 Regiões cerebrais envolvidas no processamento da memória de medo 22
1.3 O TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO 24
1.4 A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO 27
1.5 A VIA DE SINALIZAÇÃO ÓXIDO NÍTRICO/GMPc 30
1.5.1 As Fosfodiesterases 32
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS **34**
2.1 HIPÓTESE 34
2.2 OBJETIVOS 34
2.2.1 Objetivo Geral 34
2.2.2 Objetivos Específicos 34
3 MATERIAL E MÉTODOS **35**
3.1 ANIMAIS 35
3.2 DROGAS 35
3.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO 35
3.4 SEPARAÇÃO DE PADRÃO DE OBJETOS 37
3.5 INIBIÇÃO QUIMIOGENÉTICA 38
3.6 ETAPAS EXPERIMENTAIS 41
3.6.1 Experimento 1: Avaliação dos efeitos da inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo na generalização ao longo do tempo 41
3.6.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos da inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo no processo de separação de padrão ao longo do tempo 41
3.6.3 Experimento 3: Avaliação da omissão da evocação sobre os efeitos induzidos pela inibição da PDE5 42
3.3.4 Experimento 4: Avaliação dos efeitos da inibição da PDE5 fora da janela de reconsolidação da memória de medo 43
3.6.5. Experimento 5: Avaliação da inibição quimiogenética do CCA sobre os efeitos induzidos pela inibição da PDE5 43
3.7 ESTATÍSTICA 44

4 RESULTADOS **45**
4.1 EXPERIMENTO 1: A INIBIÇÃO DA PDE5 APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO INDUZ UMA GENERALIZAÇÃO DEPENDENTE DO TEMPO 45
4.1.1 A inibição da PDE5 5 minutos após a evocação não afeta a reconsolidação ou generalização da memória de medo nos testes recentes 45
4.1.2 A inibição da PDE5 5 minutos após a evocação induz a generalização da memória de medo em um ponto de tempo intermediário 47
4.1.3 A inibição da PDE5 5 minutos após a evocação induz a generalização da memória de medo em um ponto de tempo remoto 47
4.2 EXPERIMENTO 2: A INIBIÇÃO DA PDE5 APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO PREJUDICA O PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE PADRÃO AVALIADO EM UM PONTO DE TEMPO REMOTO 48
4.3 EXPERIMENTO 3: OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 NA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E NA SEPARAÇÃO DE PADRÃO DEPENDEM DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA 50
4.3.1 A omissão da evocação previne a generalização induzida pela inibição da PDE5 no ponto de tempo intermediário 50
4.3.2 A omissão da evocação previne a generalização e o prejuízo da separação de padrão induzidos pela inibição da PDE5 no ponto de tempo remoto 51
4.4 EXPERIMENTO 4: A INIBIÇÃO DA PDE5 6 HORAS APÓS A EVOCAÇÃO NÃO AFETA A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E NEM A SEPARAÇÃO DE PADRÃO 52
4.5 EXPERIMENTO 5: OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 NA GENERALIZAÇÃO E NA SEPARAÇÃO DE PADRÃO SÃO PREVENIDOS PELA INIBIÇÃO QUIMIOGENÉTICA DO CCA 53
5 DISCUSSÃO **56**
5.1 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO RECENTE NA GENERALIZAÇÃO AO LONGO DO TEMPO 56
5.2 O EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO RECENTE NA SEPARAÇÃO DE PADRÃO 60
5.3 A PARTICIPAÇÃO DO CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 61
5.4 LIMITAÇÕES 64
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 65
6 CONCLUSÃO **67**
REFERÊNCIAS **68**
APÊNDICE **83**

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MEMÓRIA: CONCEITOS, TIPOS E PROCESSOS

A memória é a capacidade de conservar informações aprendidas para serem evocadas e utilizadas posteriormente (Kandel *et al.*, 2014; Bear; Connors; Paradiso, 2017). Esse conjunto de informações aprendidas e armazenadas, ou seja, o acervo de memórias, torna cada indivíduo único e determina sua personalidade (Izquierdo, 2018). Entretanto, a memória não é um fenômeno único. Existem diferentes tipos de memória, que podem ser classificadas quanto à sua natureza ou à sua duração, em declarativas ou não declarativas e de curta e longa duração, respectivamente (Squire, 1986).

1.1.1 Os tipos de memória

Memórias declarativas são aquelas evocadas conscientemente (de maneira explícita) e que armazenam fatos e eventos autobiográficos (memória episódica) e conceitos (memória semântica), como representado na Figura 1. A memória declarativa episódica pode ser avaliada em roedores por meio dos testes de **reconhecimento e localização de objetos**, baseando-se em seu comportamento inato de explorar mais objetos novos, objetos que mudaram de lugar ou que foram conhecidos há mais tempo (Ennaceur; Delacour, 1988; Dix; Aggleton, 1999; Lent, 2023).

Por outro lado, **memórias não declarativas** são, em geral, evocadas implicitamente, sem a necessidade de percepção consciente (Bear; Connors; Paradiso, 2017; Izquierdo, 2018; Lent, 2023). Estão inclusas memórias não associativas, como habituação e sensibilização, e memórias do tipo procedural, de maior importância para o presente trabalho. A **memória procedural** abrange habilidades motoras, hábitos e comportamentos (Bear; Connors; Paradiso, 2017). A formação de memórias procedurais pode ocorrer através do aprendizado associativo, que envolve a formação de associações entre eventos (Bear; Connors; Paradiso, 2017; Izquierdo, 2018). Este processo é exemplificado pelo condicionamento clássico, descoberto por Pavlov (1927), e pelo condicionamento operante, desenvolvido inicialmente por Skinner (1938), como ilustrado na Figura 1.

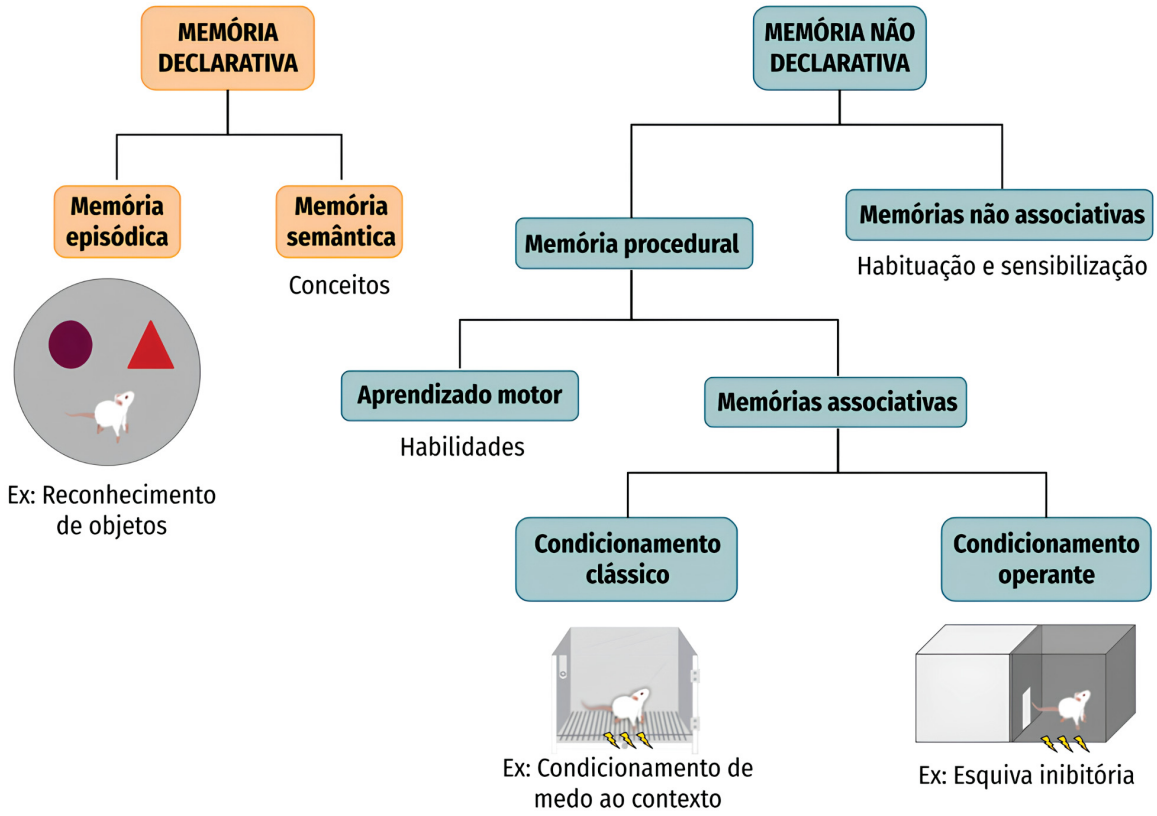


Figura 1. A memória classificada em declarativa e não declarativa, com seus subtipos. Os exemplos abordados retratam protocolos para roedores que podem avaliar o subtipo de memória em questão. FONTE: A autora (2024).

O **condicionamento clássico** (ou pavloviano) envolve a associação entre dois estímulos: um neutro e outro biologicamente relevante (Pavlov, 1927). O estímulo biologicamente relevante é chamado de estímulo incondicionado (EI) e é interpretado de maneira inata como aversivo ou prazeroso. A resposta natural que ele gera é conhecida como resposta incondicionada (RI). Durante o condicionamento, ou sessão de aprendizado, o estímulo neutro é apresentado junto com o EI, fazendo com que o estímulo neutro passe a provocar uma resposta semelhante à do EI. Esta nova resposta é chamada de resposta condicionada (RC). O estímulo neutro, após ser associado ao EI, passa a ser denominado estímulo condicionado (EC). Em animais, um exemplo de protocolo de condicionamento clássico é o **condicionamento de medo ao contexto** (**CMC**), que utiliza um EI aversivo para estudar a memória associativa de medo. No CMC, um choque (EI) que provoca a RI de congelamento é associado ao contexto (estímulo inicialmente neutro), fazendo com que os animais expressem congelamento (RC) quando

expostos novamente apenas ao contexto (EC), como ilustrado na Figura 2 (Bear; Connors; Paradiso, 2017; Izquierdo, 2018).

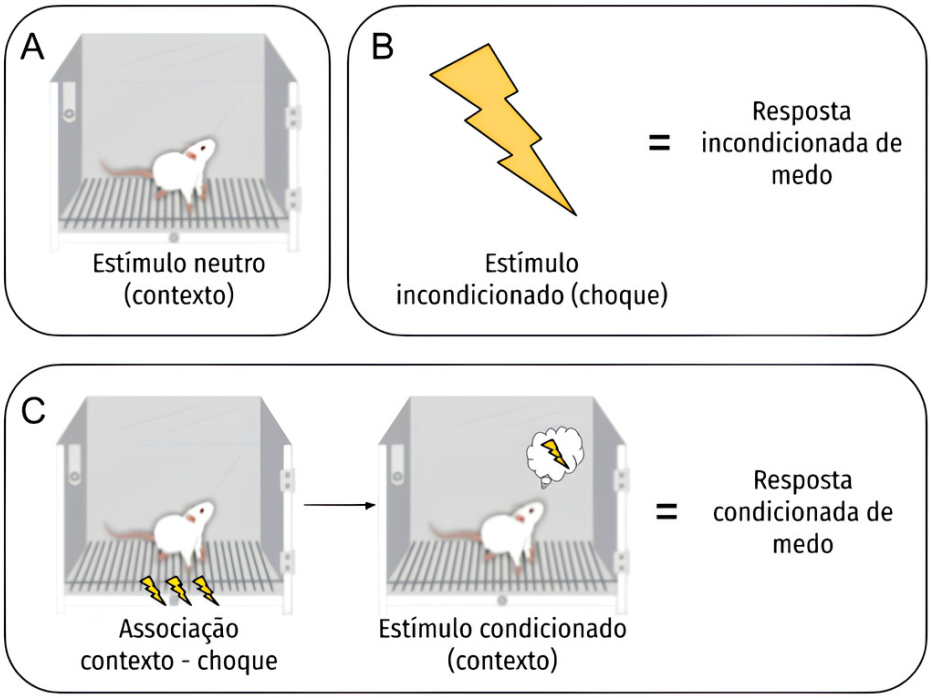


Figura 2. O condicionamento de medo ao contexto. **A)** O contexto é um estímulo inicialmente neutro, pois não leva a nenhuma resposta inata de medo. **B)** O choque é naturalmente aversivo, sendo utilizado como estímulo incondicionado, por levar a uma resposta incondicionada de medo. **C)** Durante o condicionamento, os dois estímulos são associados, fazendo com que o contexto (estímulo condicionado) passe a remeter ao choque numa posterior exposição, levando a resposta condicionada de medo. FONTE: A autora (2024).

O **condicionamento operante** (ou instrumental) envolve o aprendizado de que um comportamento específico resulta em uma consequência (Skinner, 1938). Mais precisamente, o indivíduo aprende a usar uma resposta condicionada como instrumento para alcançar uma recompensa ou para evitar um estímulo aversivo. A **esquiva inibitória** e a **esquiva ativa** são exemplos de protocolos de condicionamento operante que envolvem estímulos incondicionados aversivos (Izquierdo, 2018). Na esquiva inibitória, o animal aprende a inibir um comportamento para evitar um choque como, por exemplo, não passar para o lado da caixa associado ao choque. Já na esquiva ativa, o animal aprende a executar um comportamento para evitar o estímulo aversivo, como subir em uma plataforma (Lent, 2023).

As memórias também podem ser classificadas quanto à sua duração, conforme esquematizado na Figura 3. A maior parte das informações que

experimentamos diariamente é mantida apenas temporariamente, como **memórias de curta duração**, que se formam logo após a aquisição e têm uma duração de até 6 horas (Izquierdo *et al.*, 1999). No caso de informações com maior relevância, esse período de duração coincide com o tempo necessário para que, paralelamente, sejam consolidadas as **memórias de longa duração**, que serão mantidas por dias, meses ou anos (Izquierdo *et al.*, 1999; Mcgaugh, 2000; Izquierdo, 2018). As memórias de longa duração que perduram por um curto período são chamadas de **memórias recentes**, enquanto as que perduram por períodos extensos são chamadas de **memórias remotas**. É importante ressaltar que as memórias de curta e de longa duração requerem as mesmas estruturas, mas envolvem mecanismos próprios e distintos (Izquierdo *et al.*, 1998, 1999; Mcgaugh, 2000).

Além disso, um outro tipo de memória, completamente distinta, é a **memória de trabalho** (ou memória operacional). Esse tipo de memória é utilizado para manter a informação que está sendo processada no momento apenas por poucos segundos e, sendo assim, não deixa traços e não exige uma base de sustentação bioquímica (Baddeley, 1992; Goldman-Rakic, 1995; Cowan, 2008). Em um diálogo, por exemplo, a memória de trabalho é necessária para armazenarmos temporariamente as palavras faladas até que elas formem uma frase que faça sentido.

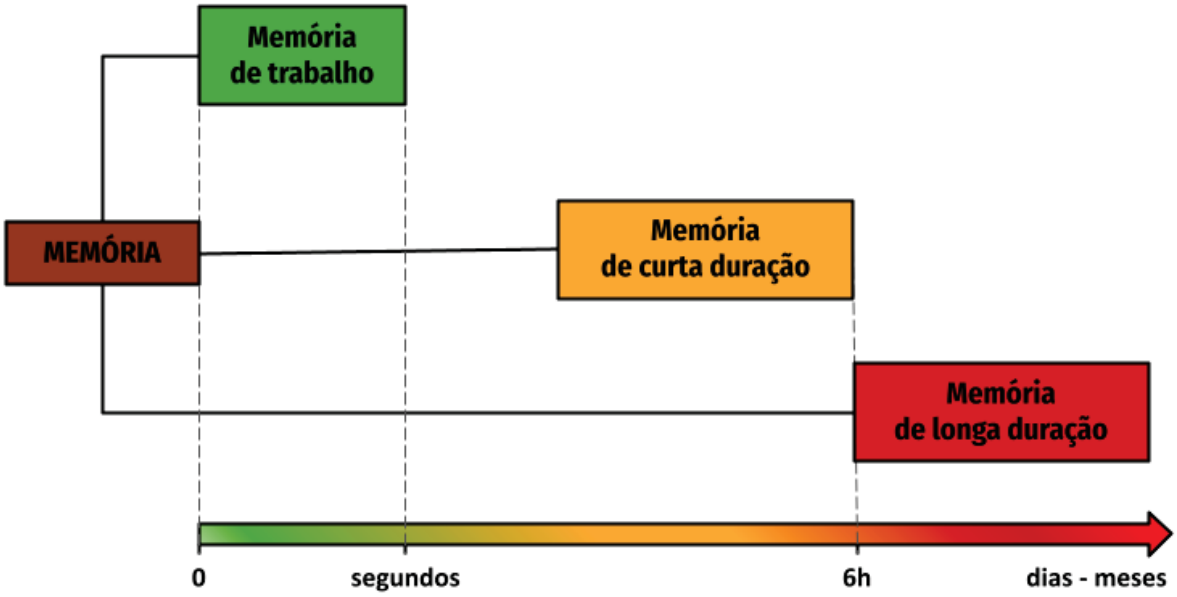


Figura 3. A memória classificada quanto à sua duração. As cores indicam o tempo de duração de cada tipo de memória, com verde representando a menor duração e vermelho a maior duração. A seta inferior especifica o tempo de duração. A memória de longa duração se forma 6 horas após a aquisição, tempo necessário para o processo de consolidação. FONTE: A autora (2024).

A partir da descoberta de que o traço da memória de longa duração é lábil e suscetível a interferências nas primeiras horas após a aquisição, começaram a ser desvendados os mecanismos necessários para sua estabilização através do processo de consolidação da memória, postulado inicialmente por Müller e Pilzecker, em 1900 (Bear; Connors; Paradiso, 2017).

1.1.2 A consolidação da memória

Santiago Ramón y Cajal, no início do século XX, sugeriu que a **consolidação da memória** se baseia no fortalecimento das conexões sinápticas entre os neurônios ativados para codificar uma determinada informação, formando o traço de memória (Ramón y Cajal, 1911). Posteriormente, Donald Hebb aprimorou essa ideia ao afirmar que a sinapse entre dois neurônios é fortalecida quando o neurônio pré-sináptico e o neurônio pós-sináptico se ativam simultaneamente, formulando a "regra de Hebb" (Hebb, 1949). Terje Lømo observou experimentalmente que sinapses glutamatérgicas da via perforante do hipocampo de coelhos exibiam **potenciação de longa duração** (**LTP**, do inglês *long term potentiation*), um processo eletrofisiológico que validou a regra de Hebb na prática (Lømo, 1966; Bliss, Lømo, 1973). Posteriormente, foi descrita a **depressão de longa duração** (**LTD**, do inglês *long term depression*), em que a estimulação de baixa frequência pode induzir uma diminuição duradoura na força sináptica (Abraham; Goddard, 1983). A LTP e a LTD são mecanismos de plasticidade sináptica que se mostraram importantes para os processos de memória. Mais especificamente, foi demonstrado que interferir na LTP afeta a aquisição, a consolidação e a evocação de memórias em modelos animais (Morris *et al.*,1986; Izquierdo; Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 1999).

A ativação simultânea do neurônio pré-sináptico e do neurônio pós-sináptico é detectada pelo receptor glutamatérgico **NMDA** (N-metil-D-aspartato; detector de coincidências; Bliss; Collingridge, 1993). Isso ocorre porque a ativação do receptor NMDA depende não apenas da liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico (mediada pela despolarização deste neurônio), mas também da remoção dos íons Mg^{2+} que bloqueiam o canal do receptor, que ocorre mediante à despolarização da membrana pós-sináptica (Lent, 2023). A membrana pós-sináptica pode ser despolarizada pela ativação do receptor glutamatérgico **AMPA** (ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiônico), que leva ao influxo de Na^{+}

(Izquierdo, 2018). Ou seja, quando a despolarização do neurônio pré-sináptico ocorre por um período suficiente para despolarizar a membrana pós-sináptica enquanto ainda está ocorrendo a liberação de glutamato, os íons Mg^{2+} são removidos ao mesmo tempo que o glutamato se liga aos receptores NMDA que, abertos, permitem a entrada de íons Ca^{2+}. Em algumas regiões cerebrais, receptores glutamatérgicos metabotrópicos também contribuem para o aumento de Ca^{2+} intracelular (Izquierdo, 2018). Um aumento considerável nos níveis de Ca^{2+} intracelular é o **sinal para indução da LTP** (Bliss; Collingridge, 1993).

Esse aumento nos níveis de Ca^{2+} estimula direta ou indiretamente proteínas quinases, como as cálcio/calmodulina-dependentes (CaMKII, III e IV), cálcio-dependentes (PKC, do inglês, *Protein Kinase C*), dependentes do GMPc (**PKG**, do inglês, *Protein Kinase G*), dependentes do AMPc (PKA, do inglês, *Protein Kinase A*) e as ativáveis extracelularmente (ERK, do inglês, *Extracellular signal-Regulated Kinase*; Malenka; Bear, 2004). De maneira geral, as proteínas quinases promovem o aumento da liberação pré-sináptica de glutamato, o aumento da ancoragem de receptores AMPA na membrana pós-sináptica, a ativação de fatores de transcrição como o **CREB** (do inglês *cAMP responsive-element binding protein*) e a síntese de proteínas relacionadas à plasticidade que podem, por exemplo, promover o aumento dos contatos sinápticos (Bernabeu *et al.*, 1997; Finkbeiner *et al.*, 1997; Mcgaugh, 2000; Malinow; Malenka, 2002; Malenka; Bear, 2004). Desse modo, quando o neurônio pré-sináptico for novamente ativado, após a LTP, a despolarização que ele produzirá no neurônio pós-sináptico será maior do que a gerada antes (Lent, 2023).

Por outro lado, uma estimulação de baixa frequência resulta em pequenos aumentos nos níveis de Ca^{2+} intracelular pelos receptores NMDA e caracteriza o **sinal para indução da LTD** (Malenka; Bear, 2004). O pequeno aumento de Ca^{2+} leva ao recrutamento de fosfatases que sinalizam para a internalização de receptores AMPA da membrana pós-sináptica (Malinow; Malenka, 2002).

Os mecanismos que levam à consolidação da memória facilitam a ativação simultânea dos grupos de neurônios recrutados durante a aquisição, como ilustrado na Figura 4. Esse conjunto de neurônios que representa a memória é denominado **engrama** (Lent, 2023). A evocação da memória, em nível neuronal, ocorre por meio da reativação do engrama, que armazena a informação original. No entanto, a reativação pode resultar na **desestabilização** (ou labilização) da memória,

trazendo-a novamente a um estado suscetível a interferências (Izquierdo, 2018). Para garantir a sua estabilidade, são recrutados novos mecanismos moleculares, através do processo denominado reconsolidação da memória (Nader; Schafe; LeDoux, 2000; Ressler; Mayberg, 2007; Kida, 2019).

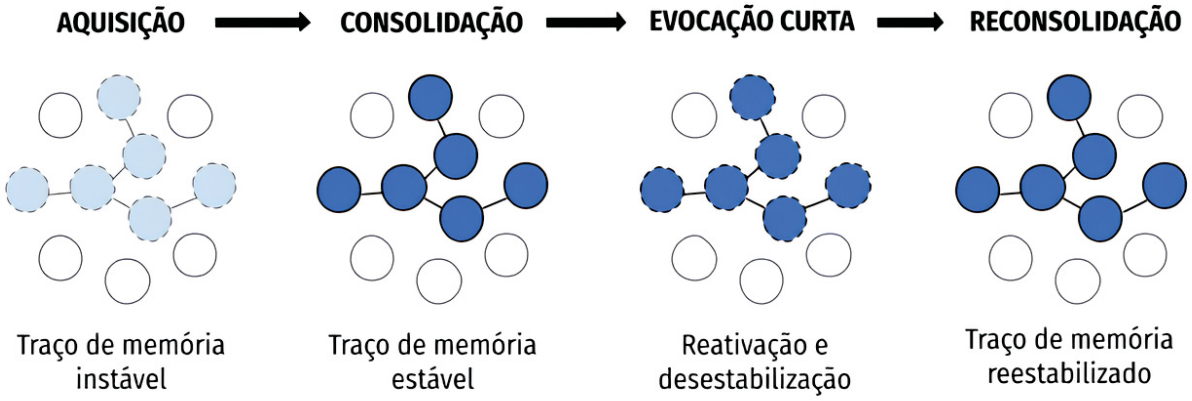


Figura 4. Os processos de memória ilustrados a nível de engrama. Abaixo de cada etapa, o conjunto de círculos conectados representa de maneira esquemática o traço de memória, ou engrama, naquele momento. FONTE: A autora (2024).

1.1.3 A reconsolidação da memória

A **reconsolidação da memória** foi proposta em 1997 por Przybyslawski e Sara. Neste trabalho, os autores mostraram que, em ratos, uma memória espacial já consolidada poderia sofrer modificações após a evocação (Przybyslawski; Sara, 1997). Desde então, a reconsolidação foi relatada em diferentes tipos de memórias (declarativa e não declarativa; aversiva e apetitiva) e em diversos organismos, desde invertebrados até humanos (Alberini; LeDoux, 2013).

Bem como a consolidação, a reconsolidação também requer expressão gênica e depende de mecanismos que ocorrem numa janela de **6 horas de duração** (Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016; Kida, 2019). Entretanto, é importante ressaltar que a reconsolidação não consiste no mero restabelecimento da consolidação, mas sim em um novo e distinto processo que permite uma **atualização** do aprendizado inicial (Nader; Schafe; LeDoux, 2000; Alberini; LeDoux, 2013; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016). Por exemplo, há o recrutamento de proteínas quinases como PKA e PKC, do fator de transcrição CREB, e a transcrição de proteínas relacionadas à plasticidade, como o BDNF (do inglês, *brain-derived neurotrofic factor*) (Kida *et al.*, 2002; Izquierdo, 2018; Gonzalez; Radiske; Cammarota, 2019). Além disso, as regiões

cerebrais recrutadas para a reconsolidação variam entre memórias recentes e remotas (Makino *et al.*, 2019; da Silva *et al.*, 2020).

A reconsolidação apresenta um conjunto de limitações, conhecidas como ***boundary conditions***, que determinam a ocorrência ou não desse processo em determinadas situações (Lee, 2009; Nader; Hardt, 2009; Dudai, 2012). Entre essas limitações estão a força, a idade da memória e o fator novidade. De maneira geral, memórias mais intensas e mais antigas tendem a ser mais resistentes à reconsolidação (Nader; Hardt, 2009; Alberini; LeDoux, 2013). Além disso, a presença de uma novidade durante a evocação é necessária para que a reconsolidação aconteça, pois sem um elemento novo, não haveria necessidade de induzir um processo visando sua atualização (Lee, 2009; Nader; Hardt, 2009).

A memória pode ser tanto aprimorada quanto prejudicada durante a reconsolidação (Lee, 2009; Dudai, 2012). Com isso, ao retornar a memória a um estado lábil, surge a possibilidade de interferência em uma memória consolidada, trazendo implicações comportamentais e clínicas relevantes. Isto significa que esse processo oferece a oportunidade de utilizar estratégias que busquem intervir em uma memória, por exemplo, de modo a torná-la mais adaptativa (Diergaarde; Schoffelmeer; De Vries, 2008; Raymundi *et al.*, 2023). Por isso, a reconsolidação tem sido considerada um processo promissor para a investigação de tratamentos capazes de atenuar de forma eficiente as memórias aversivas (Stern *et al.*, 2012; Alberini; LeDoux, 2013; Bear; Connors; Paradiso, 2018). Contudo, pouco se sabe sobre o papel dos mecanismos da reconsolidação em contribuir para a manutenção de memórias aversivas mal-adaptativas, como ocorre em alguns transtornos psiquiátricos.

Entretanto, se tratando de memórias procedurais formadas mediante aprendizado associativo, a depender do **tempo de evocação**, pode ser desencadeado um processo completamente diferente da reconsolidação (Ressler; Mayberg, 2007; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016; Kida, 2019). Para esse tipo de memória, a evocação é desencadeada pela exposição ao EC na ausência do EI. Desse modo, quando ocorre uma **evocação curta**, ou seja, a exposição ao EC por um curto período de tempo, de fato ocorre a reconsolidação, como discutido até aqui. Por outro lado, a exposição prolongada ou repetida ao EC induz a um novo aprendizado: o processo de extinção da memória associativa, como ilustrado na Figura 5 (Pavlov, 1927; Kandel *et al.*, 2014; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016).

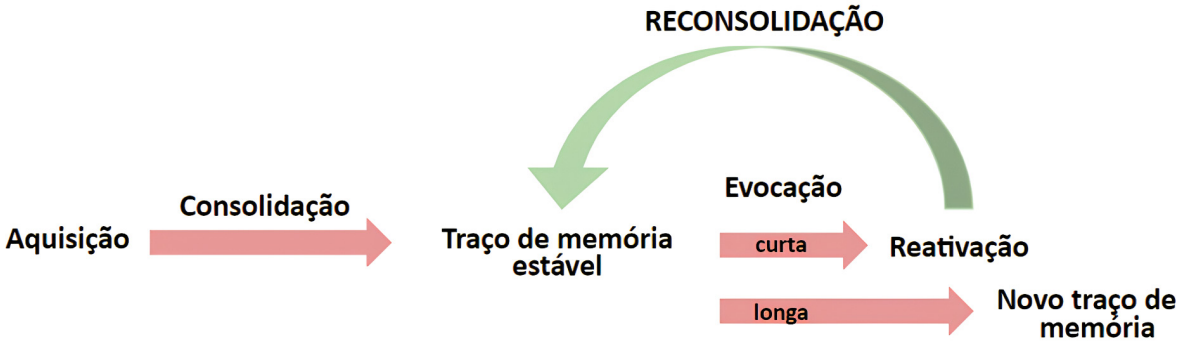


Figura 5. O processo de reconsolidação e extinção da memória aversiva. Após consolidada, a memória pode passar por diferentes processos desencadeados pela evocação. A evocação por um curto período de tempo induz a reativação e desestabilização da memória. Ou seja, o traço de memória estável torna-se lábil novamente e, assim, seu conteúdo é modificável até que termine o processo de reconsolidação. Por outro lado, um período longo ou repetido de evocação da memória desencadeia o processo de extinção, levando à formação de um novo traço de memória que compete e inibe a memória aversiva original, reduzindo as respostas de medo. FONTE: Traduzido de Raymundi et al., 2020.

1.1.4 A extinção da memória

O processo de **extinção da memória** é desencadeado pela evocação repetida ou prolongada, e leva à formação da memória de extinção, um **novo traço de memória**. A memória de extinção compete e inibe a memória original e, desse modo, reduz a resposta condicionada (Pavlov, 1927; Ressler; Mayberg, 2007; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016). A memória de extinção é consolidada através de mecanismos de plasticidade envolvendo a participação dos receptores NMDA, expressão gênica e a transcrição mediada por CREB, bem como a consolidação de outras formas de aprendizado (Mamiya *et al.*, 2009; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016).

No CMC, por exemplo, uma exposição ao contexto (na ausência do choque) por 20 minutos é, de maneira geral, suficiente para desencadear a extinção. Nesse caso, ocorre o aprendizado da não associação do contexto ao choque, ou seja, de que a exposição ao contexto não precede mais a apresentação do choque nas patas. Como resultado ocorre uma **redução do medo**, mas sem que haja o esquecimento ou a eliminação do traço associativo original (Kandel *et al.*, 2014). Comportamentalmente, a extinção no CMC resulta na redução do comportamento de congelamento nos animais. Nesse sentido, a hipótese da extinção ser um novo aprendizado que não apaga a memória de medo original é corroborada por estudos que demonstram a recuperação das respostas de medo após a extinção. Seja, por exemplo, pela simples passagem do tempo (**recuperação espontânea**) ou pela

eventual reexposição ao estímulo incondicionado (**reinstalação**) (Pavlov, 1927; Myers; Davis, 2007).

1.2 A MEMÓRIA DE MEDO

O medo é uma resposta adaptativa evolutivamente importante, que contribui para a sobrevivência ao preparar o organismo para lidar com estímulos ameaçadores (Blanchard *et al.*, 2008; LeDoux, 2012). O reconhecimento de estímulos ameaçadores pode ocorrer de maneira inata ou adquirida. O **medo inato** não requer aprendizagem prévia e é um reflexo imediato a estímulos que têm apresentado perigo potencial de maneira consistente ao longo da evolução para aquele grupo (LeDoux, 2012). Por exemplo, muitos mamíferos, incluindo humanos, têm uma reação inata ao som de uma serpente. Por outro lado, o **medo adquirido** é aprendido através de experiências, envolvendo a formação de memórias de medo associativas que permitem uma adaptação ao ambiente, através do condicionamento clássico, tanto em animais quanto em humanos (LeDoux, 2012). Isso faz com que estímulos biologicamente insignificantes passem a ser reconhecidos como ameaça por terem ocorrido em conjunto com ameaças inatas, como mencionado anteriormente. Neste cenário, o CMC é um modelo experimental capaz de induzir a formação de uma memória de medo associada a um contexto, sendo utilizado para melhorar a compreensão acerca da neurobiologia da memória de medo (Rudy; Huff; Matus-Amat, 2004; Maren; Phan; Liberzon, 2013).

1.2.1 Regiões cerebrais envolvidas no processamento da memória de medo

O hipocampo e a amígdala, localizados no lobo temporal medial, bem como os córtices pré-límbico, infra-límbico e cingulado anterior, localizados no córtex pré-frontal medial (CPFm), atuam de maneira integrada na formação e processamento de memórias de medo contextuais (Kim; Jung, 2006; Maren; Phan; Liberzon, 2013).

O **hipocampo** é essencial para a aquisição e consolidação das memórias contextuais (Fanselow, 2000). Sua organização complexa compõe um circuito tri-sináptico entre o giro denteado (GD) e as sub-regiões CA3 e CA1 (Kandel *et al.*, 2014). O córtex entorrinal, outra região do lobo temporal medial, é considerado a

principal via de entrada de informações para o hipocampo, transmitindo-as para as células granulares do GD, através da via perforante. O GD do hipocampo é a principal sub-região responsável por minimizar a sobreposição entre padrões de atividade neuronal de informações similares, ou seja, pela **separação de padrão** (Kesner, 2013). O circuito tri-sináptico se segue com o GD comunicando-se com a CA3, através das fibras musgosas. A sub-região CA3 realiza o processo de complementação de padrão, responsável por completar fragmentos de memória. Por fim, a CA3 transmite informações através das colaterais de Schaffer para a CA1, onde são processados os componentes espaço-temporais da memória (O'Keefe; Nadel, 1978; Neves; Cooke; Bliss, 2008). A CA1 é considerada a sub-região de saída das informações do hipocampo, pois apresenta projeções para diversas áreas, incluindo o retorno para o córtex entorrinal e ao subículo, bem como projeções para áreas do CPFm, do tálamo e da amígdala (Neves; Cooke; Bliss, 2008; Kandel *et al.*, 2014).

Além das sub-regiões, o hipocampo é funcionalmente dividido em seu eixo longitudinal como hipocampo dorsal e ventral, em roedores, ou posterior e anterior, em humanos (Fanselow; Dong, 2010). De maneira geral, o **hipocampo dorsal** (HD; correspondente ao posterior) está mais relacionado com as memórias contextuais, enquanto o **hipocampo ventral** (HV; correspondente ao anterior), é responsável principalmente pelo processamento emocional (Fanselow; Dong, 2010; Strange *et al.*, 2014). O HD é essencial não só para a formação, mas também para a evocação e reconsolidação das memórias de medo recentes, enquanto a evocação de memórias remotas é mais dependente de regiões do CPFm (Kitamura *et al.*, 2017; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018; Terranova *et al.*, 2023).

Os núcleos da **amígdala**, em especial a amígdala basolateral (BLA), são recrutados tanto para a formação quanto para a manutenção da memória de medo recente e remota (LeDoux, 2000; Dejean *et al.*, 2015; Kitamura *et al.*, 2017; Terranova *et al.*, 2023). No CMC, durante a aquisição, o HD processa a informação contextual, enquanto a amígdala é responsável pelo processamento do estímulo aversivo e integração desse estímulo ao contexto (Fastenrath *et al.*, 2014; Kitamura *et al.*, 2017). O núcleo central da amígdala (CeA) participa da expressão do medo, devido às suas projeções para regiões como a substância cinzenta periaquedutal, que apresenta um papel crucial na modulação de comportamentos defensivos, como o congelamento (Ledoux *et al.*, 1988; Duvarci; Pare, 2014).

O **CPFm** apresenta um papel importante na regulação da expressão do medo devido às suas conexões com a amígdala. Projeções do córtex **pré-límbico** para a BLA levam a ativação do CeA, favorecendo a expressão do medo (Sierra-Mercado; Padilla-Coreano; Quirk, 2011). Nesse sentido, o córtex pré-límbico tem sido relatado como uma região essencial para o processo de reconsolidação da memória de medo (Stern *et al.*, 2013; Bayer *et al.*, 2022). Por outro lado, o córtex **infra-límbico** ativa as células intercalares da amígdala, responsáveis por inibir o CeA, consequentemente inibindo a expressão do medo, sendo importante para o processo de extinção (Sierra-Mercado; Padilla-Coreano; Quirk, 2011; Orsini; Maren, 2012; Luchkina; Bolshakov, 2019). Além disso, o **córtex cingulado anterior** (CCA) apresenta um papel essencial na alocação e na reconsolidação de memórias de medo contextuais remotas (Frankland *et al.*, 2004; Cullen *et al.*, 2015; Bian *et al.*, 2019; da Silva *et al.*, 2020).

A integridade de toda a circuitaria envolvendo a formação e manutenção da memória de medo contextual é essencial para manter a memória em níveis adaptativos. Em alguns casos, ocorre um desbalanço no processamento das informações, levando a formação de uma **memória de medo mal-adaptativa**, podendo desencadear transtornos psiquiátricos, como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT; Brewin, 2014).

1.3 O TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O TEPT é classificado como um Transtorno Relacionado a Trauma e Estressores na 5ª edição revisada do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5-TR; *American Psychiatric Association, 2023*). O TEPT pode ser desencadeado pela exposição direta ou indireta a um **evento traumático** que envolva ameaça de morte, lesão grave ou violência sexual. A exposição direta ocorre quando o trauma é vivenciado pessoalmente pelo indivíduo. Por outro lado, a exposição indireta inclui testemunhar o trauma sofrido por outras pessoas, ter conhecimento do ocorrido com familiares ou amigos próximos, ou ainda ter exposição repetida ou intensa a detalhes aversivos do evento traumático (*American Psychiatric Association, 2023*).

Estima-se que, ao longo da vida, 60,7% dos homens e 51,2% das mulheres enfrentem pelo menos um evento traumático grave (Kessler *et al.*, 1995). No

entanto, nem todos os indivíduos expostos a um evento traumático desenvolvem o TEPT. Em geral, a **prevalência anual** de TEPT nos Estados Unidos é de cerca de 3,5%, superior aos índices observados na Europa e na maioria dos países da Ásia, América Latina e África, onde a prevalência varia de 0,5% a 1,0% (*American Psychiatric Association, 2023*). Contudo, a prevalência de TEPT em vítimas de crimes violentos varia de 19% a 75% e, em casos de violência sexual, pode chegar a 80% (Javidi; Yadollahie, 2012). Recentemente, após a pandemia de COVID-19, foi relatado um aumento significativo nos casos de TEPT entre pacientes internados, profissionais de saúde e na população em geral (Yunitri *et al.*, 2022).

Acredita-se que os pacientes com TEPT apresentem uma suscetibilidade biológica e ambiental que contribui para uma **superconsolidação** da memória traumática. Esse processo resulta na formação de uma **memória de medo mal-adaptativa**, marcada pela resistência à extinção e pela generalização do medo (Gazarini; Stern; Bertoglio, 2023).

A reativação da memória traumática mal-adaptativa no TEPT resulta na expressão de respostas de medo exageradas, contribuindo para a sintomatologia desse transtorno. Nesse sentido, os **sintomas** em pacientes com TEPT incluem sofrimento psicológico intenso ou prolongado, reações fisiológicas acentuadas diante de pistas que remetem ao trauma e evitação persistente de estímulos relacionados ao evento traumático. Além disso, também são relatados pesadelos, reações dissociativas em que o trauma parece estar ocorrendo novamente (como *flashbacks*), lembranças intrusivas angustiantes, recorrentes e involuntárias, e alterações negativas na cognição e no humor.

Indivíduos com TEPT apresentam sintomas relacionados à expressão da memória traumática mesmo diante de pistas e contextos não associados diretamente ao trauma, devido à **generalização da memória**, um processo particularmente relevante para o transtorno. Isso ocorre porque a generalização compromete a capacidade de discriminar entre sinais de perigo e segurança, devido à falta de especificidade da memória (Risbrough; Glenn; Baker, 2015). Além disso, a generalização está marcadamente associada à resistência ao tratamento do TEPT (Gazarini; Stern; Bertoglio, 2023). Apesar de sua importância, a neurobiologia por trás do desenvolvimento da generalização ainda não é completamente compreendida.

Além dos sintomas clássicos, cerca de 84% dos indivíduos diagnosticados com TEPT apresentam **comorbidades**, como abuso de substâncias, transtornos de ansiedade, depressão e mania (Javidi; Yadollahie, 2012). Os pacientes com TEPT também apresentam um **prejuízo cognitivo** geral, que interfere no aprendizado de outros tipos de memória, como a memória episódica, por exemplo (Schuitevoerder *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2015). A complexidade do quadro clínico do TEPT traz consequências significativas para a qualidade de vida dos pacientes, afetando suas relações sociais e familiares (*American Psychiatric Association, 2023*). De fato, o TEPT está associado a um maior número de ausências no trabalho, menor renda e menor sucesso acadêmico e profissional (Javidi; Yadollahie, 2012).

A memória mal-adaptativa e a sintomatologia do TEPT estão associadas a **alterações na circuitaria cerebral** responsável pelo processamento da memória aversiva. Em pacientes com TEPT, observa-se uma falha na ativação do CPFm e do hipocampo, enquanto há uma hiperativação das regiões da amígdala e do CCA (Rauch *et al.*, 2000; Milad *et al.*, 2009; Garfinkel *et al.*, 2014; van Rooij *et al.*, 2014). Essas alterações no equilíbrio de ativação e inibição entre regiões cerebrais contribuem para respostas emocionais intensas e inadequadas, características do TEPT (Rauch; Shin; Phelps, 2006). A hipofunção do CPFm e do hipocampo prejudica a modulação das respostas de medo e a capacidade de contextualizar memórias traumáticas, enquanto a hiperatividade da amígdala e do CCA intensifica a resposta ao medo e a torna mais generalizada (Shin; Rauch; Pitman, 2006; van Rooij *et al.*, 2014).

Devido à sintomatologia variável e complexa, encontrar intervenções terapêuticas eficazes para o TEPT tem sido um desafio significativo. As **psicoterapias** são consideradas a primeira linha de tratamento (Yabuki; Fukunaga, 2019). A terapia de exposição prolongada é uma das abordagens cognitivas mais benéficas para o TEPT. Nessa intervenção, o terapeuta provoca a evocação vívida das memórias relacionadas ao evento traumático em um ambiente seguro, com o objetivo de induzir o processo de extinção da memória e reduzir as respostas de medo. No entanto, a terapia de exposição prolongada apresenta altas taxas de abandono, recuperação espontânea e recaída a longo prazo (Singewald *et al.*, 2015; Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016; Kida, 2019). Essas limitações podem ser atribuídas à resistência ao processo de extinção da memória de medo, resultante da memória

mal-adaptativa associada ao TEPT (Ressler; Mayberg, 2007; Yabuki; Fukunaga, 2019).

A **farmacoterapia** disponível para o TEPT, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), foca na atenuação dos sintomas induzidos pelo transtorno, sem abordar a causa subjacente, que é a memória aversiva (Stein *et al.*, 2006; Yabuki; Fukunaga, 2019). Além disso, menos de 50% dos pacientes com TEPT tratados com ISRS apresentam melhora significativa e menos de 30% alcançam remissão completa. A ineficácia dos tratamentos e a persistência dos sintomas estão associadas a um aumento do risco de suicídio nesses pacientes (Berger *et al.*, 2009; Loeffler *et al.*, 2018).

Até o momento, o conhecimento sobre a neurobiologia do TEPT é limitado e não existem tratamentos específicos ou biomarcadores para auxiliar no diagnóstico da doença. Essas evidências ressaltam a importância de compreender os mecanismos associados à memória de medo mal-adaptativa, como o processo de generalização da memória, para o desenvolvimento futuro de tratamentos mais eficazes para pacientes com TEPT.

1.4 A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO

A generalização da memória é caracterizada pelo prejuízo na capacidade de discriminar estímulos de perigo e de segurança, o que resulta na expressão de respostas de medo frente a **estímulos neutros**, não relacionados a situações de perigo (Risbrough; Glenn; Baker, 2015). Em protocolos de condicionamento, a generalização é observada pela expressão da resposta condicionada mediante a exposição a estímulos não-condicionados neutros, ou seja, que não foram associados ao EI (Dymond *et al.*, 2014; Dunsmoor; Paz 2015). No CMC, por exemplo, avalia-se a expressão de congelamento frente a contextos neutros, diferentes do condicionado, como representado na Figura 6 (Sauerhöfer *et al.*, 2012).

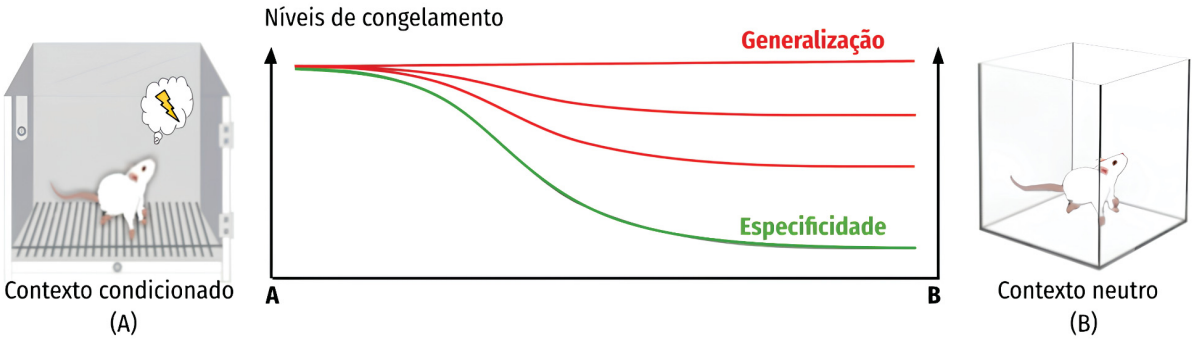


Figura 6. A generalização no condicionamento de medo ao contexto. O CMC leva a expressão do congelamento no contexto condicionado (A), entretanto, a exposição a um contexto neutro (B) permite avaliar a generalização da memória de medo. Baixos níveis de congelamento no contexto neutro representa uma memória de medo específica, enquanto níveis aumentados de congelamento indicam generalização da memória de medo. FONTE: A autora (2024).

O processo de generalização pode ser atribuído a fatores como a superconsolidação da memória (ou seja, aumento da força de uma memória já forte). Estressores, experiências prévias e o tipo e intensidade de estímulos aversivos podem intensificar a **força da memória** de medo, desencadeando a generalização (Sun *et al.*, 2021; Gazarini; Stern; Bertoglio, 2023). Além disso, interferências nos processos de consolidação e reconsolidação também contribuem para a generalização da memória de medo, embora a reconsolidação seja pouco investigada neste sentido (Gazarini *et al.*, 2013; Einarsson; Pors; Nader, 2015; Gazarini, 2015; Vanvossen *et al.*, 2017; Raymundi *et al.*, 2023).

A **separação de padrão** é um processo que também está associado à generalização da memória (Lange *et al.*, 2017). Esse processo é responsável por distinguir entre experiências semelhantes, minimizando a sobreposição entre engramas que representam eventos ou estímulos similares (Kesner, 2013). Desse modo, quando a separação de padrão é **prejudicada**, memórias menos específicas são estabelecidas, contribuindo para respostas generalizadas de medo (Kheirbek *et al.*, 2012; Lange *et al.*, 2017). Tradicionalmente, a separação de padrão é reconhecida como sendo uma função hipocampal (Yassa; Stark, 2011; Dillon *et al.*, 2017), mas regiões como o córtex entorrinal e parahipocampal também contribuem para esse processo (Pidgeon; Morcom, 2016; Leal; Yassa, 2018; Stevenson *et al.*, 2020). Em roedores, o processo de separação de padrão pode ser avaliado através de uma adaptação dos testes de reconhecimento e localização de objetos, o **teste de separação de padrão de objetos** (van Hagen *et al.*, 2015).

A generalização do medo pode surgir naturalmente com o **passar do tempo**. De fato, memórias contextuais recentes são mais específicas e podem gradualmente se tornar mais generalizadas à medida que envelhecem (Poulos *et al.*, 2016; Pollack *et al.*, 2018). Isso ocorre pois as memórias de medo, após consolidadas, passam a ser gradualmente mais dependentes de regiões corticais, como o CCA, e menos dependentes de regiões hipocampais (Wiltgen; Tanaka, 2013). Essa realocação do engrama em regiões cerebrais distintas ao longo do tempo é chamada de **consolidação sistêmica** (Kitamura *et al.*, 2017). Como ilustrado na Figura 7, após a consolidação da memória, a evocação recente recruta a atividade de redes hipocampais, que armazenam uma memória mais detalhada devido à alta densidade de neurônios envolvidos com o processamento espacial, enquanto o engrama cortical permanece silencioso (**engrama silencioso**). Com o tempo, o engrama cortical amadurece e se torna mais necessário do que os circuitos hipocampais para a evocação remota, fazendo com que a memória perca parte da especificidade original e se torne mais esquemática (Kitamura *et al.*, 2017; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018; Silva; Burns; Gräff, 2019).

Entre as regiões cerebrais associadas à generalização, destaca-se o envolvimento do **córtex cingulado anterior** (Cullen *et al.*, 2015; Einarsson; Pors; Nader, 2015; Bian *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2019; Nagayoshi; Ishikawa; Kida, 2022). O CCA constitui a porção mais dorsal do CPFm em ratos e está intimamente relacionado à alocação e reconsolidação de memórias remotas (Cullen *et al.*, 2015; Bian *et al.*, 2019; da Silva *et al.*, 2020). Consequentemente, o CCA se mostra envolvido também na generalização da memória ao longo do tempo (Bian *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2019). Em humanos, há um aumento da atividade dessa região após a aquisição e evocação de memórias traumáticas (Felmingham *et al.*, 2009; Fani *et al.*, 2012). Além disso, esse aumento da atividade do CCA tem sido associado à intensificação da generalização em pacientes com TEPT (van Rooij *et al.*, 2014; Morey *et al.*, 2020).

Embora os mecanismos envolvidos na generalização ainda sejam pouco compreendidos, a via de sinalização óxido nítrico (NO, do inglês, *Nitric Oxide*)/monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) tem sido investigada como envolvida na generalização da memória de medo (Gazarini, 2015; Qin *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021).

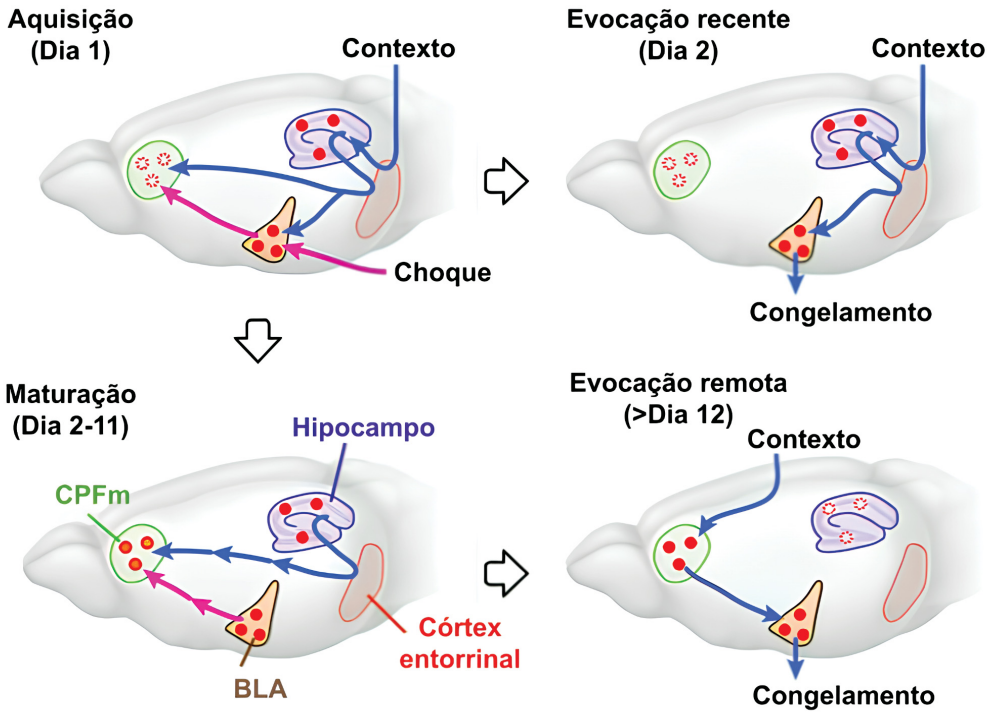


Figura 7. O processo de consolidação sistêmica. Ilustração representando a alocação de uma memória de medo contextual em ratos. **Dia 1)** Durante a aquisição, a informação contextual é processada pelo sistema hipocampal e integrada ao choque por meio da BLA. Nesse momento, as células do CPFm também são recrutadas, mas permanecem como engrama silencioso. **Dia 2)** Quando há a reexposição ao contexto pouco tempo após a aquisição o engrama hipocampal é reativado para a evocação recente da memória, levando a expressão do congelamento via BLA. **Dia 2-11)** Com o passar do tempo, as células do engrama do CPFm amadurecem, um processo que requer a conexão com as células do engrama do hipocampo e da BLA. **>Dia 12)** Em um tempo mais remoto após a aquisição, a reexposição ao contexto passa a ser mediada, principalmente, pela reativação do engrama do CPFm para a evocação da memória remota, resultando na expressão do congelamento via BLA. Em paralelo, com o passar do tempo, as células do engrama do hipocampo tornam-se silenciosas, deixando de ser as principais recrutadas para a evocação remota, sob condições normais. CPFm: córtex pré-frontal medial; BLA: amígdala basolateral. FONTE: Adaptado de Kitamura *et al.*, (2017).

1.5 A VIA DE SINALIZAÇÃO ÓXIDO NÍTRICO/GMPc

A produção do **GMPc** ocorre pela ativação da enzima guanilato ciclase (GC), a partir do trifosfato de guanosina (GTP). A GC em sua forma solúvel (GCs) é a principal responsável pela produção de GMPc no cérebro, e o principal ativador da GCs é o **NO**, sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês, *Nitric Oxide Synthase*) em resposta a níveis elevados de cálcio, por exemplo, via ativação de receptores NMDA. Em neurônios, como ilustrado na Figura 8, o NO atua como um segundo mensageiro retrógrado, estimulando a GCs pré-sináptica a produzir GMPc, que então ativa cascatas de sinalização intracelular. Isso inclui a ativação da

PKG, resultando no aumento da liberação de neurotransmissores a nível pré-sináptico, ou na ativação de CREB e transcrição de proteínas relacionadas à plasticidade na pós-sinapse (Argyrousi; Heckman; Prickaerts, 2020). Ao se difundir pela membrana do neurônio pós-sináptico, o NO pode também atuar em células não neuronais. Além disso, os astrócitos e a micróglia são capazes de sintetizar NO de forma autônoma, igualmente ativando a sinalização do GMPc (Murphy *et al*., 1993).

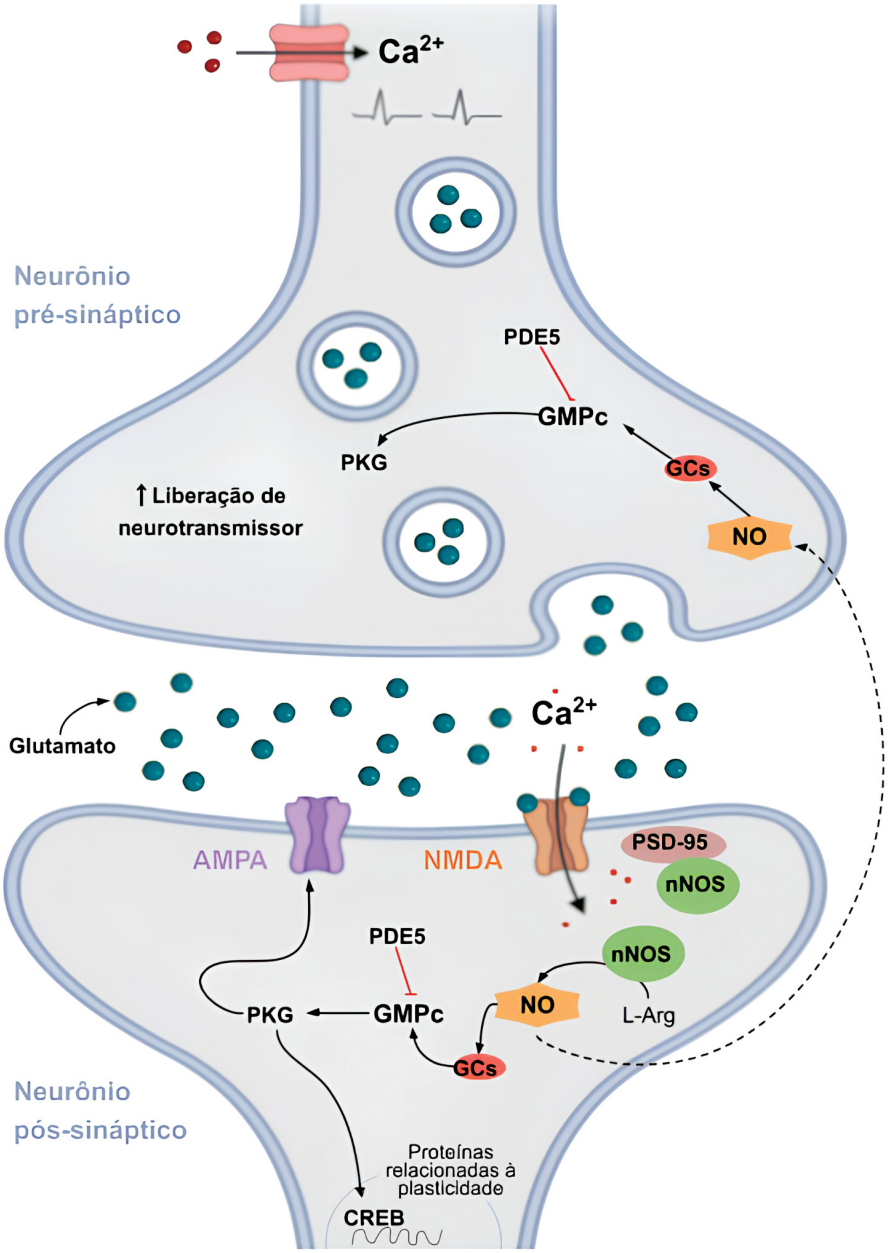


Figura 8. Via de sinalização do GMPc no neurônio pré- e pós-sináptico. O NO na célula pós-sináptica atua estimulando a produção de GMPc (via ativação da GCs) tanto na célula pós quanto na pré-sináptica. Na célula pré-sináptica, a ativação da via GMPc/PKG pode levar à liberação de glutamato, enquanto na célula pós-sináptica a PKG fosforila CREB e receptores AMPA, resultando na síntese de proteínas relacionadas à plasticidade e no tráfego de AMPA para a membrana, respectivamente. Tanto no neurônio pré-sináptico quanto no pós-sináptico regulação dos níveis de GMPc se dá pelas PDEs, como por exemplo, a PDE5, destacada nesse caso. FONTE: A autora (2024). Baseado em Argyrousi; Heckman; Prickaerts (2020) e Medeiros *et al*., (2022).

Diversas evidências em roedores têm pontuado um papel importante da sinalização NO/GMPc na formação e reconsolidação de memórias, como memórias espaciais, de reconhecimento de objetos e memórias de medo (Rutten *et al.*, 2005; Bollen *et al.*, 2014; Kida, 2019; Argyrousi; Heckman; Prickaerts, 2020). Além disso, o papel da sinalização do NO no TEPT tem sido amplamente discutido (Fronza et al., 2023). Estudos identificaram polimorfismos relacionados à sinalização do NO em pacientes com TEPT, os quais foram associados a uma maior gravidade do transtorno (Lawford et al., 2013; Bruenig et al., 2017).

A sinalização NO/GMPc tem sido relacionada também especificamente à **generalização** da memória. Estimular esta via, utilizando um doador de NO (nitroprussiato de sódio), um precursor do NO (L-arginina), ou um análogo sintético do GMPc (8-Br-GMPc), após um treino forte de CMC, é suficiente para induzir a generalização de uma memória recente (Gazarini, 2015). Além disso, a evocação de uma memória de medo generalizada remota aumenta o acoplamento da NOS neuronal (nNOS) com a PSD-95 (do inglês, *postsynaptic density protein 95)*, facilitando a síntese e liberação de NO. Interromper o acoplamento nNOS-PSD-95 no CCA foi capaz de impedir a generalização da memória em um ponto de tempo remoto (15 dias após a consolidação) (Qin *et al.*, 2019). Esses resultados destacam a importância da via do NO/GMPc e do CCA na generalização da memória de medo.

Vale ressaltar que os níveis de GMPc, e consequentemente a ativação da sua via de sinalização, são regulados pelas fosfodiesterases (PDEs, do inglês, *Phosphodiesterases*), enzimas que podem ser utilizadas como alvo para investigação desta via (Argyrousi; Heckman; Prickaerts, 2020).

1.5.1 As Fosfodiesterases

As PDEs **degradam** o AMPc e/ou o GMPc através da hidrólise da ligação 3’ fosfato (Sharma *et al.*, 2013, Knott *et al.*, 2017). Em mamíferos, são expressas 11 famílias distintas de PDE (PDE1 a PDE11), que podem ser classificadas de acordo com a especificidade do substrato que hidrolisam em: PDEs seletivas para a degradação do AMPc (PDEs 4, 7, 8), PDEs específicas para degradação de GMPc (PDEs 5, 6, 9) e PDEs não seletivas, ou seja, que degradam tanto a AMPc quanto o GMPc (PDEs 1, 2, 3, 10, 11) (Bender; Beavo, 2006).

A **fosfodiesterase 5** (PDE5), seletiva para a degradação de GMPc, teve sua expressão detectada em várias regiões cerebrais, como camadas corticais e o hipocampo (Sharma *et al.*, 2013). A **inibição da PDE5** favorece a sinalização do GMPc, por impedir sua degradação, mantendo seus níveis disponíveis por mais tempo (van Staveren *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006). Inibidores de PDE5 têm sido investigados nos processos de memória, incluindo na generalização. Por exemplo, a administração de sildenafil (inibidor seletivo da PDE5) resultou na potencialização da reconsolidação da memória em uma tarefa de esquiva inibitória em camundongos (Boccia *et al.*, 2011). Além disso, a administração de sildenafil no HD de ratos na consolidação de um treino forte de CMC induziu a generalização de uma memória recente (2 dias depois da consolidação) (Gazarini, 2015). Esses resultados mostram, separadamente, um papel da PDE5 tanto na reconsolidação quanto na generalização da memória. No entanto, ainda não foi investigado se a atividade de PDE5 durante a reconsolidação está envolvida na generalização da memória de medo.

Para explorar essa questão, pode-se utilizar um inibidor de PDE5, como o **vardenafil**, que, em comparação com outros inibidores seletivos de PDE5, apresenta maior potência e seletividade (Saenz de Tejada *et al.*, 2001; Sommer, 2005). Devido à sua aprovação clínica para o tratamento da disfunção erétil, o vardenafil oferece um perfil de segurança bem estabelecido, tornando-o uma escolha viável para investigações experimentais adicionais (Miller, 2015). Além disso, o vardenafil já tem sido utilizado em estudos com roedores para avaliar seus efeitos em outros tipos de memória, como no reconhecimento de objetos (Prickaerts *et al.*, 2002; 2004; Rutten *et al.*, 2005).

.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

A hipótese é que a atividade normal da PDE5 durante a reconsolidação ajuda a manter a memória em níveis adaptativos, prevenindo a generalização. Desse modo, a inibição da PDE5, durante a reconsolidação, desencadearia a generalização da memória de medo ao longo do tempo, de maneira dependente do CCA.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo ao contexto na generalização ao longo do tempo.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da inibição da PDE5, durante a reconsolidação, na generalização da memória de medo em um ponto de tempo recente, intermediário e remoto;
- Determinar se os efeitos induzidos pela inibição da PDE5 na reconsolidação da memória de medo se relacionam a alterações no processo de separação de padrão;
- Avaliar se os efeitos induzidos pela inibição da PDE5 dependem da evocação da memória de medo;
- Avaliar o efeito da inibição da PDE5 fora da janela de reconsolidação da memória de medo em um ponto de tempo remoto;
- Avaliar se a inibição quimiogenética do CCA interfere nos efeitos induzidos pela inibição da PDE5 no ponto de tempo remoto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos *Wistar* machos adultos foram obtidos do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram alojados em grupos de quatro em gaiolas de policarbonato (48×37×21 cm), com alimentação e água *ad libitum*, sob temperatura ambiente controlada (22±2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas das 7h às 19h). No momento dos protocolos experimentais os animais apresentavam aproximadamente 90 dias e pesavam entre 320 e 450 g. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local (número de autorização 1537) e realizados conforme a legislação brasileira e as diretrizes do ARRIVE (Percie du Sert *et al.*, 2020).

3.2 DROGAS

Vardenafil (VAR; inibidor seletivo de PDE5; Ambeed, EUA) nas doses de 0,3 ou 1 mg/kg i.p. foram baseadas em estudos prévios (Prickaerts *et al.*, 2002; 2004; Rutten *et al.*, 2005; Akkerman *et al.*, 2015). O VAR foi dissolvido em solução de NaCl 0,9% contendo 10% de monooleato de sorbitano polioxietileno (Tween 80; Sigma-Aldrich, EUA), e esta mesma solução foi utilizada como veículo (VEI). O composto 21 (C21; agonista DREADD; Sigma) 1 mg/kg i.p. foi dissolvido em solução de NaCl 0,9%, conforme estudos anteriores (Thompson *et al.*, 2018).

3.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

O CMC foi realizado das 12h às 17h em uma sala iluminada a 70 lux. Os animais foram ambientados à sala de experimentação por pelo menos 30 minutos antes de cada sessão experimental. Foi utilizada uma caixa de condicionamento (contexto A) com paredes laterais de alumínio, parede frontal e porta no teto de acrílico transparente com piso gradeado com barras de aço inoxidável conectadas a um gerador de choque (dimensões do contexto A: 35×20×30 cm; Insight, Brasil).

No primeiro dia, na sessão de familiarização, cada animal foi colocado no contexto A para explorá-lo livremente por 3 minutos. No dia seguinte, na sessão de condicionamento, cada animal foi reexposto ao contexto A (estímulo condicionado; EC), denominado contexto condicionado, que foi pareado ao estímulo incondicionado (EI; 3 choques elétricos nas patas por 3 s, com intervalo de 30 s no início, entre os choques e ao final da sessão). A intensidade do EI foi de 0,7 mA para todos os experimentos, exceto quando os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico (experimentos de inibição quimiogenética). Neste caso, a intensidade foi ajustada para 0,8 mA para alcançar níveis de congelamento semelhantes aos dos animais não operados (Stern *et al.*, 2015). No dia seguinte, os animais foram submetidos a uma sessão de evocação curta da memória de medo recente, na qual foram reexpostos ao contexto condicionado na ausência do EI por 3 minutos, para induzir a reconsolidação recente. Os animais receberam VEI ou VAR (0,3 ou 1 mg/kg i.p.) 5 minutos ou 6 horas após a evocação. Os animais foram testados por 3 minutos no contexto condicionado sem apresentação do EI (Teste A) após 1, 12 ou 21 dias para avaliar os efeitos na memória recente, intermediária ou remota, respectivamente. No dia seguinte ao Teste A, os animais foram submetidos ao Teste B, consistindo na exposição por 3 minutos ao contexto B, uma caixa de acrílico transparente (33×34×26 cm) não-pareada ao EI, denominada como contexto neutro, para avaliar a generalização da memória de medo. O contexto neutro também foi utilizado quando a sessão de evocação foi omitida (não evocação). Entre cada animal, o aparato utilizado foi higienizado utilizando álcool a 20%. O comportamento de congelamento, caracterizado pela ausência de movimentos, exceto os relacionados à respiração (Blanchard; Blanchard, 1969), foi utilizado como parâmetro de memória de medo. O congelamento de cada animal foi avaliado manualmente com um cronômetro por um experimentador treinado, cego para o tratamento. O índice de generalização foi calculado por [(% tempo de congelamento no Teste B)/(% tempo de congelamento no Teste A + % tempo de congelamento no Teste B)].

3.4 SEPARAÇÃO DE PADRÃO DE OBJETOS

Três dias após o Teste B, cada animal foi submetido ao protocolo de separação de padrão de objetos (SPO), que foi baseado nos testes de reconhecimento e localização de objetos, para avaliar o processo de separação de padrão (van Hagen *et al.*, 2015). Inicialmente, na sessão de habituação, cada animal foi colocado em uma arena quadrangular preta (60x60x30 cm) para explorá-la livremente por 15 minutos. No dia seguinte, na mesma arena, cada rato foi submetido a uma sessão de treinamento com dois objetos idênticos, posicionados simetricamente, para explorar por 3 minutos. Após 1 hora, cada animal foi testado na arena por 3 minutos, com um dos objetos reposicionado linearmente, aproximadamente 18 cm medidos do seu eixo central (posição 3, determinada previamente como ideal nessas condições para detectar prejuízos no teste de SPO; Apêndice 1), como pode ser observado na Figura 9. O objeto a ser movido (objeto da esquerda ou direita) e a direção (deslocar para frente ou para trás) foram previamente balanceados para evitar preferências por lugar ou objeto. Entre cada animal, a arena e os objetos utilizados foram higienizados utilizando uma solução de álcool etílico a 20%. Um avaliador treinado quantificou manualmente o tempo de exploração de cada animal a cada um dos objetos. Foi considerada exploração quando o animal aproximou a ponta do nariz a uma distância de no máximo 2 cm do objeto, não sendo contabilizado situações em que o animal ficasse apenas parado próximo ao objeto ou utilizando-o de apoio para o comportamento de *rearing*. O tempo gasto explorando cada objeto foi utilizado para calcular o índice de discriminação por [(tempo de exploração do objeto na mesma posição - tempo de exploração do objeto na posição alterada)/(soma do tempo explorando ambos os objetos)]. Índices próximos a 1 indicam uma alta capacidade de discriminação entre o objeto que mudou de localização e o que permaneceu na localização anterior, ou seja, uma alta eficiência no processo de separação de padrão. Por outro lado, índices próximos a -1 indicam baixa capacidade de discriminação e sugerem um processo de separação de padrão prejudicado.

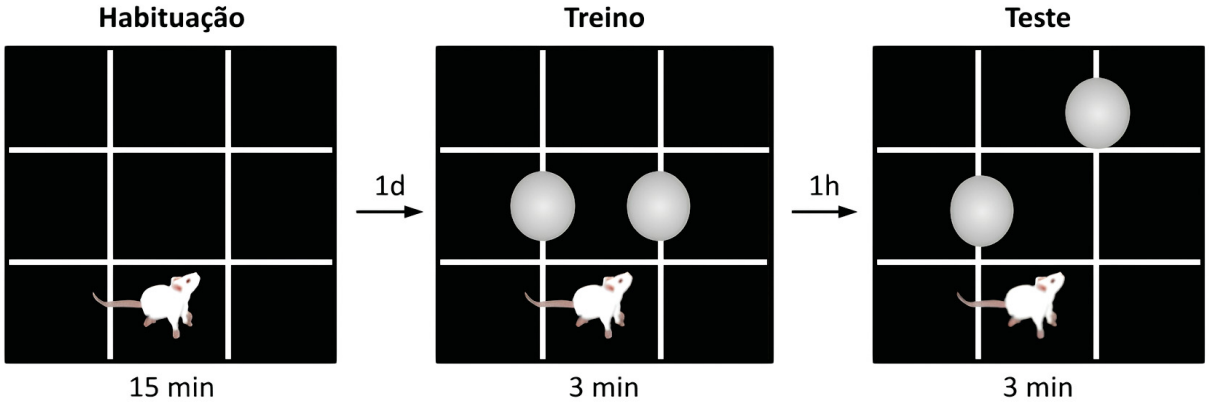


Figura 9. Ilustração representando o delineamento do protocolo de separação de padrão de objetos (SPO). O quadrado preto com linhas brancas marcando os quadrantes representa a arena quadrangular preta e os dois círculos prata representam os dois objetos idênticos. Neste exemplo, o objeto da direita foi deslocado 18 cm para a parte de trás da arena, medidos pelo ponto em seu eixo central. FONTE: A autora (2024).

3.5 INIBIÇÃO QUIMIOGENÉTICA

Foi utilizada a técnica DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) para a inibição do CCA, sob aprovação da Comissão Interna de Biossegurança do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram anestesiados com 1,0 ml/kg de uma solução contendo xilazina (10 mg/ml; Carlier) e cetamina (100 mg/ml; Sespo) e após anestesiados foram posicionados em um aparato estereotáxico (Kopf). Visando à futura inibição temporária do córtex cingulado anterior (CCA), 0,5 µl do constructo viral diluído 2x foi infundido bilateralmente nessa região (nas coordenadas: AP = +3,0 mm do bregma, ML = ±0,5 mm da sutura central, DV = -2,2 mm do crânio; Paxinos; Watson, 2009). A infusão foi realizada por 2 agulhas odontológicas fixadas com uma distância de 1 mm entre elas (0,5 mm de cada uma em relação a sutura central) e conectadas a duas microsseringas de 10 µl (Hamilton, EUA) colocadas em uma bomba de infusão (Insight, Brasil) a uma taxa de 0,1 µl/min. Ao término da infusão, as agulhas foram deixadas por mais 5 minutos antes de serem retiradas. Os animais do grupo experimental receberam a infusão bilateral de um vetor viral que induziu a expressão do receptor inibitório hM4Di DREADD no CCA (AAV8-CaMKIIa-hM4Di-mCherry, Addgene). Os animais controle receberam a infusão bilateral do vetor viral controle, que não induz a expressão do receptor DREADD (AAV8-CaMKIIa-EGFP, Addgene). Após a cirurgia, os ratos receberam 2,5 mg/kg de Flunixin Meglumina (Banamine®,

Merck Sharp & Dohme Saúde Animal, Brasil) por via intramuscular e ibuprofeno (Natulab, Brasil) 0,2 mg/ml na água de beber por 2 dias. Após um período de 3 semanas para recuperação do animal e expressão do vírus, os experimentos comportamentais foram iniciados.

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados (1,0 mg/kg de uma solução contendo xilazina e cetamina, conforme descrito anteriormente) e submetidos à perfusão transcardíaca com tampão salina-fosfato (PBS) 0,1 M seguida de paraformaldeído (PFA) a 4%. Em seguida, os cérebros dos animais foram removidos e imersos em PFA a 4% por 24h. Posteriormente, os cérebros foram imersos em solução de sacarose com aumento gradual da concentração para crioproteção: 12 horas em solução com sacarose a 10%, seguidas de 48 horas em 20%, e finalmente 48 horas em 30%. Na sequência, os cérebros foram individualmente congelados em gelo seco e foram obtidos cortes com 40 µm de espessura utilizando um criostato (Leica). Esses cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas. Após a secagem dos cortes nas lâminas, foram aplicadas lamínulas utilizando uma solução de DAPI/Antifade (Invitrogen). Imagens dos cortes foram obtidas por microscopia de fluorescência no Confocal A1R MP+ (Nikon) para verificar a presença da marcação fluorescente de mCherry e EGFP pela expressão viral na região exata do CCA, como observado na Figura 10.

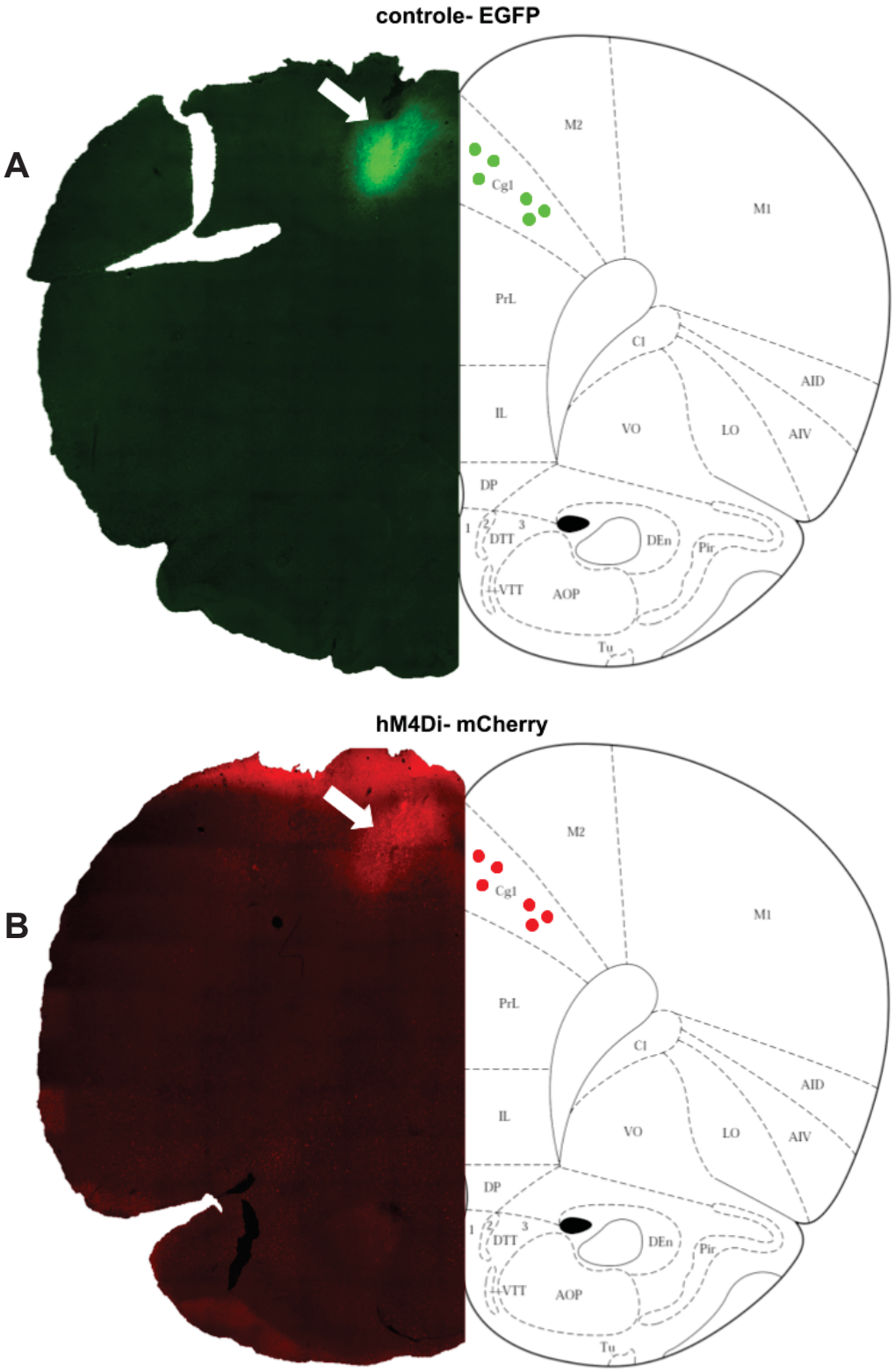

controle- EGFP
A
M2
Cg1
M1
PrL
Cl
AID
IL
VO
LO
AIV
DP
1
2
3
DTT
DEn
Pir
VTT
AOP
Tu
hM4Di- mCherry
B
M2
Cg1
M1
PrL
Cl
AID
IL
VO
LO
AIV
DP
1
2
3
DTT
DEn
Pir
VTT
AOP
Tu

Figura 10. Representação da expressão viral para a inibição quimiogenética. **A)** Representação da expressão viral no em um animal controle-EGFP. **B)** Representação da expressão viral no em um animal hM4Di-mCherry. Imagem do local de infusão viral (esquerda) e um diagrama esquemático ilustrando o local de infusão no CCA (direita - pontos coloridos) no corte Bregma 3,2 mm de acordo com o Atlas Cerebral de Paxinos e Watson (2009). A seta branca destaca a fluorescência observada dentro do CCA em um corte cerebral. Foi utilizado um aumento de 200x para capturar uma série de imagens que foram arranjadas em conjunto para construir uma imagem maior (confocal função *large image*). FONTE: A autora (2024).

3.6 ETAPAS EXPERIMENTAIS

3.6.1 Experimento 1: Avaliação dos efeitos da inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo na generalização ao longo do tempo

Para avaliar os efeitos da inibição da PDE5 durante a reconsolidação recente na generalização, no experimento 1 os animais submetidos ao CMC receberam VAR (inibidor seletivo de PDE5; 0,3 ou 1 mg/kg) ou VEI i.p. 5 minutos após a evocação. Grupos independentes de animais foram testados no contexto condicionado (Teste A) após 1, 12 ou 21 dias, definidos como pontos de tempo recente, intermediário e remoto, respectivamente. No dia seguinte ao Teste A, os animais foram testados no contexto neutro (Teste B) para avaliar os efeitos na generalização da memória, conforme mostra a Figura 11.

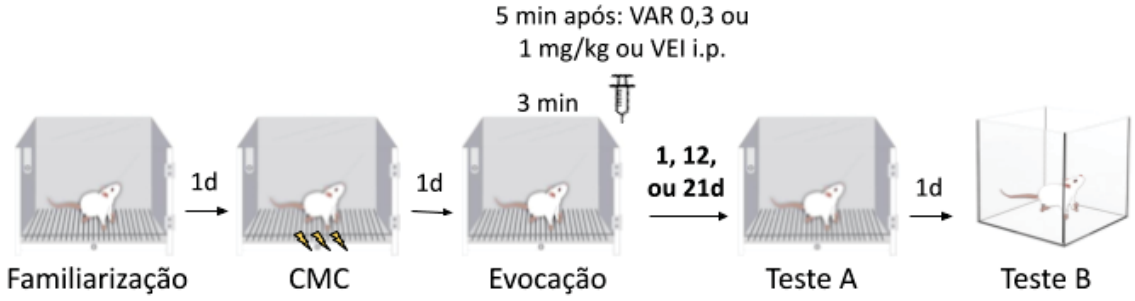


Figura 11. Desenho experimental adotado no experimento 1. Animais submetidos ao CMC foram tratados com VAR 0,3 ou 1 mg/kg ou VEI i.p. 5 minutos após a sessão de evocação e testados em um ponto de tempo recente, intermediário ou remoto no contexto condicionado (Teste A) e, no dia seguinte, no contexto neutro (Teste B). FONTE: A autora (2024).

3.6.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos da inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo no processo de separação de padrão ao longo do tempo

Para avaliar se a inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo recente prejudica o processo de separação de padrão ao longo do tempo, os

animais submetidos ao CMC e tratados com VAR (1 mg/kg; dose efetiva) ou VEI i.p. 5 minutos após a evocação foram submetidos ao mesmo protocolo descrito para o experimento 1. Adicionalmente, foram submetidos ao protocolo de SPO 3 dias após o Teste B, nos pontos de tempo recente, intermediário e remoto, conforme mostra a Figura 12.

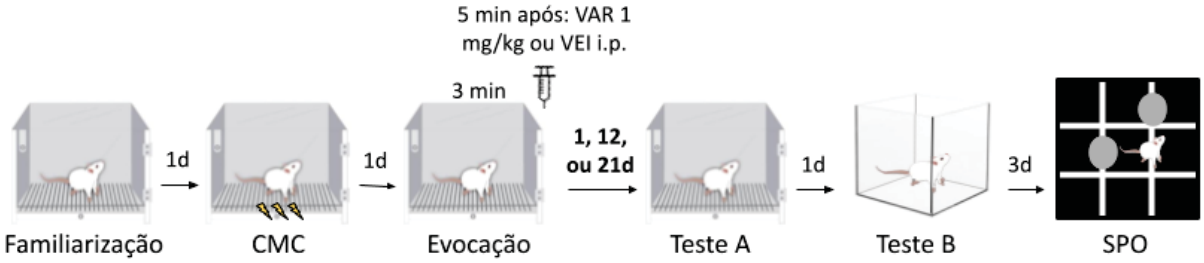


Figura 12. Desenho experimental adotado no experimento 2. Animais submetidos ao CMC foram tratados com VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 5 minutos após a evocação e foram testados em um ponto de tempo recente, intermediário ou remoto no contexto condicionado (Teste A) e, no dia seguinte, no contexto neutro (Teste B). Após 3 dias, os animais foram submetidos ao protocolo de SPO. FONTE: A autora (2024).

3.6.3 Experimento 3: Avaliação da omissão da evocação sobre os efeitos induzidos pela inibição da PDE5

Um protocolo de não-evocação foi realizado para avaliar se os efeitos da inibição da PDE5 dependem do processo de reativação/reconsolidação da memória. Animais submetidos ao CMC receberam VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 5 minutos após uma sessão de não-evocação (exposição ao contexto neutro). Após 12 ou 21 dias, grupos independentes de animais foram testados no contexto condicionado (Teste A). No dia seguinte, foram reexpostos ao contexto neutro (Teste B) e, três dias depois, passaram pelo teste de SPO, conforme ilustrado na Figura 13.

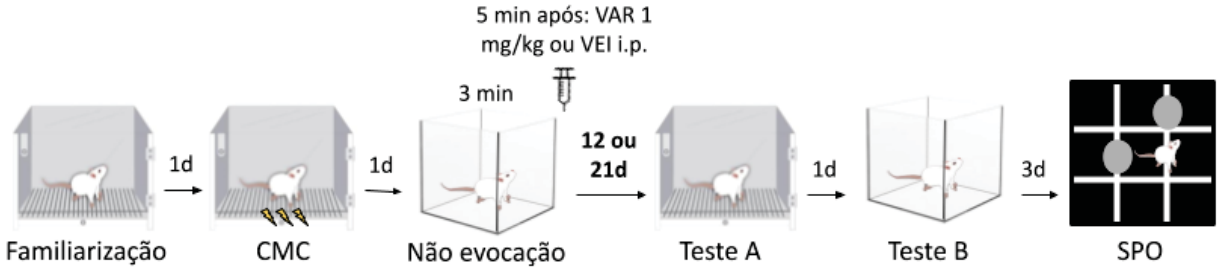


Figura 13. Desenho experimental adotado no experimento 3. Animais submetidos ao CMC receberam VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 5 minutos após uma sessão de não-evocação (exposição ao contexto neutro). Os testes foram realizados nos pontos de tempo intermediário ou remoto no contexto condicionado (Teste A) e, no dia seguinte, no contexto neutro (Teste B). Após 3 dias, os animais foram submetidos ao protocolo de SPO. FONTE: A autora (2024).

3.3.4 Experimento 4: Avaliação dos efeitos da inibição da PDE5 fora da janela de reconsolidação da memória de medo

Para avaliar os efeitos da inibição da PDE5 fora da janela de reconsolidação, animais submetidos ao CMC receberam VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 6 horas após a evocação (fora da janela de reconsolidação). Os animais foram testados no ponto de tempo remoto no Teste A, no dia seguinte no Teste B, e 3 dias depois no teste de SPO, como observado na Figura 14.

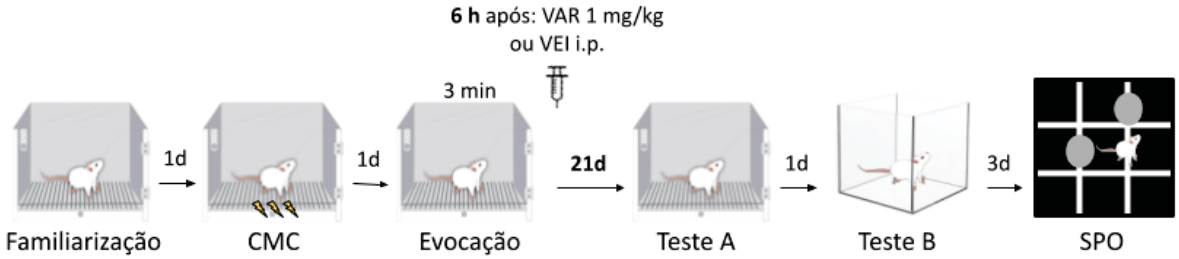


Figura 14. Desenho experimental adotado no experimento 4. Animais submetidos ao CMC foram tratados com VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 6 horas após a evocação e foram testados no ponto de tempo remoto no Teste A e, no dia seguinte, no Teste B. Após 3 dias, os animais foram submetidos ao protocolo de SPO. FONTE: A autora (2024).

3.6.5. Experimento 5: Avaliação da inibição quimiogenética do CCA sobre os efeitos induzidos pela inibição da PDE5

Foi realizada uma inibição quimiogenética direcionada ao CCA para avaliar se os efeitos induzidos pela inibição da PDE5 na generalização do medo e na separação de padrão dependem da atividade dessa região. Para isso, os animais receberam uma infusão viral no CCA. A infusão consistiu em um vetor viral que induz a expressão do receptor inibitório hM4Di DREADD nos neurônios dessa região (AAV8-CaMKIIa-hM4Di-mCherry, Addgene), ou um vetor viral controle que não induz a expressão do receptor DREADD (AAV8-CaMKIIa-EGFP, Addgene). Após três semanas, os animais foram submetidos ao CMC e receberam o agonista DREADD C21 1 mg/kg i.p. 30 minutos antes da evocação, para inibir temporariamente a região do CCA, e VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 5 minutos após a evocação recente. Os animais foram testados no ponto de tempo remoto no Teste A, no dia seguinte no Teste B, e 3 dias depois no teste de SPO, conforme observado na Figura 15.

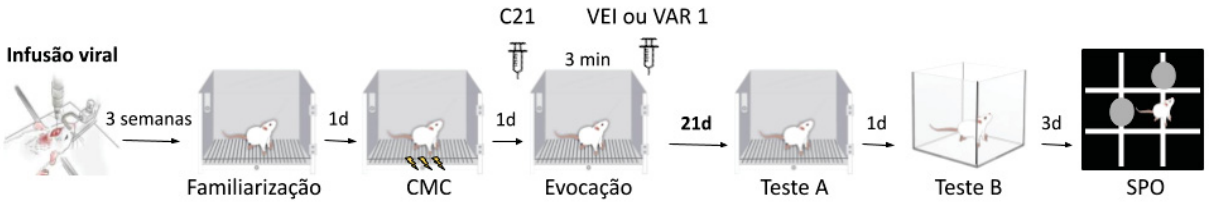


Figura 15. Desenho experimental adotado no experimento 5. Os animais receberam uma infusão viral (AAV8-CaMKIIa-hM4Di-mCherry ou o controle AAV8-CaMKIIa-EGFP, Addgene) no CCA. Após três semanas, os animais foram submetidos ao CMC e receberam C21 1 mg/kg i.p. 30 minutos antes da sessão de evocação e VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 5 minutos após o término da sessão. Os testes foram realizados em um ponto remoto, após 21 dias, no contexto condicionado (Teste A), no dia seguinte no contexto neutro (Teste B). Após 3 dias, os animais foram submetidos ao protocolo de SPO. FONTE: A autora (2024).

3.7 ESTATÍSTICA

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Quando não passaram no teste de normalidade, os dados foram transformados por log(Y) ou sqrt(Y) para alcançar a normalidade. Os dados transformados foram utilizados na análise estatística, mas os resultados foram expressos utilizando os valores brutos. Cada conjunto de dados foi analisado utilizando o teste *t* de Student, análise de variância (ANOVA) de uma via, de duas vias ou de medidas repetidas, de acordo com o desenho experimental. O teste *post hoc* de Newman-Keuls foi aplicado para comparações múltiplas quando o valor de F alcançou um nível de significância definido em $p<0,05$. Para avaliar o tamanho do efeito, o coeficiente eta quadrado parcial (η^2) foi calculado para a ANOVA e o d de Cohen (d) para o teste *t*, considerando$\eta^2 \geq 0,14$ ou $d>0,8$ um efeito grande (Maher; Markey; Ebert-May, 2013). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e pelos valores individuais. O software Statistica 12 (StatSoft) foi utilizado para análise estatística, e o GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism) foi utilizado para elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: A INIBIÇÃO DA PDE5 APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO INDUZ UMA GENERALIZAÇÃO DEPENDENTE DO TEMPO

O objetivo foi avaliar os efeitos da inibição da PDE5 5 minutos após a evocação na generalização da memória de medo, avaliada em grupos independentes nos pontos de tempo recente (n=10/grupo), intermediário (n=9-13/grupo) e remoto (n=8-10/grupo), conforme mostra a Figura 16A.

4.1.1 A inibição da PDE5 5 minutos após a evocação não afeta a reconsolidação ou generalização da memória de medo nos testes recentes

Nos testes de memória recente, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da reexposição ao contexto condicionado ($F_{(1,27)}$=6,823; p=0,014; η^2=0,202), mas nenhum efeito do tratamento ($F_{(2,27)}$=0,734; p=0,489; η^2=0,052) ou interação entre os fatores ($F_{(2,27)}$=1,436; p=0,255; η^2=0,096). Como observado na Figura 16B, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos durante a evocação e o Teste A. Além disso, a ANOVA de uma via não mostrou efeito do tratamento com VAR tanto no Teste B ($F_{(2,27)}$=3,251; p=0,054; η^2=0,194) quanto no índice de generalização ($F_{(2,27)}$=1,920; p=0,166; η^2=0,124), conforme observado nas Figuras 16C-D, respectivamente. Esses resultados sugerem que a inibição da PDE5 durante a reconsolidação não induz alterações na memória de medo quando avaliada em um ponto de tempo recente.

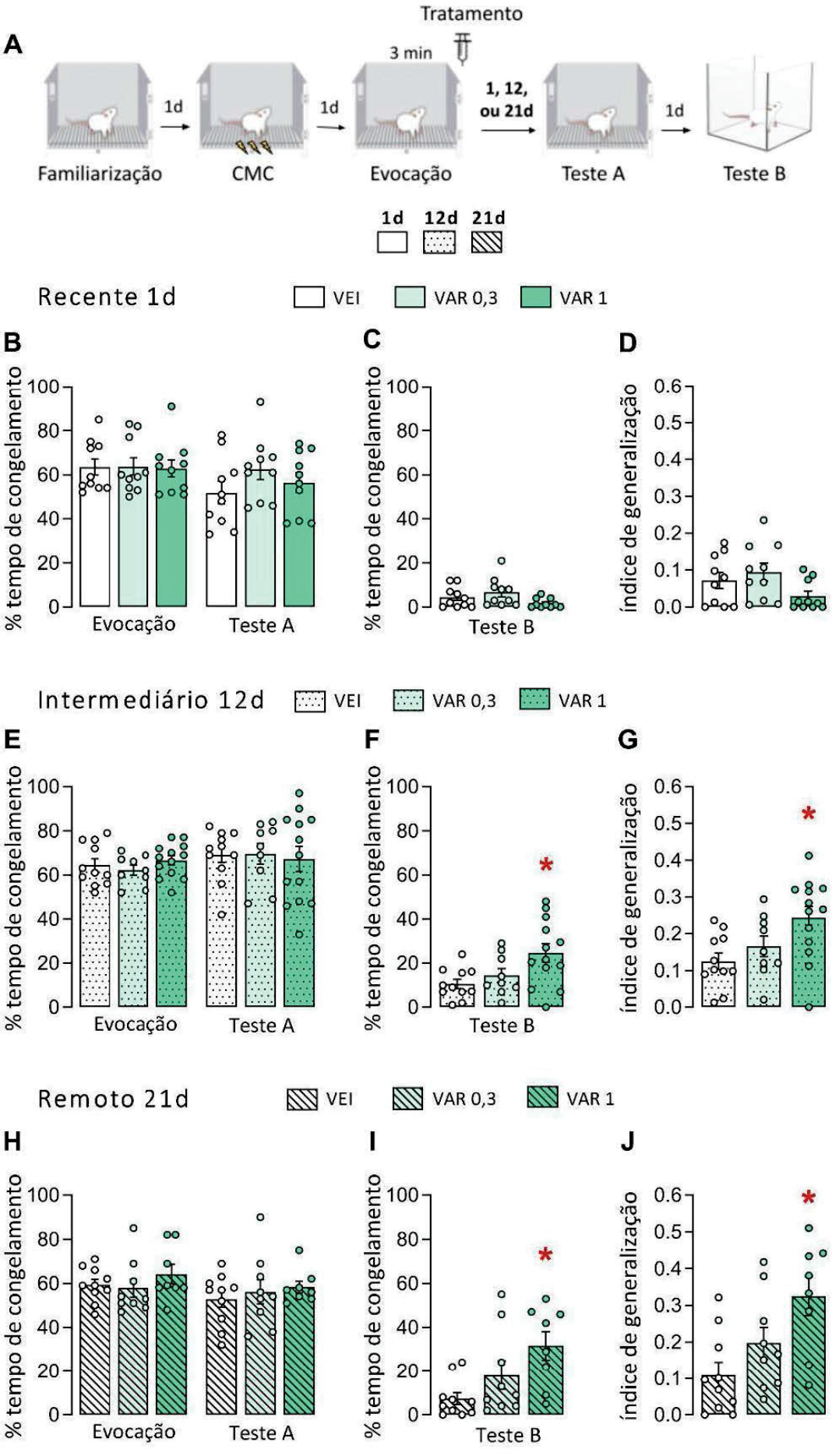

A
Tratamento
3 min
1d
1d
1, 12, ou 21d
1d
Familiarização
CMC
Evocação
Teste A
Teste B
1d 12d 21d
Recente 1d
VEI
VAR 0,3
VAR 1
B
C
D
% tempo de congelamento
índice de generalização
Evocação
Teste A
Teste B
Intermediário 12d
E
F
G
Remoto 21d
H
I
J

Figura 16. Efeitos da inibição da PDE5 5 minutos após a evocação na generalização da memória. **A)** Desenho experimental. **B-D)** Efeitos da inibição da PDE5 nos testes de memória recente. **B)** Não foram observadas diferenças entre os grupos na sessão de evocação ou no Teste A. **C)** Nenhuma diferença foi observada no Teste B; **D)** ou no índice de generalização. N/grupo: VEI=10; VAR 0,3=10; VAR 1=10. **E-G)** Testes de memória intermediária. **E)** Não foram observadas diferenças entre os grupos na sessão de evocação ou no Teste A. **F)** O grupo VAR 1 mostrou um aumento no comportamento de congelamento no Teste B; **G)** e um aumento do índice de generalização. N/grupo: VEI=11; VAR 0,3=9; VAR 1=13. **H-J)** Testes de memória remota. **H)** Não foram observadas diferenças entre os grupos na sessão de evocação ou no Teste A. **I)** O grupo VAR 1 mostrou um aumento no comportamento de congelamento no Teste B; **J)** e um aumento do índice de generalização. N/grupo: VEI=10; VAR 0,3=9; VAR 1=8. ANOVA de medidas repetidas (evocação e Teste A), ANOVA de uma via (Teste B ou índice de generalização) seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os dados estão apresentados como média ± E.P.M. e os valores individuais. O * representa uma diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo VEI na mesma sessão experimental. FONTE: A autora (2024).

4.1.2 A inibição da PDE5 5 minutos após a evocação induz a generalização da memória de medo em um ponto de tempo intermediário

Nos testes de memória intermediária, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeitos significativos para os fatores interação entre a reexposição ao contexto condicionado e o tratamento ($F_{(2,30)}$=0,777; p=0,468; η^2=0,049), tratamento ($F_{(2,30)}$=0,027; p=0,973; η^2=0,002) ou reexposição ($F_{(1,30)}$=2,851; p=0,102; η^2=0,087). Como observado na Figura 16E, não há diferenças significativas entre os grupos durante a evocação e o Teste A. No entanto, a ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos do tratamento no Teste B ($F_{(2,30)}$=5,004; p=0,013; η^2=0,250) e no índice de generalização ($F_{(2,30)}$=5,075; p=0,013; η^2=0,253). Como observado nas Figuras 16F e 16G, o grupo tratado com a dose mais alta de VAR (1 mg/kg) apresentou um aumento no comportamento de congelamento em comparação ao grupo veículo no Teste B (p=0,019), assim como um aumento no índice de generalização (p=0,016), sugerindo que a inibição da PDE5 durante a reconsolidação desencadeia a generalização da memória de medo em um ponto de tempo intermediário.

4.1.3 A inibição da PDE5 5 minutos após a evocação induz a generalização da memória de medo em um ponto de tempo remoto

Nos testes de memória remota, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeitos significativos para os fatores interação entre a reexposição ao contexto condicionado e o tratamento ($F_{(2,24)}$=0,274; p=0,762; η^2=0,022), tratamento ($F_{(2,24)}$=0,899; p=0,420; η2=0,070) ou reexposição ($F_{(1,24)}$=3,316; p=0,081; η^2=0,121).

Como observado na Figura 16H, não há diferenças significativas entre os grupos durante a evocação e o Teste A. No entanto, a ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento no Teste B ($F_{(2,24)}$=5,946; *p*=0,008; η^2=0,331) e no índice de generalização ($F_{(2,24)}$=6,089; *p*=0,007; η^2=0,337). Como observado nas Figuras 16I e 16J, o grupo tratado com a dose mais alta de VAR apresentou um comportamento aumentado de congelamento em comparação ao grupo veículo no Teste B (p=0,006), assim como um aumento no índice de generalização (*p*=0,005), sugerindo que a inibição da PDE5 durante a reconsolidação induziu a generalização da memória de medo em um ponto de tempo remoto.

Em conjunto, esses resultados mostram que não há diferenças prévias entre os grupos durante a evocação e a nem efeito da inibição da PDE5 após a evocação na expressão do medo no contexto condicionado, independentemente dos pontos de tempo adotados (Figuras 16B, 16E e 16H). No entanto, a inibição da PDE5 durante a reconsolidação desencadeia a generalização da memória de medo ao longo do tempo (Figuras 16C-D, 16F-G e 16I-J). Importante destacar que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com veículo expostos ao Teste B em diferentes pontos de tempo ($F_{(2,28)}$=2,026; *p*=0,150; η^2=0,126), sugerindo que o protocolo não desencadeia a generalização dependente do tempo.

4.2 EXPERIMENTO 2: A INIBIÇÃO DA PDE5 APÓS A EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO PREJUDICA O PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE PADRÃO AVALIADO EM UM PONTO DE TEMPO REMOTO

O objetivo foi avaliar se a inibição da PDE5 após a evocação da memória de medo prejudicaria o processo de separação de padrão em grupos independentes de animais após os pontos de tempo recente (n=7/grupo), intermediário (n=5-7/grupo) e remoto (n=8-10/grupo), conforme mostra a Figura 17A. Os dados sobre o comportamento de congelamento foram omitidos, pois já estão incluídos nos resultados do experimento anterior.

No teste de SPO, o teste *t* de Student não mostrou efeito do tratamento com VAR em comparação ao grupo VEI para os testes recente (t_{12}=0,589; *p*=0,567; *d*=0,315) e intermediário (t_{10}=-0,311; *p*=0,762; *d*=0,184). Como observado nas Figuras 17B e 17C, não foram detectadas diferenças no índice de discriminação

entre os grupos, sugerindo que a inibição da PDE5 5 minutos após a evocação recente não afetou o processo de separação de padrão avaliado em pontos de tempo recente e intermediário. No entanto, no teste de SPO remoto, o teste *t* de Student mostrou um efeito significativo do tratamento com VAR em comparação ao grupo VEI (t_{16}=2,612; *p*=0,019; *d*=1,221). Conforme observado na Figura 17D, o grupo tratado com VAR apresentou uma diminuição do índice de discriminação em comparação ao grupo controle durante o teste de SPO remoto, sugerindo que a inibição da PDE5 5 minutos após a evocação recente resultou em um prejuízo no processo de separação de padrão observado apenas em um ponto de tempo remoto. Além disso, não houve diferença na exploração total dos objetos entre os grupos, descartando uma possível alteração do grupo VAR 1 nesse sentido (Apêndice 2A).

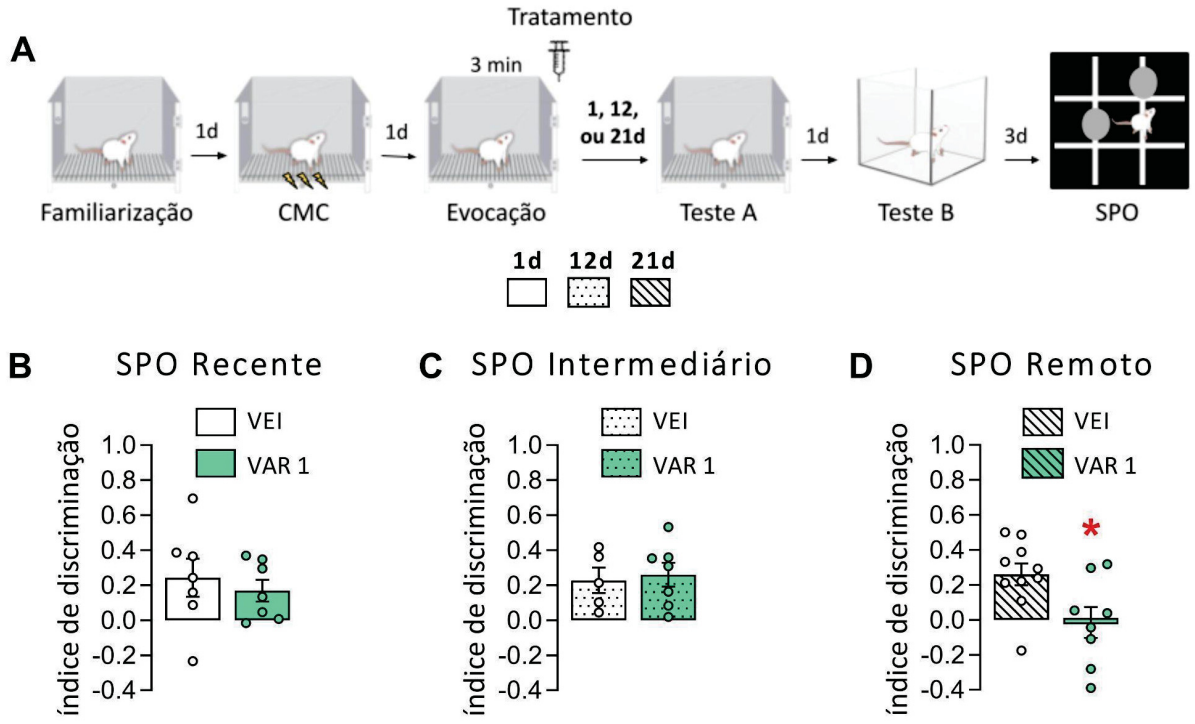


Figura 17. Efeitos da inibição da PDE5 5 minutos após a evocação da memória de medo no teste de separação de padrão de objetos (SPO). **A)** Desenho experimental. **B)** Para o teste de SPO recente, não foram observadas diferenças entre os grupos. N/grupo: VEI=7; VAR 1=7. **C)** Para o teste de SPO intermediário, nenhuma diferença entre os grupos foi observada. N/grupo: VEI=7; VAR 1=7. **D)** No teste de SPO remoto, o tratamento com VAR 1 prejudicou o índice de discriminação. N/grupo: VEI=10; VAR 1=8. Teste *t* de Student. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. e os valores individuais do índice de discriminação. O * representa uma diferença significativa (*p*<0,05) em relação ao grupo VEI na mesma sessão experimental. FONTE: A autora (2024).

4.3 EXPERIMENTO 3: OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 NA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E NA SEPARAÇÃO DE PADRÃO DEPENDEM DA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA

O objetivo foi avaliar se os efeitos da inibição da PDE5 observados na generalização da memória de medo e no teste de SPO dependem do processo de reativação/reconsolidação da memória. Após um protocolo de não-evocação, grupos independentes de animais foram testados apenas nos pontos de tempo intermediário (n=10/grupo) e remoto (n=10-11/grupo), já que nenhum efeito foi observado no ponto de tempo recente, conforme mostra a Figura 18A.

4.3.1 A omissão da evocação previne a generalização induzida pela inibição da PDE5 no ponto de tempo intermediário

Nos testes de memória intermediária, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeitos significativos para os fatores interação entre a reexposição ao contexto neutro (sessão de não-evocação e Teste B) e o tratamento ($F_{(1,18)}$=0,791; *p*=0,386; η^2=0,042), tratamento ($F_{(1,18)}$=0,203; *p*=0,657; η^2=0,011) e reexposição ($F_{(1,18)}$=1,424; *p*=0,248; η^2=0,073), como observado nas Figuras 18B e 18D. Além disso, o teste *t* de Student não mostrou efeito do tratamento no Teste A (t_{18}=0,522; *p*=0,608; *d*=0,223; Figura 18C) e nem no índice de generalização (t_{18}=0,440; *p*=0,665; *d*=0,235; Figura 18E). Esses resultados mostram não haver diferenças significativas entre os grupos na evocação, Teste A, Teste B ou índice de generalização, ou seja, a omissão da evocação aboliu os efeitos de generalização anteriormente observados pela inibição da PDE5 no ponto de tempo intermediário. Estes resultados sugerem que a generalização no ponto de tempo intermediário induzida pela inibição da PDE5 depende da evocação da memória. Adicionalmente, assim como observado previamente, no teste de SPO intermediário o teste *t* de Student não mostrou diferença no índice de discriminação entre os grupos no protocolo de não-evocação (t_{18}=-1,368; *p*=0,188; *d*=0,612), como observado na Figura 18F.

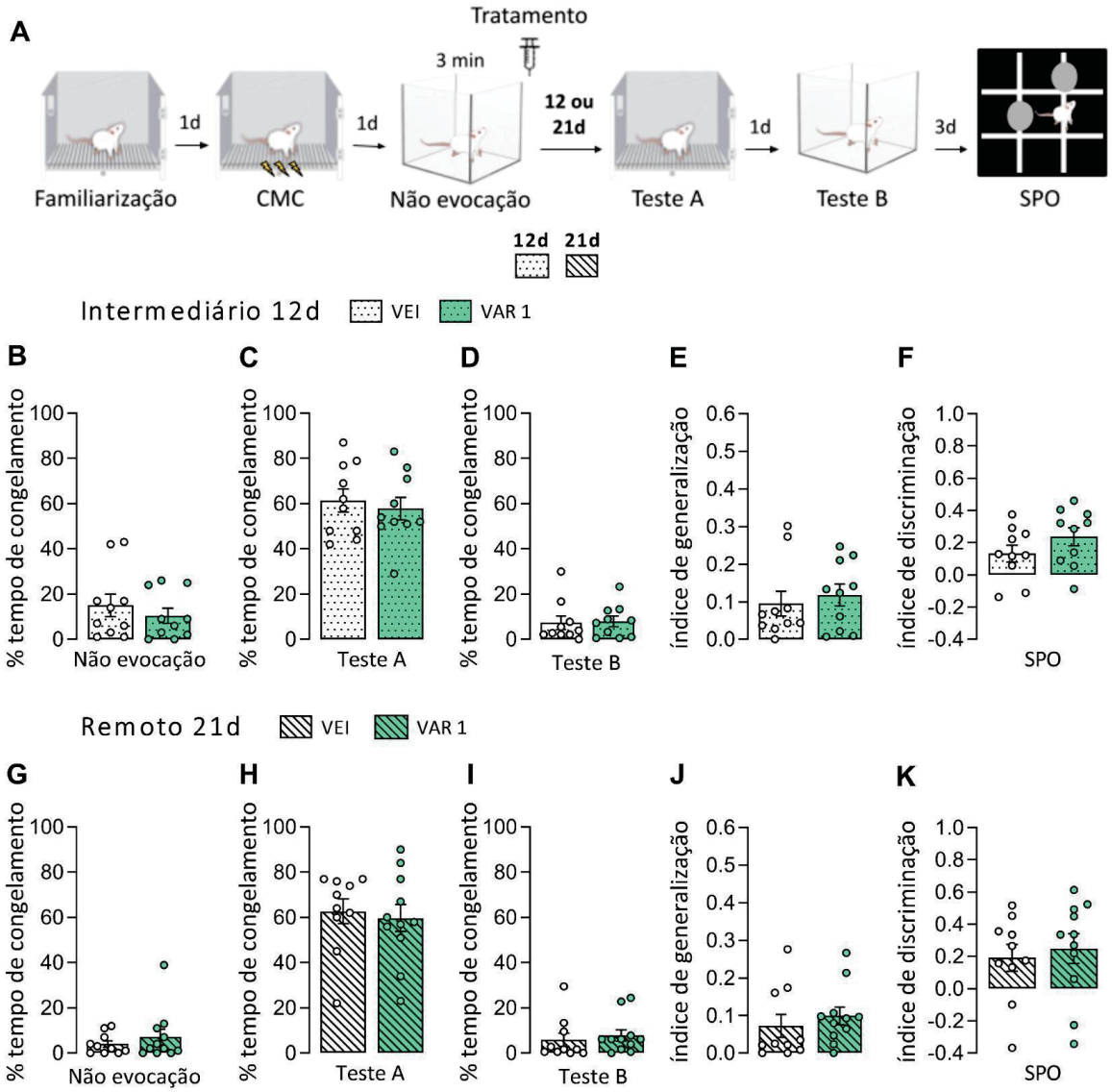


Figura 18. Efeitos da inibição da PDE5 após uma sessão de não-evocação. **A)** Desenho experimental. **B-F)** Testes intermediários. Não foram observadas diferenças entre os grupos **B)** na sessão de não-evocação, **C)** Teste A, **D)** Teste B, **E)** índice de generalização ou **F)** índice de discriminação no teste de SPO. N/grupo: VEI=10; VAR 1=10. **G-K)** Testes remotos. Não foram observadas diferenças entre os grupos **G)** na sessão de não-evocação, **H)** Teste A, **I)** Teste B, **J)** índice de generalização ou **K)** índice de discriminação no teste de SPO. N/grupo: VEI=10; VAR 1=11. ANOVA de medidas repetidas (não-evocação e Teste B) e teste *t* de Student (Teste A, índice de generalização ou índice de discriminação). Os dados estão apresentados como média ± E.P.M. e os valores individuais. FONTE: A autora (2024).

4.3.2 A omissão da evocação previne a generalização e o prejuízo da separação de padrão induzidos pela inibição da PDE5 no ponto de tempo remoto

De maneira semelhante ao observado nos testes intermediários, para os testes de memória remota, a ANOVA de medidas repetidas não mostrou interação

entre a reexposição ao contexto neutro (sessão de não-evocação e Teste B) e o tratamento ($F_{(1,19)}$=0,050; *p*=0,825; η^2=0,003; Figuras 18G e 18I) e nenhum efeito do tratamento ($F_{(1,19)}$=0,838; *p*=0,371; η^2=0,042) ou da reexposição ($F_{(1,19)}$=0,552; *p*=0,467; η^2=0,028). O teste *t* de Student não mostrou efeito do tratamento no Teste A (t_{19}=-0,386; *p*=0,704; *d*=0,158; Figura 18H), nem no índice de generalização (t_{19}=0,615; *p*=0,546; *d*=0,306; Figura 18J) ou no índice de discriminação do teste de SPO remoto (t_{19}=-0,445; *p*=0,661; *d*=0,195; Figura 18K). Como mostrado nas Figuras 18G-K, não há diferenças significativas entre os grupos na evocação, Teste A, Teste B, índice de generalização ou no teste de SPO, o que mostra que os efeitos do VAR foram abolidos quando a evocação foi omitida. Estes resultados sugerem que os efeitos da inibição da PDE5 no ponto de tempo remoto dependem da evocação da memória.

4.4 EXPERIMENTO 4: A INIBIÇÃO DA PDE5 6 HORAS APÓS A EVOCAÇÃO NÃO AFETA A GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO E NEM A SEPARAÇÃO DE PADRÃO

O objetivo foi avaliar os efeitos da inibição da PDE5 fora da janela de reconsolidação. Os animais receberam VAR 1 mg/kg ou VEI i.p. 6 horas após a evocação e foram testados no ponto de tempo remoto (n=8-9/grupo), como observado na Figura 19A.

A ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeitos significativos para os fatores interação entre a reexposição ao contexto condicionado e o tratamento ($F_{(1,15)}$=2,570; *p*=0,130; η^2=0,146), tratamento ($F_{(1,15)}$=0,248; *p*=0,625; η^2=0,016) e reexposição ($F_{(1,15)}$=0,501; *p*=0,490; η^2=0,032). Como observado na Figura 19B, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na evocação e no Teste A. Além disso, o teste *t* de Student mostrou não haver efeito do tratamento com VAR no Teste B (t_{15}=-1,238; *p*=0,235; *d*=0,707; Figura 19C), nem no índice de generalização (t_{15}=-1,592; *p*=0,132; *d*=0,789; Figura 19D) ou no índice de discriminação no teste de SPO (t_{15}=-1,219; *p*=0,242; *d*=0,601; Figura 19E). Como mostrado nas Figuras 19B-E, quando o VAR foi administrado 6 horas após a evocação nenhum efeito foi observado. Isso sugere que os efeitos de indução da generalização e prejuízo do da separação de padrão estão restritos à inibição da PDE5 dentro da janela de tempo da reconsolidação.

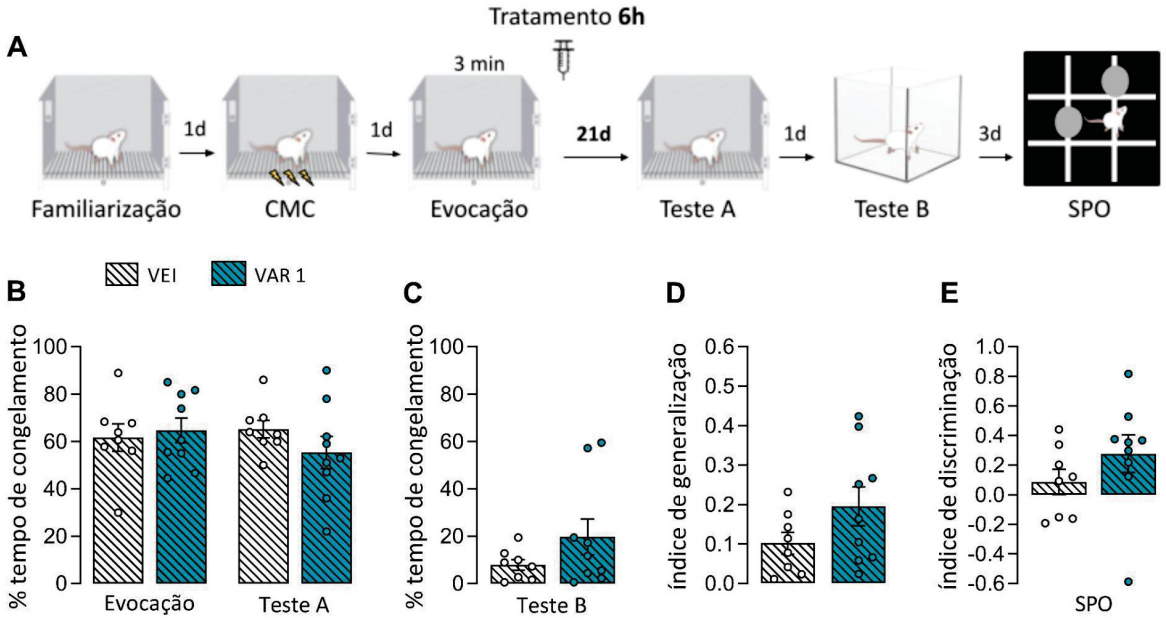


Figura 19. Efeitos da inibição da PDE5 6 horas após a evocação. **A)** Desenho experimental. **B)** Não foram observadas diferenças entre os grupos na sessão de evocação ou no Teste A. **C)** Nenhuma diferença foi observada no Teste B; **D)** nem no índice de generalização. **E)** No teste de SPO, não foram observadas diferenças entre os grupos no índice de discriminação. N/grupo: VEI=8; VAR 1=9. ANOVA de medidas repetidas (evocação e Teste A) e teste *t* de Student (Teste B, índice de generalização ou índice de discriminação). Os dados estão apresentados como média ± E.P.M. e os valores individuais. FONTE: A autora (2024).

4.5 EXPERIMENTO 5: OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 NA GENERALIZAÇÃO E NA SEPARAÇÃO DE PADRÃO SÃO PREVENIDOS PELA INIBIÇÃO QUIMIOGENÉTICA DO CCA

O objetivo foi avaliar se os efeitos induzidos pela inibição da PDE5 na generalização do medo e na separação de padrão dependem da atividade do CCA. Previamente, realizou-se a infusão viral (AAV8-CaMKIIa-hM4Di-mCherry ou o controle AAV8-CaMKIIa-EGFP) no CCA (Figura 20B). Após o CMC, os animais receberam C21 30 minutos antes da evocação, e VAR 1 mg/kg ou VEI 5 minutos após a evocação e os testes foram realizados no ponto de tempo remoto (n=6-8/grupo), como ilustrado na Figura 20A.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da reexposição ao contexto condicionado ($F_{(1,23)}$=7,229; p=0,013; η^2=0,239), mas não mostrou efeitos significativos para a interação entre os fatores reexposição, tratamento e construto viral ($F_{(1,23)}$=0,296; p=0,591; η^2=0,013) ou para o tratamento ($F_{(1,23)}$=0,006; p=0,941; η^2=0,0002) e o constructo viral ($F_{(1,23)}$=0,002; p=0,964;

η^2=0,00009). Como observado na Figura 20C, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos durante a evocação e o Teste A.

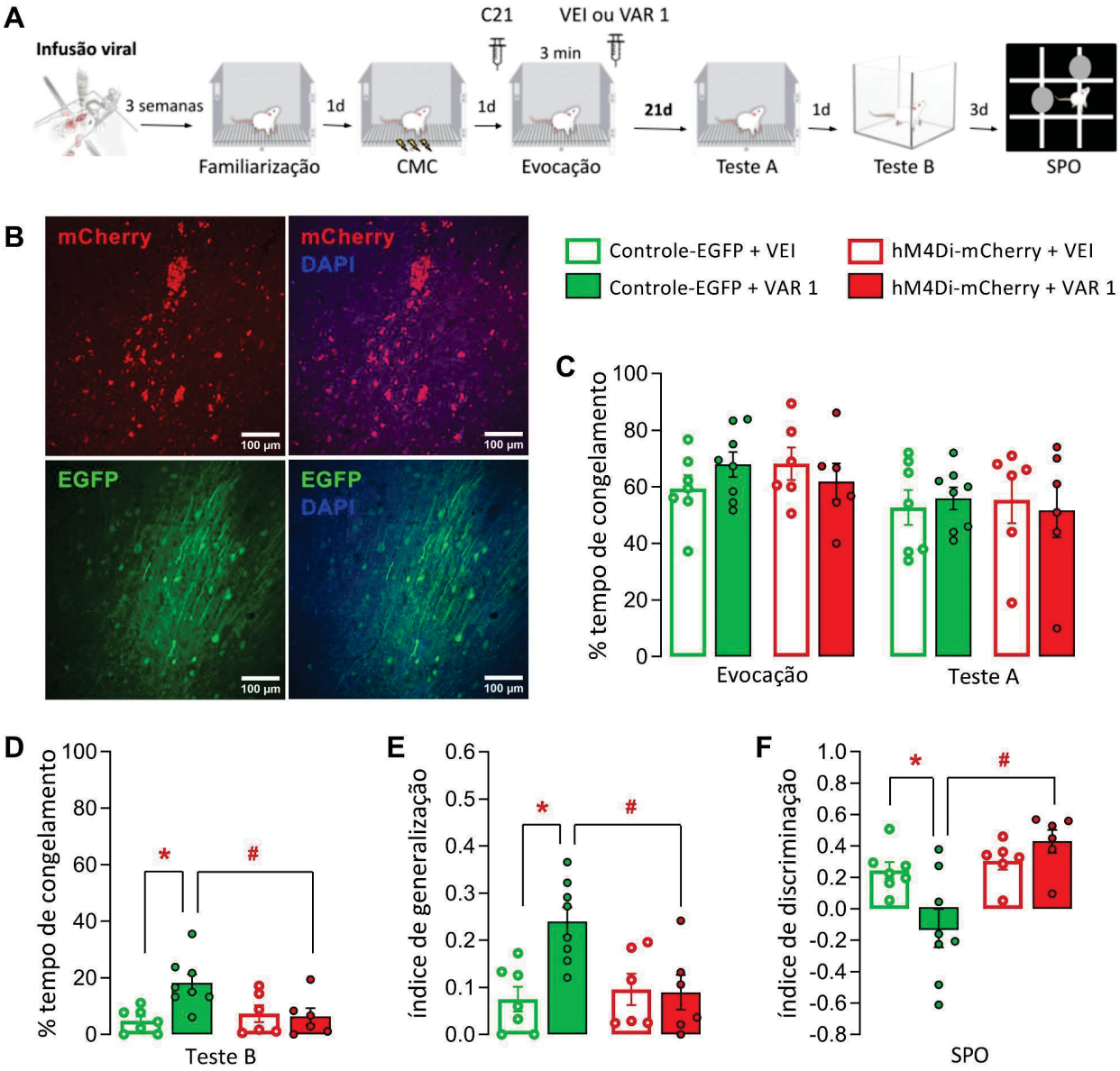


Figura 20. Efeitos da inibição da PDE5 sob a inibição quimiogenética do CCA. **A)** Desenho experimental. **B)** Linha de cima: neurônios do CCA expressando fluorescência para mCherry em animal hM4Di-mCherry; Linha debaixo: neurônios do CCA expressando fluorescência para EGFP em animal controle-EGFP. À direita imagens com contraste com DAPI. Aumento de 200x. **C)** Não foram observadas diferenças entre os grupos na sessão de evocação ou no Teste A. **D)** O grupo controle-EGFP + VAR 1 mostrou um aumento no comportamento de congelamento no Teste B; **E)** um aumento no índice de generalização; **F)** e uma diminuição no índice de discriminação do teste de SPO. N/grupo: controle-EGFP + VEI=7; controle-EGFP + VAR 1=8; hM4Di-mCherry + VEI=6; hM4Di-mCherry + VAR 1=6. ANOVA de medidas repetidas (evocação e Teste A) e ANOVA de duas vias (Teste B, índice de generalização ou índice de discriminação). Os dados estão apresentados como média ± E.P.M. e os valores individuais. O * representa uma diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo controle-EGFP + VEI na mesma sessão experimental. O # representa uma diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo hM4Di-mCherry + VAR 1 na mesma sessão experimental. FONTE: A autora (2024).

A ANOVA de duas vias mostrou haver interação entre os fatores constructo viral e tratamento para o Teste B ($F_{(1,23)}$=6,652; *p*=0,017; η^2=0,224), para o índice de generalização ($F_{(1,23)}$=7,226; *p*=0,013; η^2=0,239) e para o teste de SPO ($F_{(1,23)}$=7,794; *p*=0,010; η^2=0,253). Como observado nas Figuras 20D-F, o grupo controle-EGFP tratado com VAR apresentou um aumento no comportamento de congelamento no Teste B (*p*=0,012; Figura 20D) em comparação ao grupo controle-EGFP veículo, assim como um aumento no índice de generalização (*p*=0,007; Figura 20E) e uma diminuição do índice de discriminação no SPO (*p*=0,007; Figura 20F) sem alteração da exploração total (Apêndice 2B), reproduzindo os resultados observados anteriormente. Além disso, o grupo controle-EGFP que recebeu VAR foi significativamente diferente do grupo hM4Di-mCherry tratado com VAR tanto no Teste B (*p*=0,027), como no índice de generalização (*p*=0,008) e no SPO (*p*=0,001), sugerindo que a inibição quimiogenética do CCA na evocação recente previne os efeitos da inibição da PDE5 observados ao longo do tempo.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que a inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória recente desencadeia a generalização do medo nos pontos de tempo intermediário e remoto, além de resultar no prejuízo da separação de padrão. Esses efeitos dependem da evocação da memória e estão restritos à janela de tempo da reconsolidação. Os efeitos da inibição da PDE5 no ponto de tempo remoto foram prevenidos pela inibição quimiogenética do CCA durante a reconsolidação recente. Juntos, esses resultados corroboram com a hipótese inicial, mostrando que a inibição da PDE5 durante a reconsolidação desencadeia a generalização do medo ao longo do tempo, de maneira dependente da atividade do CCA.

5.1 OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO RECENTE NA GENERALIZAÇÃO AO LONGO DO TEMPO

A inibição da PDE5 5 minutos após a evocação recente da memória resulta no aumento do comportamento de congelamento no contexto neutro (Teste B) e um aumento do índice de generalização nos pontos de tempo intermediário e remoto, sugerindo a indução da generalização da memória de medo dependente do tempo. A inibição da PDE5 aumenta a via de sinalização do GMPc, a qual é regulada pelo NO. De modo geral, a estimulação da via GMPc/NO tem sido associada a memórias de medo mais intensas, enquanto sua interrupção prejudica o aprendizado aversivo (Baratti; Boccia, 1999; Calixto *et al.*, 2001; Boccia *et al.*, 2011; Fabri *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2021). Especificamente, a atividade da NOS no núcleo rafe dorsal medeia o aumento da memória contextual de medo induzida pelo estresse prolongado único (Sun *et al.*, 2021). Nesse sentido, um inibidor de PDE5, o sildenafil, administrado em camundongos durante aquisição, consolidação ou reconsolidação, aumenta a memória de medo na tarefa de esquiva inibitória (Baratti; Boccia, 1999; Boccia *et al.*, 2011). Por outro lado, um inibidor da síntese de NO (L-NAME) prejudicou o aprendizado de esquiva inibitória (Calixto *et al.*, 2001), assim como um inibidor da nNOS, um sequestrador de NO, ou um inibidor de GMPc no hipocampo prejudicam a expressão da memória de medo contextual (Fabri *et al.*, 2014).

No entanto, o papel da via NO/GMPc na generalização da memória de medo tem sido menos relatado. Por exemplo, o protocolo de estresse prolongado único intensifica a força da memória, resultando na generalização do medo no ponto recente através da ativação da nNOS e do aumento dos níveis de NO no núcleo rafe dorsal (Sun *et al.*, 2021). Na memória de medo generalizada remota, além do aumento da atividade do CCA, também foi observado um maior acoplamento entre nNOS e PSD-95, o qual, por sua vez, aumenta a síntese e liberação de NO (Qin *et al.*, 2019). Além disso, a interrupção desse acoplamento nNOS-PSD-95 no CCA preveniu a generalização em pontos remotos, 14 dias após o condicionamento de medo ao contexto (Qin *et al.*, 2019). Outro trabalho mostrou que estimular esta via, utilizando um doador e um precursor de NO, um análogo sintético do GMPc, ou o sildenafil, após um treino forte de CMC, é suficiente para induzir a generalização de uma memória recente (Gazarini, 2015). Esses resultados corroboram com os achados deste trabalho, por mostrarem a participação da via NO/GMPc na generalização da memória de medo. Entretanto, no presente trabalho foi mostrada uma participação desta via especificamente para generalização que surge ao longo do tempo, e não para a generalização recente, diferente do observado por Sun e colaboradores (2021) e Gazarini (2015). Além disso, pela primeira vez, um papel da via do GMPc durante a etapa de reconsolidação da memória na generalização do medo foi relatado. Especificamente, os resultados deste trabalho sugerem que estimular a via de sinalização do GMPc, por meio da inibição da PDE5, durante a reconsolidação da memória desencadeia a generalização do medo ao longo do tempo.

A importância do processo de reconsolidação da memória para os efeitos observados aqui foi corroborada pelos resultados que mostraram que a omissão da sessão de evocação e a administração tardia (6 horas após a evocação) do inibidor de PDE5 aboliram a generalização previamente observada, sugerindo que os resultados dependem da reativação da memória e estão restritos à janela de tempo da reconsolidação. A ausência de generalização quando não é feita a evocação da memória sugere, especificamente, que a evocação e a labilização da memória são necessárias para os efeitos observados, mas não garante que a inibição da PDE5 recrute mecanismos apenas dentro da janela de reconsolidação para este efeito. De fato, trabalhos mostraram que interferências após a evocação podem atuar após a janela de reconsolidação, em mecanismos de persistência (da Silva *et al.*, 2020).

Além disso, intervenções pós-evocação podem interferir em mecanismos de consolidação sistêmica da memória que foram iniciados após a consolidação (Kitamura *et al.*, 2017; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018). No presente trabalho, quando a inibição da PDE5 foi realizada fora da janela de reconsolidação, com a administração de VAR 6 horas após a evocação, nenhum efeito foi observado, sugerindo que a generalização desencadeada pela inibição da PDE5 5 minutos após a evocação seja mediada por mecanismos recrutados durante a reconsolidação da memória. Adicionalmente, esses resultados mostram que a generalização não é desencadeada somente mediante a administração de VAR 1 mg/kg, mas de maneira integrada ocasionada pela a inibição da PDE5 com VAR especificamente durante a etapa de reconsolidação da memória, onde a PDE5 parece exercer um papel crucial para manter a memória de medo em sua forma adaptativa.

O aumento da generalização, expressão do medo no contexto neutro, representa uma redução da especificidade da memória induzida pela inibição da PDE5. Entretanto, nenhuma diferença foi observada na expressão do medo no contexto condicionado independente do período avaliado. De fato, interferências na memória de medo podem induzir respostas de medo aumentadas em um contexto neutro sem afetar a expressão do medo no contexto condicionado (Gazarini *et al.*, 2015; Poulos *et al.*, 2016). Em contraste com os resultados deste trabalho, a inibição da PDE5 com sildenafil após a reativação da memória causou um aumento no aprendizado de medo em camundongos submetidos à tarefa de esquiva inibitória (Boccia *et al.*, 2011). No entanto, nenhum outro estudo avaliou o efeito de interferências na PDE5 ou na via NO/GMPc durante a reconsolidação da memória. Durante a consolidação da memória de medo em protocolos de esquiva, o inibidor de PDE5 sildenafil resultou em aumento da memória (Baratti; Boccia, 1999) ou em nenhum efeito (Shafiei *et al.*, 2006). A mesma interferência na consolidação e na reconsolidação pode resultar em efeitos diferentes na memória, uma vez que esses processos envolvem mecanismos distintos. Além disso, outras particularidades resultantes das diferentes tarefas de memória de medo (condicionamento clássico *versus* operante), e dos inibidores de PDE5 devem ser consideradas ao comparar esses achados (Gazarini, Stern; Bertoglio, 2023). Entre os inibidores da PDE5, o vardenafil se destaca por sua maior potência e seletividade em comparação ao sildenafil, que pode provocar efeitos secundários devido à inibição da PDE6 (Saenz de Tejada et al., 2001; Sommer, 2005).

Além disso, esses resultados reforçam um aspecto significativo do protocolo de condicionamento de medo ao contexto. A incapacidade de aumentar as respostas de medo no contexto condicionado pode se dar devido à obtenção de um nível máximo de congelamento no contexto pareado, ou seja, por um efeito teto no contexto A. Isso resulta do intenso protocolo de treinamento, que diminui a probabilidade de observar qualquer efeito de fortalecimento da memória no contexto pareado. Tal premissa já foi observada anteriormente com outras interferências farmacológicas (Gazarini *et al.*, 2013; Gazarini, 2015), e um protocolo de CMC mais leve poderia ser adotado aqui para confirmar essa possibilidade para a inibição da PDE5 também, uma vez que diferenças aparentes nos resultados relatados devido às particularidades do protocolo não podem ser descartadas.

Vale ressaltar que a inibição da PDE5 não induziu nenhum efeito de generalização do medo em testes recentes, contrastando com a perda de especificidade da memória nos pontos de tempo intermediário e remoto. Esse seria um resultado esperado caso a incapacidade de aumentar as respostas de medo no contexto condicionado ocorresse pela obtenção de um efeito teto. Portanto, essa interferência farmacológica durante a reconsolidação desencadeou (ou antecipou) uma generalização da memória de medo dependente do tempo. Com isso, podemos sugerir que durante a reativação da memória recente, a atividade da PDE5 esteja mais relacionada à regulação da especificidade da memória, em vez da atualização da memória de medo original. Vale notar que nosso protocolo de CMC, por si só, não conseguiu induzir tal generalização dependente do tempo, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle expostos ao contexto neutro nos diferentes pontos de tempo. A ausência de generalização dependente do tempo nos grupos controle pode se dever a sessão de familiarização adotada no protocolo, considerando que a pré-exposição ao contexto de treinamento antes do condicionamento é conhecida por prevenir a perda gradual da especificidade da memória (Biedenkapp; Rudy, 2007). Assim, a inibição da PDE5 durante a reconsolidação resulta em mudanças neurobiológicas que induzem a generalização da memória de medo dependente do tempo que normalmente não ocorreria no protocolo adotado.

5.2 O EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5 DURANTE A RECONSOLIDAÇÃO RECENTE NA SEPARAÇÃO DE PADRÃO

O tratamento com VAR 5 minutos após a evocação da memória de medo reduziu significativamente o índice de discriminação na tarefa de separação de padrão de objetos no ponto de tempo remoto, sugerindo um prejuízo na separação de padrão nesse momento. No entanto, a inibição da PDE5 não alterou o tempo total de exploração dos objetos, o que descarta a possibilidade de que as mudanças observadas sejam atribuídas a um aumento no comportamento de congelamento e a uma redução na exploração dos objetos, o que poderia ocorrer devido à expressão da generalização do medo também no teste SPO. Adicionalmente, o protocolo do teste SPO por si só inclui uma longa sessão de habituação à arena para garantir que o ambiente não seja um estímulo estressor para o animal, permitindo que ele se concentre na exploração dos objetos, e não na exploração do ambiente em si.

Além disso, não foram observados efeitos na separação de padrão quando os pontos recente e intermediário foram avaliados. Esse resultado sugere que o prejuízo na separação de padrão se desenvolve gradualmente ao longo do tempo e está associado à generalização dependente do tempo induzida pela interferência farmacológica durante a reconsolidação, e não pela inibição da PDE5 em si. De fato, quando a PDE5 foi inibida após a omissão da sessão de evocação ou fora da janela de reconsolidação, o prejuízo na separação de padrão no ponto remoto não foi replicado. Esses achados indicam que o prejuízo remoto no processo de separação de padrão coincide com o desenvolvimento da generalização desencadeada pela inibição da PDE5 durante a reconsolidação, como também sugerido por outros estudos. Foi relatada uma associação entre um pior desempenho na separação de padrão comportamental e um aumento da generalização em escores de expectativa de choque em humanos saudáveis (Lange *et al.*, 2017). Também foi sugerido que estímulos traumáticos estão associados à redução da neurogênese hipocampal adulta, relacionada à separação de padrão prejudicada e generalização do medo (Kheirbek *et al.*, 2012). Em roedores, o prejuízo na neurogênese hipocampal dificulta a discriminação contextual do medo (McHugh *et al.*, 2007; Nakashiba *et al.*, 2012; Tronel *et al.*, 2012), enquanto seu aumento melhora o processo de separação de padrão, resultando em uma discriminação contextual do medo aprimorada (Sahay *et al.*, 2011; Kheirbek; Tannenholz; Hen, 2012). No presente trabalho, a inibição da

PDE5 durante a reconsolidação pode ter influenciado o processamento hipocampal, resultando em prejuízo na separação de padrão no ponto remoto e na generalização da memória dependente do tempo. A interação entre os efeitos de generalização da via GMPc, influenciada pela inibição da PDE5, e o prejuízo na separação de padrão foi relatada pela primeira vez neste estudo. O envolvimento do hipocampo neste caso, no entanto, ainda precisa ser investigado.

Apesar do protocolo de separação de padrão de objetos ter sido adaptado para avaliar o processo de separação de padrão, o teste se baseia na avaliação de uma memória episódica de curta duração (memória de localização de objetos, avaliada depois de 1 h). Com isso, os resultados observados neste trabalho podem ser interpretados como um prejuízo de memória declarativa de curta duração que se desenvolve ao longo do tempo, associado ao medo generalizado. Esse efeito foi desencadeado pela inibição da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo recente. Pacientes com TEPT, além de apresentarem uma memória mal-adaptativa caracterizada pelo medo generalizado e resistência à extinção, enfrentam um prejuízo cognitivo que dificulta o processamento de outros tipos de memória, como as memórias episódicas (Schuitevoerder *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2015). Em conjunto, a inibição da PDE5 durante a reconsolidação parece favorecer o desenvolvimento de uma memória de medo mal-adaptativa, semelhante ao observado no TEPT. Outros estudos mostraram que o aumento da sinalização do NO leva à resistência da extinção do medo (Lisboa; Gomes; Silva, 2015; Cai *et al.*, 2018; Jankovic; Bogicevic; Knezevic, 2024). No entanto, se a inibição da PDE5 durante a reconsolidação ocasionaria resistência à extinção - outra característica da memória de medo mal-adaptativa - permanece a ser investigado.

5.3 A PARTICIPAÇÃO DO CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NOS EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PDE5

Está bem descrito que memórias contextuais de medo podem se tornar menos precisas ao longo do tempo, à medida que se tornam mais esquemáticas conforme o engrama cortical amadurece e se torna mais necessário para a evocação e expressão da memória (Kitamura *et al.*, 2017; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018). Uma das regiões corticais relevantes para esse processo é o CCA, que está envolvido com a alocação de memórias remotas (Frankland *et al.*, 2004;

Silva; Burns; Gräff, 2019; da Silva *et al.*, 2020) e com a generalização que ocorre ao longo do tempo (Bian *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2019). De fato, já foi demonstrado em roedores que, após 2 semanas, a memória contextual de medo é mais dependente do CCA, enquanto o envolvimento do hipocampo é reduzido (Frankland *et al.*, 2004; Frankland; Bontempi, 2005; Kitamura *et al.*, 2009; Einarsson; Pors; Nader, 2015). No entanto, o papel do CCA na reconsolidação de memórias recentes e remotas ainda é debatido. Por um lado, foi relatado que o CCA está envolvido especificamente na reconsolidação remota (da Silva *et al.*, 2020). Por outro lado, anteriormente foi demonstrado sua participação tanto na reconsolidação recente quanto remota (Einarsson; Nader, 2012).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a inibição quimiogenética do CCA durante uma evocação recente impediu os efeitos induzidos pela inibição da PDE5 na generalização e separação de padrão, sugerindo que a atividade dessa região é necessária para esses resultados. A técnica de quimiogenética permite a inibição precisa e temporária de regiões cerebrais, com danos mínimos ao administrar um agonista DREADD sistemicamente, evitando métodos invasivos como lesões cerebrais ou implantes de fibras ópticas (Smith *et al.*, 2016; Navabpour *et al.*, 2020). Em nosso estudo, os receptores hM4Di foram expressos primordialmente em neurônios excitatórios devido ao direcionamento ao promotor CaMKIIα (Nathanson *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013), diferenciando esse método de outros que afetam toda a atividade neural, incluindo neurônios inibitórios. Adicionalmente, utilizamos o C21 como agonista DREADD, que surgiu como uma alternativa às limitações do CNO (clozapina-N-óxido). O CNO apresenta baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica em ratos e gera efeitos *off-target* devido à sua conversão em clozapina, um metabólito ativo (Gomez *et al*, 2017; Goutaudier *et al*., 2020). Além disso, a inibição quimiogenética se assemelha melhor às reduções naturais na atividade neuronal em comparação com abordagens optogenéticas mais abruptas, aumentando sua adequação para investigar a base neurobiológica da generalização do medo.

Corroborando com o observado neste trabalho, o acoplamento nNOS-PSD-95, que aumenta a sinalização de NO, foi mostrado como importante no CCA para o surgimento da generalização dependente do tempo (Qin *et al.*, 2019). No presente trabalho, a inibição quimiogenética do CCA ocorreu durante a evocação recente da memória (um dia após o condicionamento) no mesmo dia da inibição

farmacológica da PDE5. É importante ressaltar que essa manipulação não afetou a expressão do medo no contexto condicionado, visto que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no Teste A comparado com a evocação, sugerindo que o CCA não é necessário para a evocação e reconsolidação recentes. Esse achado concorda com estudos anteriores, que enfatizam o papel seletivo do CCA na evocação e reconsolidação de memórias remotas, mas não recentes (Frankland *et al.*, 2004; Silva; Burns; Gräff, 2019; da Silva *et al.*, 2020). Isso ocorre pois o engrama cortical geralmente está em sua forma silenciosa em uma evocação recente, necessitando da maturação ao longo do tempo para ser recrutado (Frankland *et al.*, 2004; Kitamura *et al.*, 2017; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018; Makino *et al.*, 2019; Silva; Burns; Gräff, 2019; Wirt; Hyman, 2019). Portanto, sugerimos que a inibição da PDE5 altera a atividade do CCA em um ponto recente, talvez antecipando a ativação do engrama do CCA geralmente silencioso, como ilustrado na Figura 21. Isso levaria a uma maturação precoce do engrama, prejudicando a precisão da memória de medo ao transformá-la prematuramente em uma memória mais esquemática, uma vez que seu recrutamento é necessário para os efeitos da inibição da PDE5 na especificidade da memória e separação de padrão ao longo do tempo. Devido à participação da via do NO na LTP (Monfort *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2024), e ao favorecimento da transcrição de proteínas relacionadas à plasticidade pela via do GMPc, a inibição da PDE5 pode engajar mecanismos de plasticidade suficientes para ativar o engrama do CCA quando geralmente ainda está imaturo. Isso pode ocorrer, por exemplo, pelo precoce aumento das espinhas dendríticas dos neurônios que compõem o engrama do CCA, que foi visto como característica do engrama quando amadurecido ao longo do tempo (Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018). Notavelmente, o prejuízo na precisão da memória é evidenciado apenas no ponto remoto, quando o CCA é normalmente recrutado. No entanto, mais estudos são necessários para aprimorar e testar essa hipótese.

Além do CCA, o hipocampo ventral (HV) também apresentou uma atividade aumentada durante a evocação de uma memória generalizada remota (Bian *et al.*, 2019). Foi visto que antes da evocação remota, a inibição farmacológica (Cullen *et al.*, 2015) ou quimiogenética (Bian *et al.*, 2019) do CCA ou do HV resultou no prejuízo específico da expressão da generalização da memória de medo ao contexto. A expressão generalizada do medo também foi prejudicada em um ponto

de tempo remoto quando as projeções do CCA para o HV foram inibidas quimiogeneticamente antes da evocação remota (Bian *et al.*, 2019), demonstrando o papel essencial das projeções CCA-HV na mediação da generalização do medo dependente do tempo. As projeções do CCA e do HV para a amígdala basolateral (BLA) também desempenham um papel essencial na generalização (Ortiz *et al.*, 2019). Com isso, não podemos descartar o envolvimento das projeções do CCA para outras regiões nos efeitos aqui observados.

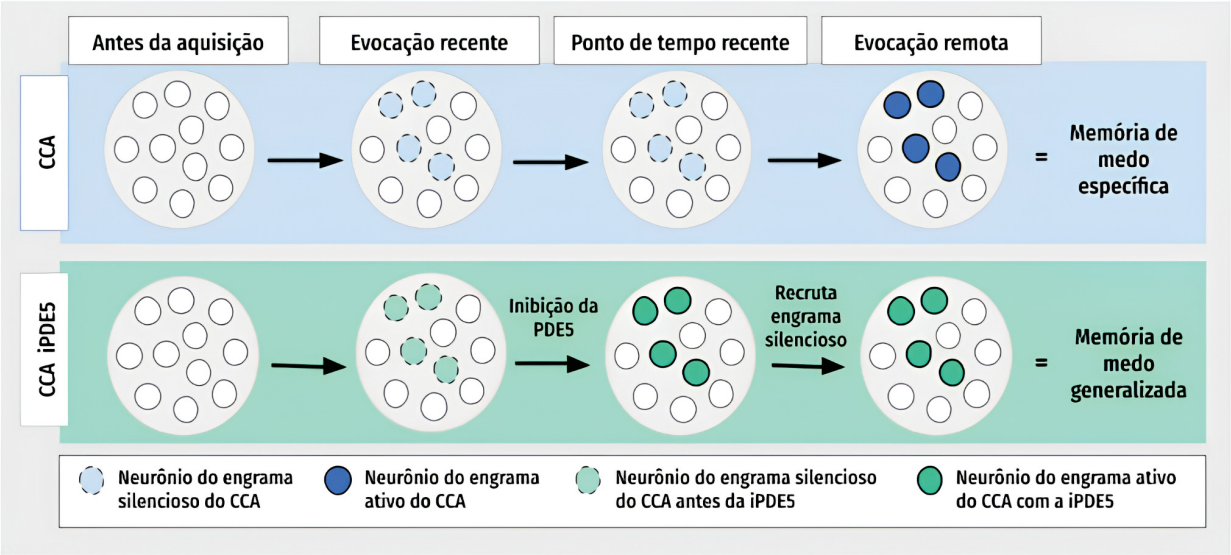


Figura 21. Possível mecanismo de participação do CCA na generalização dependente do tempo desencadeada pela inibição da PDE5. O engrama do CCA normalmente encontra-se silencioso durante a evocação recente, mas ativo e necessário para a evocação remota. Sugerimos que os neurônios do engrama silencioso do CCA sejam recrutados quando a PDE5 é inibida após uma evocação recente, mudando o engrama para sua forma ativa, maturada precocemente, resultando em uma memória de medo remota generalizada. FONTE: A autora (2024).

5.4 LIMITAÇÕES

Os efeitos observados foram avaliados exclusivamente em ratos machos, limitando nossa capacidade em saber se seriam replicáveis para fêmeas. Isso destaca a necessidade de investigar possíveis diferenças sexuais nos efeitos da inibição da PDE5 na generalização da memória de medo. Além disso, seria útil avaliar outros aspectos da memória de medo mal-adaptativa, como a resistência à extinção, após a inibição da PDE5 durante a evocação recente, a fim de determinar se essa manipulação também afeta esses aspectos.

Embora a via de sinalização do NO e GMPc tenha sido implicada na generalização do medo (Gazarini, 2015; Qin *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021), os

mecanismos moleculares específicos que conectam a inibição da PDE5 com o recrutamento do CCA e a generalização do medo não foram investigados. Estudos futuros podem validar a participação do NO e investigar outros alvos *downstream* do GMPc, como a PKG e o fator de transcrição CREB.

Além disso, as projeções do CCA para outras regiões têm um papel importante na memória de medo generalizada (Cullen *et al.*, 2015; Bian *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2019). Como o protocolo quimiogenético realizado aqui inibiu neurônios do CCA, mas não projeções específicas, não podemos excluir o envolvimento de áreas para quais o CCA se projeta, como o HV e a BLA. Adicionalmente, avaliamos exclusivamente o papel dos neurônios no CCA, mas não investigamos se células não neuronais também contribuem para o efeito observado, considerando que elas também podem apresentar a sinalização via NO/GMPc (Murphy *et al.*, 1993).

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo contextual recente parece ser crítica para manter a memória de medo em níveis adaptativos. Isso sugere que a PDE5 pode regular a memória de medo e levanta a possibilidade de que alterações nesta enzima estejam associadas ao desenvolvimento da memória de medo mal-adaptativa no TEPT, tornando-a um potencial biomarcador para este transtorno. Além disso, o diagnóstico definitivo de TEPT é dado ao paciente apenas após 30 dias do evento traumático para garantir que as respostas observadas sejam duradouras e não meramente reflexo de estresse agudo. Os resultados do presente estudo destacam a importância desse período de espera, pois a generalização do medo observada surgiu com o tempo.

Do ponto de vista translacional, permanece em aberto a investigação sobre uma possível suscetibilidade ao desenvolvimento de memórias mal-adaptativas em indivíduos que fazem uso clínico de vardenafil. No entanto, é importante ressaltar que observamos a generalização do medo apenas quando o vardenafil foi administrado durante a janela de reconsolidação da memória. Nesse sentido, drogas que atuam prejudicando a sinalização do GMPc podem ser investigadas para tratar a memória de medo mal-adaptativa.

O protocolo de CMC, utilizando a inibição da PDE5 após a evocação da memória recente, pode ser empregado para estudar a ação de drogas destinadas a

alterar memórias de medo mal-adaptativas semelhantes às observadas no TEPT, permitindo a avaliação de efeitos inclusive em aspectos como a separação de padrão prejudicada.

6 CONCLUSÃO

A atividade da PDE5 durante a reconsolidação da memória de medo contextual recente é crítica para manter a especificidade da memória ao longo do tempo. Quando a PDE5 é inibida, ocorre a generalização da memória de medo nos pontos de tempo intermediário e remoto, de maneira dependente da evocação e do CCA. Com o tempo, a inibição da PDE5 também prejudica o processo de separação de padrão. Em geral, os resultados deste trabalho oferecem implicações significativas para a compreensão da neurobiologia da generalização do medo e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o TEPT.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, W. C.; GODDARD, G. V. Asymmetric relationships between homosynaptic long-term potentiation and heterosynaptic long-term depression. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 717–719, 1983.

AKKERMAN, S.; BLOKLAND, A.; GOETHEM, N. P. VAN; CREMERS, P.; SHAFFER, C. L.; OSGOOD, S. M.; STEINBUSCH, H. W. M.; PRICKAERTS, J. PDE5 inhibition improves acquisition processes after learning via a central mechanism. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 233–239, 2015.

ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current biology: CB**, v. 23, n. 17, p. R746–R750, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-V-TR, 5. ed. texto revisado. Porto Alegre: **Artmed**, 2023.

ARGYROUSI, E. K.; HECKMAN, P. R. A.; PRICKAERTS, J. Role of cyclic nucleotides and their downstream signaling cascades in memory function: Being at the right time at the right spot. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 113, p. 12–38, 2020.

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

BARATTI, C. M.; BOCCIA, M. M. Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. **Behavioural pharmacology**, v. 10, n. 8, p. 731–737, 1999.

BAYER, H.; STERN, C. A. J.; TROYNER, F.; GAZARINI, L.; GUIMARÃES, F. S.; BERTOGLIO, L. J. Medial prefrontal cortex mechanisms of cannabidiol-induced aversive memory reconsolidation impairments. **Neuropharmacology**, v. 205, n. 108913, p. 108913, 2022.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências: Desvendando o sistema nervoso. 4 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 488–520, 2006.

BERGER, W.; MENDLOWICZ, M. V.; MARQUES-PORTELLA, C.; KINRYS, G.; FONTENELLE, L. F.; MARMAR, C. R.; FIGUEIRA, I. Pharmacologic alternatives to antidepressants in posttraumatic stress disorder: A systematic review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 169–180, 2009.

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, v. 30, n. 8, p. 961–965, 1997.

BIAN, X.-L.; QIN, C.; CAI, C.-Y.; ZHOU, Y.; TAO, Y.; LIN, Y.-H.; WU, H.-Y.; CHANG, L.; LUO, C.-X.; ZHU, D.-Y. Anterior cingulate cortex to ventral hippocampus circuit mediates contextual fear generalization. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 29, p. 5728–5739, 2019.

BIEDENKAPP, J. C.; RUDY, J. W. Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: Implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 14, n. 3, p. 200–203, 2007.

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

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. Chapter 1.1 Introduction to the handbook on fear and anxiety. *In*: **Handbook of Anxiety and Fear**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 3–7.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BLISS, T. V.; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The journal of physiology**, v. 232, n. 2, p. 331–356, 1973.

BOCCIA, M. M.; BLAKE, M. G.; KRAWCZYK, M. C.; BARATTI, C. M. Sildenafil, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, enhances memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. **Behavioural brain research**, v. 220, n. 2, p. 319–324, 2011.

BOLLEN, E. *et al.* Improved long-term memory via enhancing cGMP-PKG signaling requires cAMP-PKA signaling. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 11, p. 2497–2505, 2014.

BREWIN, C. R. Episodic memory, perceptual memory, and their interaction: foundations for a theory of posttraumatic stress disorder. **Psychological bulletin**, v. 140, n. 1, p. 69–97, 2014.

BRUENIG, D.; MORRIS, C. P.; MEHTA, D.; HARVEY, W.; LAWFORD, B.; YOUNG, R. M.; VOISEY, J. Nitric oxide pathway genes (NOS1AP and NOS1) are involved in PTSD severity, depression, anxiety, stress and resilience. **Gene**, v. 625, p. 42–48, 2017.

CAI, C.-Y. *et al.* PSD-95-nNOS coupling regulates contextual fear extinction in the dorsal CA3. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

CALIXTO, A. V.; VANDRESEN, N.; NUCCI, G. DE; MORENO, H., Jr; FARIA, M. S. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. **Brain research bulletin**, v. 55, n. 1, p. 37–42, 2001.

CHEN, Q.-Y.; WAN, J.; MA, Y.; ZHUO, M. The pathway-selective dependence of nitric oxide for long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of adult mice. **Biomedicines**, v. 12, n. 5, p. 1072, 2024.

COWAN, N. Chapter 20 What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *In*: **Progress in Brain Research**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 323–338.

CULLEN, P. K.; GILMAN, T. L.; WINIECKI, P.; RICCIO, D. C.; JASNOW, A. M. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. **Neurobiology of learning and memory**, v. 124, p. 19–27, 2015.

DEJEAN, C.; COURTIN, J.; ROZESKE, R. R.; BONNET, M. C.; DOUSSET, V.; MICHELET, T.; HERRY, C. Neuronal circuits for fear expression and recovery: Recent advances and potential therapeutic strategies. **Biological psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 298–306, 2015.

DIERGAARDE, L.; SCHOFFELMEER, A. N. M.; DE VRIES, T. J. Pharmacological manipulation of memory reconsolidation: Towards a novel treatment of pathogenic memories. **European journal of pharmacology**, v. 585, n. 2–3, p. 453–457, 2008.

DILLON, S. E.; TSIVOS, D.; KNIGHT, M.; MCCANN, B.; PENNINGTON, C.; SHIEL, A. I.; CONWAY, M. E.; NEWSON, M. A.; KAUPPINEN, R. A.; COULTHARD, E. J. The impact of ageing reveals distinct roles for human dentate gyrus and CA3 in pattern separation and object recognition memory. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.

DIX, S. L.; AGGLETON, J. P. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. **Behavioural brain research**, v. 99, n. 2, p. 191–200, 1999.

DUDAI, Y. The restless engram: Consolidations never end. **Annual review of neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 227–247, 2012.

DUNSMOOR, J. E.; PAZ, R. Fear generalization and anxiety: Behavioral and neural mechanisms. **Biological psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 336–343, 2015.

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

DYMOND, S.; DUNSMOOR, J. E.; VERVLIET, B.; ROCHE, B.; HERMANS, D. Fear generalization in humans: Systematic review and implications for anxiety disorder research. **Behavior therapy**, v. 46, n. 5, p. 561–582, 2014.

EINARSSON, E. Ö.; NADER, K. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear

memory. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 19, n. 10, p. 449–452, 2012.

EINARSSON, E. Ö.; PORS, J.; NADER, K. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 2, p. 480–487, 2015.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

FABRI, D. R. S.; HOTT, S. C.; REIS, D. G.; BIOJONE, C.; CORRÊA, F. M. A.; RESSTEL, L. B. M. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide-cGMP pathway in the dorsal hippocampus of rats. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 10, p. 1676–1686, 2014.

FANI, N.; JOVANOVIC, T.; ELY, T. D.; BRADLEY, B.; GUTMAN, D.; TONE, E. B.; RESSLER, K. J. Neural correlates of attention bias to threat in post-traumatic stress disorder. **Biological psychology**, v. 90, n. 2, p. 134–142, 2012.

FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural brain research**, v. 110, n. 1–2, p. 73–81, 2000.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.

FASTENRATH, M.; COYNEL, D.; SPALEK, K.; MILNIK, A.; GSCHWIND, L.; ROOZENDAAL, B.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; QUERVAIN, D. J. F. DE. Dynamic modulation of amygdala–hippocampal connectivity by emotional arousal. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 42, p. 13935–13947, 2014.

FELMINGHAM, K. L.; WILLIAMS, L. M.; KEMP, A. H.; RENNIE, C.; GORDON, E.; BRYANT, R. A. Anterior cingulate activity to salient stimuli is modulated by autonomic arousal in Posttraumatic Stress Disorder. **Psychiatry research. Neuroimaging**, v. 173, n. 1, p. 59–62, 2009.

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**, v. 19, n. 5, p. 1031–1047, 1997.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 119–130, 2005.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B.; TALTON, L. E.; KACZMAREK, L.; SILVA, A. J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5672, p. 881–883, 2004.

FRONZA, M. G.; FERREIRA, B. F.; PAVAN-SILVA, I.; GUIMARÃES, F. S.; LISBOA, S. F. “NO” time in fear response: Possible implication of nitric-oxide-related mechanisms in PTSD. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 29, n. 1, p. 89, 2023.

GARFINKEL, S. N.; ABELSON, J. L.; KING, A. P.; SRIPADA, R. K.; WANG, X.; GAINES, L. M.; LIBERZON, I. Impaired contextual modulation of memories in PTSD: an fMRI and psychophysiological study of extinction retention and fear renewal. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 40, p. 13435–13443, 2014.

GAZARINI, L. Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica sobre as memórias de medo: do fisiológico ao disfuncional. Santa Catarina: **UFSC**, 2015.

GAZARINI, L.; STERN, C. A. J.; BERTOGLIO, L. J. On making (and turning adaptive to) maladaptive aversive memories in laboratory rodents. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 147, n. 105101, p. 105101, 2023.

GAZARINI, L.; STERN, C. A. J.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α1- and β-adrenergic receptors. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 20, n. 4, p. 210–219, 2013.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, n. 3, p. 477–485, 1995.

GOMEZ, J. L. et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. **Science** (New York, N.Y.), v. 357, n. 6350, p. 503–507, 2017.

GONZALEZ, M. C.; RADISKE, A.; CAMMAROTA, M. On the involvement of BDNF signaling in memory reconsolidation. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, p. 383, 2019.

GOUTAUDIER, R.; COIZET, V.; CARCENAC, C.; CARNICELLA, S. Compound 21, a two-edged sword with both DREADD-selective and off-target outcomes in rats. **PloS one**, v. 15, n. 9, p. e0238156, 2020.

VAN HAGEN, B. T. J.; GOETHEM, N. P. VAN; LAGATTA, D. C.; PRICKAERTS, J. The object pattern separation (OPS) task: A behavioral paradigm derived from the object recognition task. **Behavioural brain research**, v. 285, p. 44–52, 2015.

HEBB, D. O. The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory. New York: **Wiley**, 1949.

IZQUIERDO, I. Memória / Ivan Izquierdo 3. ed. Porto Alegre: **Artmed** ISBN 978-85-8271-492-8, 2018.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; SOUZA, M. M. DE; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 1998.

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

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural brain research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.

JANKOVIC, T.; BOGICEVIC, M.; KNEZEVIC, N. N. The role of nitric oxide and hormone signaling in chronic stress, anxiety, depression and post-traumatic stress disorder. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 590, n. 112266, p. 112266, 2024.

JAVIDI, H., & YADOLLAHIE, M. Post-traumatic Stress Disorder. **The international journal of occupational and environmental medicine**, 2012.

JIA, P.; YIN, J.; HU, D.; ZHOU, Z. Retrograde adaptive resonance theory based on the role of nitric oxide in long-term potentiation. **Journal of computational neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 129–141, 2007.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSEL, T. **Princípios de Neurociências, 2014. 5 ed**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

KESNER, R. P. Role of the hippocampus in mediating interference as measured by pattern separation processes. **Behavioural processes**, v. 93, p. 148–154, 2013.

KESSLER, R. C. Posttraumatic stress disorder in the national comorbidity survey. **Archives of general psychiatry**, v. 52, n. 12, p. 1048, 1995.

KHEIRBEK, M. A.; KLEMENHAGEN, K. C.; SAHAY, A.; HEN, R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 1613–1620, 2012.

KHEIRBEK, M. A.; TANNENHOLZ, L.; HEN, R. NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 25, p. 8696–8702, 2012.

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

KIDA, S.; JOSSELYN, S. A.; ORTIZ, S. P. DE; KOGAN, J. H.; CHEVERE, I.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A. J. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 348–355, 2002.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 30, n. 2, p. 188–202, 2006.

KITAMURA, T.; OGAWA, S. K.; ROY, D. S.; OKUYAMA, T.; MORRISSEY, M. D.; SMITH, L. M.; REDONDO, R. L.; TONEGAWA, S. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6333, p. 73–78, 2017.

KITAMURA, T.; SAITOH, Y.; TAKASHIMA, N.; MURAYAMA, A.; NIIBORI, Y.; AGETA, H.; SEKIGUCHI, M.; SUGIYAMA, H.; INOKUCHI, K. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 814–827, 2009.

KNOTT, E.; ASSI, M.; RAO, S.; GHOSH, M.; PEARSE, D. Phosphodiesterase inhibitors as a therapeutic approach to neuroprotection and repair. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 696, 2017.

LANGE, I. *et al.* Behavioral pattern separation and its link to the neural mechanisms of fear generalization. **Social cognitive and affective neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 1720–1729, 2017.

LAWFORD, B. R.; MORRIS, C. P.; SWAGELL, C. D.; HUGHES, I. P.; YOUNG, R. M.; VOISEY, J. NOS1AP is associated with increased severity of PTSD and depression in untreated combat veterans. **Journal of affective disorders**, v. 147, n. 1–3, p. 87–93, 2013.

LEAL, S. L.; YASSA, M. A. Integrating new findings and examining clinical applications of pattern separation. **Nature neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 163–173, 2018.

LEDOUX, J. Rethinking the emotional brain. **Neuron**, v. 73, n. 5, p. 1052, 2012.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155–184, 2000.

LEDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 2517–2529, 1988.

LEE, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 413–420, 2009.

LENT, R. Neurociência da mente e do comportamento / autor-organizador Roberto Lent 2. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan** ISBN 978-85-277-3952-8, 2023.

LIN, C.-S.; LIN, G.; XIN, Z.-C.; LUE, T. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 27, p. 3439–3457, 2006.

LISBOA, S. F.; GOMES, F. V.; SILVA, A. L.; ULIANA, D. L.; CAMARGO, L. H. A.; GUIMARAES, F. S.; CUNHA, F. Q.; JOCA, S. R. L.; RESSTEL, L. B. M. Increased contextual fear conditioning in iNOS knockout mice: Additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. yv005-pyv005, 2015.

LOEFFLER, G.; COLLER, R.; TRACY, L.; DERDERIAN, B. R. Prescribing trends in US active duty service members with posttraumatic stress disorder:: A population-based study from 2007-2003. **The journal of clinical psychiatry**, v. 79, n. 4, 2018.

LØMO, T. (ED.). Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus of rats: A study of the responses to high-frequency stimulation. **Journal of Physiology**, v. 187, n. 3, p. 423–431, 1966.

LUCHKINA, N. V., BOLSHAKOV, V. Y. Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity-fear memory connection. **Psychopharmacology**. 2019, 236(1), 163-182.

MAHER, J. M.; MARKEY, J. C.; EBERT-MAY, D. The other half of the story: Effect size analysis in quantitative research. **CBE life sciences education**, v. 12, n. 3, p. 345–351, 2013.

MAKINO, Y.; POLYGALOV, D.; BOLAÑOS, F.; BENUCCI, A.; MCHUGH, T. J. Physiological signature of memory age in the prefrontal-hippocampal circuit. **Cell reports**, v. 29, n. 12, p. 3835- 3846.e5, 2019.

MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 5–21, 2004.

MALINOW, R.; MALENKA, R. C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. **Annual review of neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 103–126, 2002.

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: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 402–413, 2009.

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

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science** (New York, N.Y.), v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MCHUGH, T. J.; JONES, M. W.; QUINN, J. J.; BALTHASAR, N.; COPPARI, R.; ELMQUIST, J. K.; LOWELL, B. B.; FANSELOW, M. S.; WILSON, M. A.;

TONEGAWA, S. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. **Science** (New York, N.Y.), v. 317, n. 5834, p. 94–99, 2007.

MEDEIROS, K. A. A. L.; ALMEIDA-SOUZA, T. H.; SILVA, R. S.; SANTOS, H. F.; SANTOS, E. V.; GOIS, A. M.; LEAL, P. C.; SANTOS, J. R. Involvement of nitric oxide in the neurobiology of fear-like behavior. **Nitric oxide: biology and chemistry**, v. 124, p. 24–31, 2022.

MILAD, M. R.; PITMAN, R. K.; ELLIS, C. B.; GOLD, A. L.; SHIN, L. M.; LASKO, N. B.; ZEIDAN, M. A.; HANDWERGER, K.; ORR, S. P.; RAUCH, S. L. Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. **Biological psychiatry**, v. 66, n. 12, p. 1075–1082, 2009.

MILLER, M. Phosphodiesterase inhibition in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases: current status and potential. **Journal of receptor, ligand and channel research**, p. 19, 2015.

MONFORT, P.; MUÑOZ, M.-D.; KOSENKO, E.; FELIPO, V. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 23, p. 10116–10122, 2002.

MOREY, R. A.; MID-ATLANTIC MIRECC WORKGROUP,; HASWELL, C. C.; STJEPANOVIĆ, D.; DUNSMOOR, J. E.; LABAR, K. S. Neural correlates of conceptual-level fear generalization in posttraumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 8, p. 1380–1389, 2020.

MORRIS, R. G.; ANDERSON, E.; LYNCH, G. S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, v. 319, n. 6056, p. 774–776, 1986.

MÜLLER, G. E., & PILZECKER, A. **Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss**. [s.l.] Zeitschrift für Psychologie, Ergänzungsband, 1900.

MURPHY, S.; SIMMONS, M. L.; AGULLO, L.; GARCIA, A.; FEINSTEIN, D. L.; GALEA, E.; REIS, D. J.; MINC-GOLOMB, D.; SCHWARTZ, J. P. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. **Trends in neurosciences**, v. 16, n. 8, p. 323–328, 1993.

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

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

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. The labile nature of consolidation theory. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 216–219, 2000.

NAGAYOSHI, T.; ISHIKAWA, R.; KIDA, S. Anterior cingulate cortex projections to the dorsal hippocampus positively control the expression of contextual fear

generalization. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 29, n. 3, p. 77–82, 2022.

NAKASHIBA, T. *et al.* Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 188–201, 2012.

NATHANSON, J. L.; YANAGAWA, Y.; OBATA, K.; CALLAWAY, E. M. Preferential labeling of inhibitory and excitatory cortical neurons by endogenous tropism of adeno-associated virus and lentivirus vectors. **Neuroscience**, v. 161, n. 2, p. 441–450, 2009.

NAVABPOUR, S.; KWAPIS, J. L.; JAROME, T. J. A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 108, p. 732–748, 2020.

NEVES, G.; COOKE, S. F.; BLISS, T. V. P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 65–75, 2008.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The Hippocampus as a Cognitive Map**. London, England: Oxford University Press, 1978.

ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 36, n. 7, p. 1773–1802, 2012.

ORTIZ, S.; LATSKO, M. S.; FOUTY, J. L.; DUTTA, S.; ADKINS, J. M.; JASNOW, A. M. Anterior cingulate cortex and ventral hippocampal inputs to the basolateral amygdala selectively control generalized fear. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 33, p. 6526–6539, 2019.

PAVLOV, I. P. **Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex**. [s.l.] Oxford University Press, 1927.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: Compact 6th edition: Compact 6th edition**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2009.

PERCIE DU SERT, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal researchThe ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. **BMJ open science**, v. 44, n. 11, 2020.

PIDGEON, L. M.; MORCOM, A. M. Cortical pattern separation and item-specific memory encoding. **Neuropsychologia**, v. 85, p. 256–271, 2016.

POLLACK, G. A.; BEZEK, J. L.; LEE, S. H.; SCARLATA, M. J.; WEINGAST, L. T.; BERGSTROM, H. C. Cued fear memory generalization increases over time. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 25, n. 7, p. 298–308, 2018.

POULOS, A. M.; MEHTA, N.; LU, B.; AMIR, D.; LIVINGSTON, B.; SANTARELLI, A.; ZHURAVKA, I.; FANSELOW, M. S. Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 23, n. 7, p. 379–385, 2016.

PRICKAERTS, J.; ŞIK, A.; STAVEREN, W. C. G. VAN; KOOPMANS, G.; STEINBUSCH, H. W. M.; STAAY, F. J. VAN DER; VENTE, J. DE; BLOKLAND, A. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. **Neurochemistry international**, v. 45, n. 6, p. 915–928, 2004.

PRICKAERTS, J.; STAVEREN, W. C. G. VAN; ŞIK, A.; MARKERINK-VAN ITTERSUM, M.; NIEWÖHNER, U.; STAAY, F. J. VAN DER; BLOKLAND, A.; VENTE, J. DE. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. **Neuroscience**, v. 113, n. 2, p. 351–361, 2002.

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

QIN, C.; BIAN, X.-L.; CAI, C.-Y.; CHEN, C.; ZHOU, Y.; LIN, Y.-H.; TAO, Y.; WU, H.-Y.; CHANG, L.; LUO, C.-X.; ZHU, D.-Y. Uncoupling nNOS-PSD-95 in the ACC can inhibit contextual fear generalization. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 513, n. 1, p. 248–254, 2019.

RAMÓN Y CAJAL, S. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés. Paris: **Maloine**, 1911. v. 1

RAUCH, S. L.; SHIN, L. M.; PHELPS, E. A. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present, and future. **Biological psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 376–382, 2006.

RAUCH, S. L.; WHALEN, P. J.; SHIN, L. M.; MCINERNEY, S. C.; MACKLIN, M. L.; LASKO, N. B.; ORR, S. P.; PITMAN, R. K. Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 9, p. 769–776, 2000.

RAYMUNDI, A. M.; BATISTA SOHN, J. M.; SALEMME, B. W.; CARDOSO, N. C.; SILVEIRA GUIMARÃES, F.; STERN, C. A. Effects of delta-9 tetrahydrocannabinol on fear memory labilization and reconsolidation: A putative role of GluN2B-NMDA receptor within the dorsal hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 225, n. 109386, p. 109386, 2023.

RESSLER, K. J.; MAYBERG, H. S. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1116–1124, 2007.

RISBROUGH, V. B.; GLENN, D. E.; BAKER, D. G. On the road to translation for PTSD treatment: Theoretical and practical considerations of the use of human models of conditioned fear for drug development. *In*: **Translational**

Neuropsychopharmacology. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 173–196.

VAN ROOIJ, S. J. H.; RADEMAKER, A. R.; KENNIS, M.; VINK, M.; KAHN, R. S.; GEUZE, E. Neural correlates of trauma-unrelated emotional processing in war veterans with PTSD. **Psychological medicine**, v. 45, n. 3, p. 575–587, 2014.

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

RUTTEN, K.; VENTE, J. D.; ŞIK, A.; ITTERSUM, M. M.-V.; PRICKAERTS, J.; BLOKLAND, A. The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP Levels in hippocampal slices. **Behavioural brain research**, v. 164, n. 1, p. 11–16, 2005.

SAENZ DE TEJADA, I. *et al.* The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. **International journal of impotence research**, v. 13, n. 5, p. 282–290, 2001.

SAHAY, A.; SCOBIE, K. N.; HILL, A. S.; O'CARROLL, C. M.; KHEIRBEK, M. A.; BURGHARDT, N. S.; FENTON, A. A.; DRANOVSKY, A.; HEN, R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 466–470, 2011.

SAUERHÖFER, E.; PAMPLONA, F. A.; BEDENK, B.; MOLL, G. H.; DAWIRS, R. R.; HÖRSTEN, S. VON; WOTJAK, C. T.; GOLUB, Y. Generalization of contextual fear depends on associative rather than non-associative memory components. **Behavioural brain research**, v. 233, n. 2, p. 483–493, 2012.

SCHUITEVOERDER, S.; ROSEN, J. W.; TWAMLEY, E. W.; AYERS, C. R.; SONES, H.; LOHR, J. B.; GOETTER, E. M.; FONZO, G. A.; HOLLOWAY, K. J.; THORP, S. R. A meta-analysis of cognitive functioning in older adults with PTSD. **Journal of anxiety disorders**, v. 27, n. 6, p. 550–558, 2013.

SCOTT, J. C.; MATT, G. E.; WROCKLAGE, K. M.; CRNICH, C.; JORDAN, J.; SOUTHWICK, S. M.; KRYSTAL, J. H.; SCHWEINSBURG, B. C. A quantitative meta-analysis of neurocognitive functioning in posttraumatic stress disorder. **Psychological bulletin**, v. 141, n. 1, p. 105–140, 2015.

SHAFIEI, M.; MAHMOUDIAN, M.; ROSTAMI, P.; NEMATI, F. Effect of sildenafil (viagra) on memory retention of a passive avoidance response in rats. **Acta physiologica Hungarica**, v. 93, n. 1, p. 53–59, 2006.

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**, v. 714, n. 1–3, p. 486–497, 2013.

SHIN, L. M.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, n. 1, p. 67–79, 2006.

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**, v. 36, n. 2, p. 529–538, 2011.

SILVA, B. A.; BURNS, A. M.; GRÄFF, J. A cFos activation map of remote fear memory attenuation. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 369–381, 2019.

SILVA, T. R. DA; SOHN, J. M. B.; ANDREATINI, R.; STERN, C. A. The role of prelimbic and anterior cingulate cortices in fear memory reconsolidation and persistence depends on the memory age. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 27, n. 8, p. 292–300, 2020.

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**, v. 149, p. 150–190, 2015.

SKINNER, B. F. The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis. **Appleton-Century**.

SMITH, K. S.; BUCCI, D. J.; LUIKART, B. W.; MAHLER, S. V. DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. **Behavioral neuroscience**, v. 130, n. 2, p. 137–155, 2016.

SOMMER, F. Potency and selectivity of vardenafil: a phosphodiesterase Type 5 inhibitor. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 1, n. 2, p. 295–301, 2005.

SQUIRE, L. R. Mechanisms of memory. **Science** (New York, N.Y.), v. 232, n. 4758, p. 1612–1619, 1986.

STEIN, D. J.; IPSER, J. C.; SEEDAT, S.; SAGER, C.; AMOS, T. Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). **The Cochrane library**, 2006.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; TAKAHASHI, R. N.; GUIMARÃES, F. S.; BERTOGLIO, L. J. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: Evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2132–2142, 2012.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; VANVOSSEN, A. C.; HAMES, M. S.; BERTOGLIO, L. J. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 21, n. 1, p. 14–20, 2013.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; VANVOSSEN, A. C.; ZUARDI, A. W.; GALVE-ROPERH, I.; GUIMARAES, F. S.; TAKAHASHI, R. N.; BERTOGLIO, L. J.

Δ-Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 958–965, 2015.

STEVENSON, R. F.; REAGH, Z. M.; CHUN, A. P.; MURRAY, E. A.; YASSA, M. A. Pattern separation and source memory engage distinct hippocampal and neocortical regions during retrieval. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 40, n. 4, p. 843–851, 2020.

STRANGE, B. A.; WITTER, M. P.; LEIN, E. S.; MOSER, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655–669, 2014.

SUN, N.; YOU, Y.; YANG, D.; JIANG, Z.-X.; XIA, T.; ZHOU, Q.-G.; ZHU, D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase in dorsal raphe nucleus mediates PTSD-like behaviors induced by single-prolonged stress through inhibiting serotonergic neurons activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 585, p. 139–145, 2021.

TERRANOVA, J. I.; YOKOSE, J.; OSANAI, H.; OGAWA, S. K.; KITAMURA, T. Systems consolidation induces multiple memory engrams for a flexible recall strategy in observational fear memory in male mice. **Nature communications**, v. 14, n. 1, 2023.

THOMPSON, K. J. *et al.* DREADD agonist 21 is an effective agonist for muscarinic-based DREADDs *in vitro* and *in vivo*. **ACS pharmacology & translational science**, v. 1, n. 1, p. 61–72, 2018.

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

TRONEL, S.; BELNOUE, L.; GROSJEAN, N.; REVEST, J.-M.; PIAZZA, P.-V.; KOEHL, M.; ABROUS, D. N. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. **Hippocampus**, v. 22, n. 2, p. 292–298, 2012.

VAN STAVEREN, W. C. G.; STEINBUSCH, H. W. M.; MARKERINK-VAN ITTERSUM, M.; REPASKE, D. R.; GOY, M. F.; KOTERA, J.; OMORI, K.; BEAVO, J. A.; DE VENTE, J. mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 467, n. 4, p. 566–580, 2003.

VANVOSSEN, A. C.; PORTES, M. A. M.; SCOZ-SILVA, R.; REICHMANN, H. B.; STERN, C. A. J.; BERTOGLIO, L. J. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. **Neurobiology of learning and memory**, v. 137, p. 154–162, 2017.

WANG, X.; ZHANG, C.; SZÁBO, G.; SUN, Q.-Q. Distribution of CaMKIIα expression in the brain in vivo, studied by CaMKIIα-GFP mice. **Brain research**, v. 1518, p. 9–25, 2013.

WILTGEN, B. J.; SILVA, A. J. Memory for context becomes less specific with time. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 14, n. 4, p. 313–317, 2007.

WILTGEN, B. J.; TANAKA, K. Z. Systems consolidation and the content of memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 106, p. 365–371, 2013.

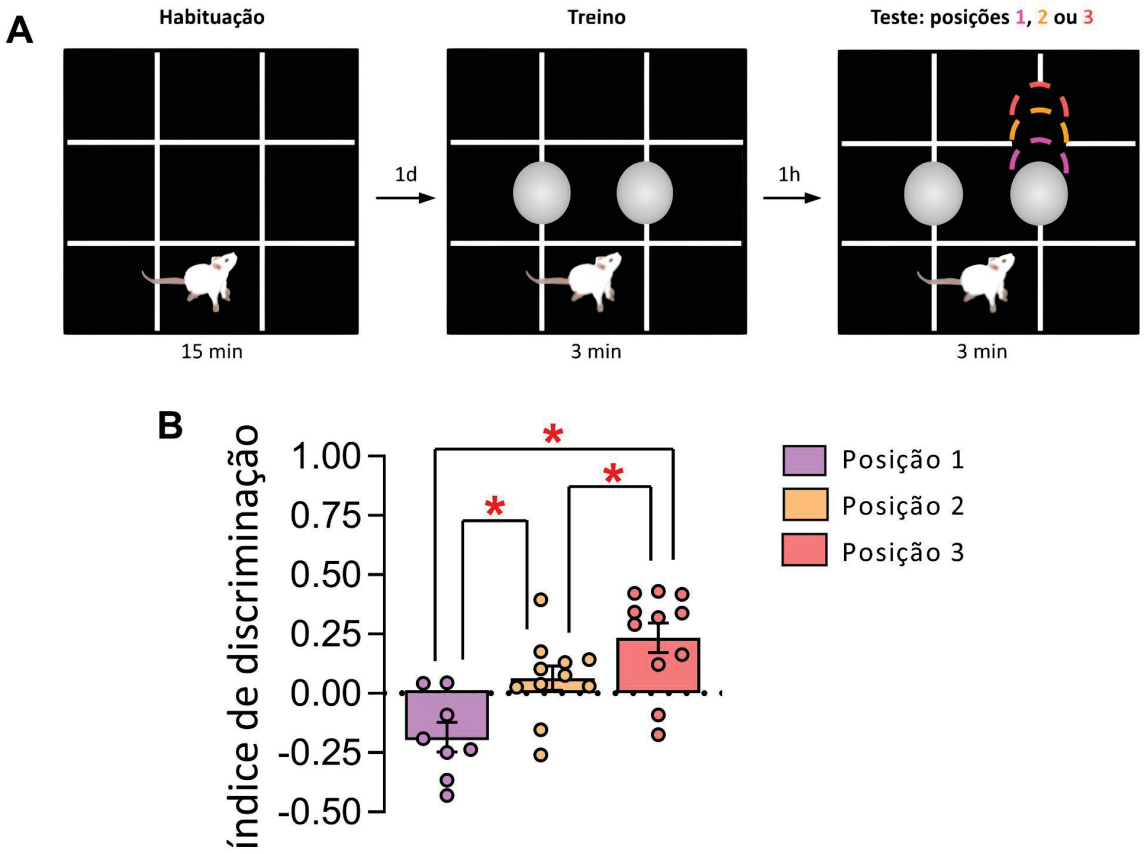
WIRT, R. A.; HYMAN, J. M. ACC theta improves hippocampal contextual processing during remote recall. **Cell reports**, v. 27, n. 8, p. 2313- 2327.e4, 2019.

YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Clinical therapeutic strategy and neuronal mechanism underlying post-traumatic stress disorder (PTSD). **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3614, 2019.

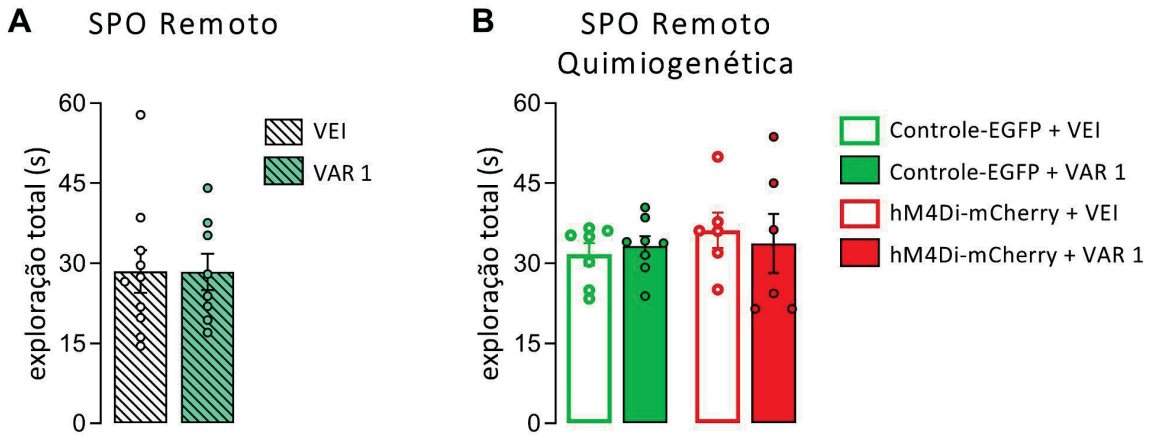
YASSA, M. A.; STARK, C. E. L. Pattern separation in the hippocampus. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 10, p. 515–525, 2011.

YUNITRI, N.; CHU, H.; KANG, X. L.; JEN, H.-J.; PIEN, L.-C.; TSAI, H.-T.; KAMIL, A. R.; CHOU, K.-R. Global prevalence and associated risk factors of posttraumatic stress disorder during COVID-19 pandemic: A meta-analysis. **International journal of nursing studies**, v. 126, n. 104136, p. 104136, 2022.

APÊNDICE



Apêndice 1. Padronização da posição do objeto no teste de SPO. **A)** Animais *naive* foram submetidos ao protocolo de SPO: na sessão de teste um dos objetos foi deslocado verticalmente com incrementos progressivos em relação a posição 0: inicial. O deslocamento do objeto selecionado por randomização seguiu o seguinte padrão crescente: Posição 1: 6 cm (acréscimo de 6 cm em relação à Posição 0), Posição 2: 12 cm (acréscimo de 6 cm em relação à Posição 1), e Posição 3: 18 cm (acréscimo de mais 6 cm em relação à Posição 2). **B)** A ANOVA de uma via mostrou haver diferença significativa entre os grupos $F_{(2,\ 27)}$=11,773, p=0,00021; η^2=0,466. Todos os grupos foram diferentes entre si considerando $p \leq 0,05$ (posição 1 *vs* 2: p = 0,0065; posição 1 *vs* 3: p = 0,0002; posição 2 *vs* 3: p = 0,05256; Newman-Keuls). O grupo posição 3 (deslocamento de 18 cm em relação ao eixo central da posição inicial) demonstrou uma discriminação significativamente maior na tarefa em relação aos demais grupos. Desse modo, a posição 3 levou a um resultado controle mais adequado quando se objetiva avaliar possíveis prejuízos na separação de padrão, os quais resultariam na diminuição da discriminação. FONTE: A autora (2024).



Apêndice 2. Tempo de exploração total dos objetos durante o SPO. **A)**: no SPO remoto, apesar da diminuição observada no índice de discriminação no grupo VAR 1 (Figura 17D), o teste *t* de Student mostrou não haver diferenças entre os grupos na exploração total dos objetos (t_{16}=0,017; *p*=0,987; *d*=0,001). **B)**: no SPO remoto no experimento com inibição quimiogenética do CCA, apesar da diminuição observada no índice de discriminação no grupo controle-EGFP + VAR 1 (Figura 20F), para o tempo de exploração total dos objetos a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa para os fatores interação ($F_{(1,23)}$=0,302; *p*=0,588; η^2=0,013), o tratamento ($F_{(1,23)}$=0,012; *p*=0,914; η^2=0,0005), e o constructo viral ($F_{(1,23)}$=1,301; *p*=0,266; η^2=0,053). FONTE: A autora (2024).