

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Caracterização da influência do estresse agudo sobre as projeções
neuronais do microcírculo bidirecional auto modulado BLA-CPFm
e seu papel no desenvolvimento do déficit de extinção da memória
de medo em ratos**

Vitor Augusto Laurino Juliano

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Dr. Leonardo Santana Novaes

Co-orientador(a):

Prof. (a) Dr.(a) Carolina Demarchi
Munhoz

São Paulo
2021

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	38
7. BIBLIOGRAFIA	38
8. ANEXOS	43

LISTA DE ABREVIATURAS

BLA – Complexo basolateral da amígdala;	LC – Locus Coeruleus
cm - centímetro	M – Molar
CON – Controle	mA - miliampere
CPFm – Cortex pré-frontal medial	mg – Miligrama
CPFm-IL – Cortex pré-frontal medial, infra-límbico	Min - Minuto
CPFm-PL – Cortex pré-frontal medial, pré-límbico	ml – Mililitro
D/V – Dorsoventral	mm - milímetro
EI – Estímulo incondicionado	M/L – Médio-lateral
EGR-1 - Early growth response protein 1	NE - Norepinefrina
FG – Fluorogold	Prop - Propranolol
h – Hora	PV – Parvalbumina
HPC – Hipocampo	s – Segundos
HPCd – Hipocampo Dorsal	SNC – Sistema nervoso central
ICB-USP – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo	STR – Estresse
Kg – Kilograma	TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático
	µl – Microlitro
	µm – Micrômetro

RESUMO

JULIANO, V.A.L. **Caracterização da influência do estresse agudo sobre as projeções neuronais do microcircuito bidirecional auto modulado BLA-CPFm e seu papel no desenvolvimento do déficit de extinção da memória de medo em ratos.** 2021. no. [f.44](#). Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Palavras-chave: Estresse; BLA; CPFm; TEPT

INTRODUÇÃO: O estresse constitui fator de risco fundamental para ocorrência de transtornos psiquiátricos associados à ansiedade e traumas, por exemplo o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT). O déficit de extinção da memória de medo é um sintoma característico observado em indivíduos acometidos pelo TEPT. Dados do grupo de pesquisa do Laboratório de neuroendócrino-farmacologia e imunomodulação (LaNEFI) do ICB-USP demonstram que, em ratos, 2h de estresse agudo de contenção causa o déficit da extinção da memória de medo 10 dias após. Torna-se interessante a busca pela possível modulação do estresse sobre o circuito neuronal envolvido com o processo de medo e extinção, a saber, o microcircuito bidirecional auto-modulado complexo basolateral da amígdala (BLA)↔Côrte Pró-frontal Medial (CPFm), e suas aferências do hipocampo (HPC) e Locus Coeruleus (LC), esta última sendo a principal fonte de norepinefrina (NE) do BLA, mediador neuroquímico fundamental para a retenção da memória em situações de excitação emocional, tais como o próprio condicionamento de medo ao contexto.

OBJETIVO: Analisar o efeito tardio do estresse agudo sobre o processo de extinção da memória de medo, bem como sobre a atividade neuronal de estruturas e projeções neuronais (BLA↔CPFm) chave para este processo.

MATERIAIS E MÉTODOS: Ratos *Wistar* machos receberam injeção do traçador retrógrado FluoroGold (FG) no BLA ou CPFm-IL e implantação de cânulas no BLA para injeção do antagonista β -adrenérgico propranolol. Após período de recuperação, sofreram sessão de estresse agudo de contenção por 2h. Após 10 dias, foram submetidos ao condicionamento de medo ao contexto (choque nas patas de 0,5mA, 1s de duração, 2 min após habituação ao contexto) - sendo que um grupo adicional recebeu infusão de propranolol ou salina 20 minutos antes do condicionamento. No dia seguinte, os animais iniciaram o protocolo de extinção da memória de medo (6 reexposições ao contexto, 10 min cada, com intervalos de 24 h). A eutanásia foi realizada por perfusão transcardíaca. A expressão de FosB, cFos e EGR-1 foi verificada por meio de imunofluorescência e imuno-histoquímica. O comportamento de freezing foi utilizado para quantificar a expressão do medo.

RESULTADOS: O estresse agudo levou ao déficit da extinção da memória aversiva 10 dias após. Houve aumento significativo da expressão de FosB no CPFm-PL e redução significativa nos neurônios do CPFm-IL durante o protocolo

de extinção. Registramos aumento significativo da atividade neuronal do BLA durante o protocolo de extinção, especialmente das projeções BLA→CPFm-IL. Foi verificada expressiva marcação de FosB nas projeções IL→BLA, proporcionalmente maior em animais estressados. Já nas projeções PL→BLA, menos densa, houve marcação menos substancial de FosB em animais controles e estressados. A infusão intra-BLA de propranolol previamente ao condicionamento de medo reverteu o efeito tardio do estresse agudo sobre o comportamento.

CONCLUSÃO: Evidenciamos partes de um possível mecanismo pelo qual o estresse exerce seu efeito tardio sobre a extinção da memória de medo, envolvendo a atividade dos neurônios do BLA, CPFm-PL, CPFm-IL e das projeções BLA→CPFm-IL, bem como a sinalização mediada por NE no BLA no momento do condicionamento.

1. INTRODUÇÃO

O estresse é fator de risco fundamental para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (MCEWEN et al, 2015; PITMAN et al, 2012). São exemplos a ansiedade generalizada, síndrome do pânico e transtorno obsessivo compulsivo - transtornos associados à ansiedade -, bem como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), classificado na categoria traumas e transtornos associados ao estresse (MCEWEN et al, 2015).

O TEPT é descrito como uma desordem na qual o medo relacionado à um evento traumático estressante se torna generalizado, tendo como resultado a hiperexcitação emocional em contextos que não oferecem riscos, o que afeta situações cotidianas que seriam consideradas seguras (MAHAN A.L e RESSLER K.J, 2012) e, portanto, reduz a qualidade de vida do indivíduo. Estruturas do sistema límbico, como amígdala, hipocampo, e o córtex pré-frontal medial (CPFm) são responsáveis por governar respostas emocionais em humanos e animais, além de estarem envolvidas com os sintomas de TEPT (HEIMER L. e VAN HOESEN G.W, 2006) e outros transtornos comportamentais.

A amígdala é responsável por receber diferentes modalidades de informações sensoriais oriundas de diversas estruturas encefálicas, assim como por desempenhar papel importante na manifestação do comportamento de medo e ansiedade (LEDOUX, 2000; LEDOUX, 2003; GROSS e HEN, 2004). A influência deletéria da hiperatividade desta estrutura sobre as alterações comportamentais relacionadas ao estresse psicológico, seja em humanos ou animais não-humanos, figura largamente entre as evidências encontradas na literatura especializada (LUTHI e LUSCHER, 2014; RAUCH et al, 2000). Em modelos experimentais murinos, a estimulação elétrica do complexo basolateral da amígdala (BLA) culmina no comportamento do tipo ansioso (KELLET et al, 2001; NIEMINEN et al, 1992). Da mesma forma, ratos com propensão inata à manifestação deste comportamento apresentam atividade aumentada do mesmo núcleo (HALE et al, 2006; SILVEIRA et al, 1993; WANG et al, 2011).

Além de sintomas de ansiedade persistente, um dos fenômenos característicos do TEPT é o prejuízo no processo de extinção da memória de

medo (MAROUN et al, 2013; YEHUDA et al, 2002), processo este que é considerado a base neurobiológica da terapia cognitivo-comportamental, amplamente utilizada para o tratamento de TEPT (MILAD e QUIRK, 2012).

Experimentalmente, o condicionamento de medo ao contexto (condicionamento Pavloviano ou clássico) é amplamente utilizado em modelos animais para estudos de desordens associadas à ansiedade, estresse e trauma (FENDT e FNSELOW, 1999; LEDOUX, 2000), a fim de mimetizar as alterações comportamentais e neurobiológicas observadas em humanos que sofrem destes transtornos. Resumidamente, neste paradigma, durante o condicionamento de medo (treino) é aprendida a associação entre um estímulo neutro (som, luz ou o próprio contexto) - denominado estímulo condicionado (EC) - e um estímulo aversivo (estímulo incondicionado, EI), normalmente um choque nas patas do animal. Desta forma, a apresentação apenas do EC durante o dia de teste, quando é verificada a expressão da memória adquirida, resultará na resposta emocional de medo, usualmente o congelamento (*freezing*) caracterizado como a completa imobilidade do animal, inclusive de suas vibrisas, exceto por movimentos respiratórios. Quando o contexto constitui o próprio EC, apenas a submissão ao mesmo contexto do condicionamento é suficiente para provocar a reação de medo. Já o paradigma experimental da extinção da memória de medo consiste na redução da resposta apreensiva mediante sucessivas apresentações exclusivas ao EC previamente condicionado ao EI.

Evidências sugerem que o aprendizado da extinção não resulta na deleção da memória aversiva previamente adquirida, mas sim na formação de uma nova memória (memória de extinção) responsável por suprimir a expressão da memória de medo (BERMAN e DUDAI, 2001; MYERS e DAVIS, 2007). Entretanto, resultados recentes apontam a ocorrência de alterações plásticas em virtude do processo de extinção em neurônios envolvidos com a expressão da memória de medo, as quais são revertidas por uma nova apresentação ao EI, contribuindo para a hipótese de “apagamento” da memória aversiva (CHOI et al, 2021), bem menos recorrente na literatura.

Além do papel crucial do BLA para a aquisição e expressão do medo aprendido (LEDOUX, 2000), este núcleo desempenha função central no processo de extinção da memória de medo em modelos animais (MAREN e QUIRK, 2004), sendo que a sua inativação farmacológica imediatamente antes das sessões de extinção leva ao déficit da extinção da memória de medo em diferentes paradigmas, bem como imediatamente após (BALDI e BUCHERELLI, 2015; HERRY et al, 2008; HOLMES et al, 2013; LAURENT et al, 2008; LAURENT e WESTBROOK, 2008; SIERRA-MERCADO et al, 2011), confirmando a importância do BLA para a aquisição e consolidação da memória de extinção, respectivamente.

O córtex pré-frontal medial (CPFm) figura entre as estruturas encefálicas fundamentais para os processos de condicionamento de medo e extinção da memória de medo (MILLAD e QUIRK, 2012; TOVOTE et al, 2015; ROZESKE et al, 2015; LIKHTIK e PAZ, 2015) devido ao seu papel chave sobre a discriminação e avaliação de risco, provocando a expressão ou supressão da memória de medo. Basicamente, essas funções estão relacionadas às suas subdivisões, de maneira que a subdivisão dorsal (córtex pré-límbico em roedores; CPFm-PL) governa a expressão da memória de medo e comportamento de esquiva, ao passo que a subdivisão ventral (córtex infra-límbico em roedores; CPFm-IL) está relacionada à supressão tanto do comportamento de esquiva, quanto da memória de medo, portanto, facilita o processo de extinção da memória de medo (LIKHTIK et al, 2005; CHO et al, 2013).

A inibição farmacológica do CPFm-IL imediatamente antes das sessões de extinção, assim como sua lesão ou inibição após, resultam em prejuízos ao processo de extinção da memória de medo em diferentes paradigmas, enquanto a estimulação da atividade de seus neurônios facilita a ocorrência da extinção da memória de medo condicionada ao som ou ao contexto (AKIRAV et al, 2006; LAURENT e WESTBROOK, 2009; SIERRA-MERCADO et al, 2011; MORGAN e LEDOUX, 1995; QUIRK et al, 2000; THOMPSON et al, 2010). Ademais, registros eletrofisiológicos evidenciam uma correlação entre exposições sucessivas às sessões de extinção e o aumento da excitabilidade de neurônios do CPFm-IL

(SANTINI et al, 2008), além de redução de disparos neuronais na mesma região em animais cronicamente estressados (WILBER et al, 2011).

As alterações comportamentais e neurobiológicas decorrentes da submissão ao estresse são heterogêneas e variam de acordo com a metodologia do estresse empregada. De tal maneira, o estresse crônico de contenção por duas horas durante 10 dias mostrou-se capaz de causar o surgimento do comportamento do tipo ansioso em ratos, ao passo que o emprego do fator de imprevisibilidade do estresse (estresse crônico imprevisível por 10 dias) não obteve o mesmo resultado (MITRA et al, 2005). O paradigma de sessão única de estresse prolongado causou prejuízo à retenção da memória de extinção ao contexto e à pista quando os animais foram condicionados 7 dias após a exposição ao estresse (KNOX et al, 2012). Uma única sessão de estresse agudo de contenção foi capaz de aumentar significativamente a densidade de espinhos dendríticos em ramos primários de neurônios piramidais do BLA 10 dias após a exposição, entretanto não 24 h após, fenômeno correlacionado ao surgimento do comportamento do tipo ansioso (MITRA et al, 2005). Paralelamente, o paradigma de sessão única de estresse prolongado (nado forçado, contenção e perda de consciência por Isoflurano) resultou em aumento significativo da densidade de espinhos dendríticos em neurônios piramidais do BLA 10 dias após, fenômeno relacionado ao surgimento do comportamento do tipo ansioso e aumento significativo da excitabilidade neuronal no BLA, sendo que novamente o resultado não foi reproduzido com um intervalo de 24 h após o estresse (ZHANG et al, 2019). Contrariamente ao observado no BLA, um ou três episódios de estresse imprevisível resultou em atrofia dos dendritos apicais de neurônios piramidais do CPFm-IL, verificada pela redução significativa do comprimento dos segmentos dendríticos (IZQUIERDO et al., 2006).

De fato, dados recentes obtidos pelo nosso grupo evidenciam que uma única sessão de estresse agudo de contenção por duas horas levou ao surgimento do comportamento do tipo ansioso persistente em ratos (NOVAES et al, 2018), bem como ao déficit da extinção da memória de medo (NOVAES et al, 2021), quando o condicionamento ocorreu 10 dias após a submissão ao estresse,

contribuindo com o corpo de evidências da necessidade de uma janela temporal entre o estresse e o condicionamento de medo para que haja o desenvolvimento dos fenótipos comportamentais clinicamente relacionados ao TEPT, provavelmente associados às mudanças plásticas que ocorrem nos neurônios do BLA durante este intervalo de 10 dias.

Além do papel crucial do BLA e CPFm para o efetivo processo de extinção da memória de medo, uma extensa gama de trabalhos demonstra a importância das comunicações entre essas estruturas para o mesmo fenômeno. Ou seja, as eferências do CPFm-IL ao BLA (CPFm-IL→BLA), assim como as projeções neuronais recíprocas (BLA→CPFm-IL) são fundamentais para a ocorrência adequada do processo de extinção da memória de medo (BUKALO et al, 2015; CHO et al, 2013; STROBEL et al, 2015; SENN et al, 2014; VOGEL et al, 2016), mesmo que haja uma extensa conexão de ambas as estruturas citadas com diversas áreas do sistema nervoso central. BLOODGOOD et al, (2018), lançando mão do uso da farmacogenética, demonstra que a inibição das projeções neuronais CPFm-IL→ BLA durante as sessões de extinção da memória de medo causou prejuízo à consolidação da memória de extinção em camundongos, muito embora não tenha verificado possíveis influências do estresse sobre tal modulação. DAVIS et al, (2017) confirmaram que a expressão da memória de medo aprendida durante o condicionamento é crucialmente dependente das eferências do CPFm-PL ao BLA, onde as projeções neuronais realizam sinapses com neurônios do BLA previamente recrutados durante o pareamento do EC e EI. Elegantemente, os autores demonstraram que a supressão da memória de medo por parte das projeções neuronais CPFm-IL→BLA ocorre via sinapses glutamatérgicas (excitatórias) com interneurônios GABAérgicos (inibitórios) presentes no BLA, os quais suprimem a atividade de eferências do BLA para outras estruturas responsáveis pela manifestação do medo. Ademais, os autores identificaram um papel fundamental das projeções BLA→CPFm sobre a regulação das projeções CPFm-IL→BLA e CPFm-PL→BLA, de maneira que o equilíbrio desse sistema auto modulado determina o sucesso do processo de extinção da memória de medo.

Sabe-se que o mediador neuroendócrino NE, liberada em situações de excitação emocional, tal como o condicionamento de medo, exerce função crucial sobre a eficiência do processo de extinção da memória de medo. GIUSTINO e colegas (2020) demonstraram que a estimulação das projeções do LC ao BLA, as quais são a principal fonte de NE no BLA, durante o condicionamento é capaz de causar o déficit da extinção da memória de medo (GISUSTINO et al., 2020). ROOZENDAAL et al, 2006, por sua vez, mostrou que o aumento da retenção da memória causado pela ação da corticosterona no BLA (CORT; Glicocorticóide murino com pico de concentração plasmática em situações de estresse) é estritamente dependente da sinalização mediada por NE sobre os neurônios do BLA. Estes resultados apontam o envolvimento fundamental da NE com o processo de extinção da memória, bem como seu papel na retenção da memória, sinalizando o BLA como um sítio fundamental.

A importância de estruturas como o BLA e CPFm para o processo de extinção da memória de medo - bem como de suas conexões, as quais constituem um circuito bidirecional auto modulado - aliada às evidências do efeito tardio do estresse sobre o processo de extinção da memória de medo e achados de mudanças plásticas nessas mesmas estruturas em virtude de diferentes formas de estresse, fornecem base à nossa busca a respeito da influência tardia do estresse agudo de contenção por 2 h em ratos sobre a correlação entre o fenótipo comportamental e a atividade neuronal deste microcircuito em diferentes momentos do protocolo experimental, algo ainda inédito na literatura especializada.

2. OBJETIVO(S)

O objetivo geral deste projeto foi identificar e caracterizar alterações funcionais das projeções neuronais que constituem o microcircuito BLA↔CPFm, assim como de estruturas encefálicas sabidamente importantes para o efetivo processo de extinção da memória de medo (BLA, CPFm e HPC), sofridas em virtude do estresse agudo de contenção a fim de determinar a influência do estresse sobre este microcircuito bidirecional auto modulado, além de verificar o

papel da sinalização mediada por NE no BLA no momento do condicionamento e seu impacto sobre o déficit de extinção da memória de medo.

Para atingirmos nossos objetivos, o trabalho foi dividido em três fases. Durante a primeira fase (**fase 1**), caracterizamos a atividade neuronal das estruturas chave para o processo de extinção da memória de medo a fim de verificar uma possível influência do estresse. Para isso, adotamos a seguinte abordagem:

1. Utilizando técnica de imuno-histoquímica para identificação e quantificação da expressão dos genes marcadores de atividade neuronal FosB (marcador cumulativo de atividade neuronal) e EGR-1 (marcador de expressão transiente e aguda da atividade neuronal), avaliamos possíveis alterações na atividade neuronal do BLA, CPFm-IL, CPFm-PL e HPC em função do estresse agudo, tanto no momento do condicionamento, quanto na totalidade do processo de extinção da memória .

A **fase 2** visou avaliar mudanças provocadas pelo estresse ocorridas sobre as projeções neuronais BLA↔CPFm durante o processo de extinção da memória de medo. Para isso, esta fase ocorreu em duas etapas paralelas e concomitantes (fases 2.1 e 2.2), como descrito a seguir:

2. 1. Utilizando a injeção do traçador retrógrado FluoroGold (FG) no CPFm-IL em combinação com ensaios de imunofluorescência para identificação e quantificação da expressão do gene marcador de atividade neuronal FosB, além da confirmação da presença de FG, avaliamos possíveis alterações na atividade neuronal das projeções BLA→CPFm-IL em função do estresse agudo ocorridas durante o processo de extinção da memória aversiva.

2. Utilizando a injeção de FG no BLA em combinação com ensaios de imunofluorescência para identificação e quantificação da expressão dos genes marcadores de atividade neuronal cFos (marcador de expressão transiente e aguda da atividade neuronal) e FosB e confirmação da presença de FG, avaliamos possíveis alterações na atividade neuronal das projeções CPFm→BLA ocorridas durante o condicionamento medo e durante o processo de extinção da memória, respectivamente, em função do estresse agudo.

Já a **fase 3** buscou verificar o papel da sinalização mediada por NE no BLA durante o momento do condicionamento e seu impacto sobre o déficit de extinção da memória de medo. Para atingir os objetivos propostos nesta fase, foram adotas as seguintes abordagens divididas em duas frentes concomitantes:

3. 1. A partir de injeção de FG no BLA e ensaios de imunofluorescência para identificação e quantificação dos genes marcadores de atividade neuronal FosB e cFos, além de confirmação da presença de FG, avaliar a influência do estresse agudo sobre a atividade neuronal das projeções LC→BLA no momento do condicionamento e durante o processo de extinção da memória de medo, respectivamente.

2. A partir de implantação bilateral de cânulas sobre o BLA e injeção do antagonista β -adrenérgico não-seletivo propranolol previamente ao condicionamento em animais estressados e controles, inibir a sinalização mediada por NE no BLA durante o condicionamento e avaliar a influência subsequente sobre o processo de extinção da memória de medo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Animais:*

Os sujeitos experimentais utilizados foram 62 ratos machos de linhagem *Wistar* com 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de

Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Primeiramente, os animais foram acondicionados em grupos de dois em gaiolas padrão por um período de 7 dias para habituação ao Biotério de Experimentação do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. Todos os animais foram alojados com livre acesso à água e ração, em biotério com controle de luminosidade com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz acesa às 6h00) e sob controle de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, lei federal de número 11794 de 10/08/2008) e sob a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo 085/2016).

3.2 Delineamento experimental:

Foi utilizado o seguinte delineamento experimental: após o período de aclimatação ao Biotério de Experimentação, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção de FluoroGold no BLA ou CPFm-IL (detalhes a seguir). Em outra coorte de animais foram realizadas cirurgias estereotáxicas para a implantação de cânulas sobre o BLA, pelas quais foram efetuadas as injeções de propranolol 20 minutos antes do condicionamento de medo (detalhes a seguir). Após ao período de recuperação adequado, os animais sofreram sessão única de estresse agudo de contenção com 2 horas de duração, retornaram às suas caixas moradia, onde permaneceram por 10 dias e foram conduzidos, então, para o condicionamento de medo ao contexto seguido pelo teste comportamental de extinção da memória de medo. A figura 1 ilustra o delineamento experimental esquematicamente.

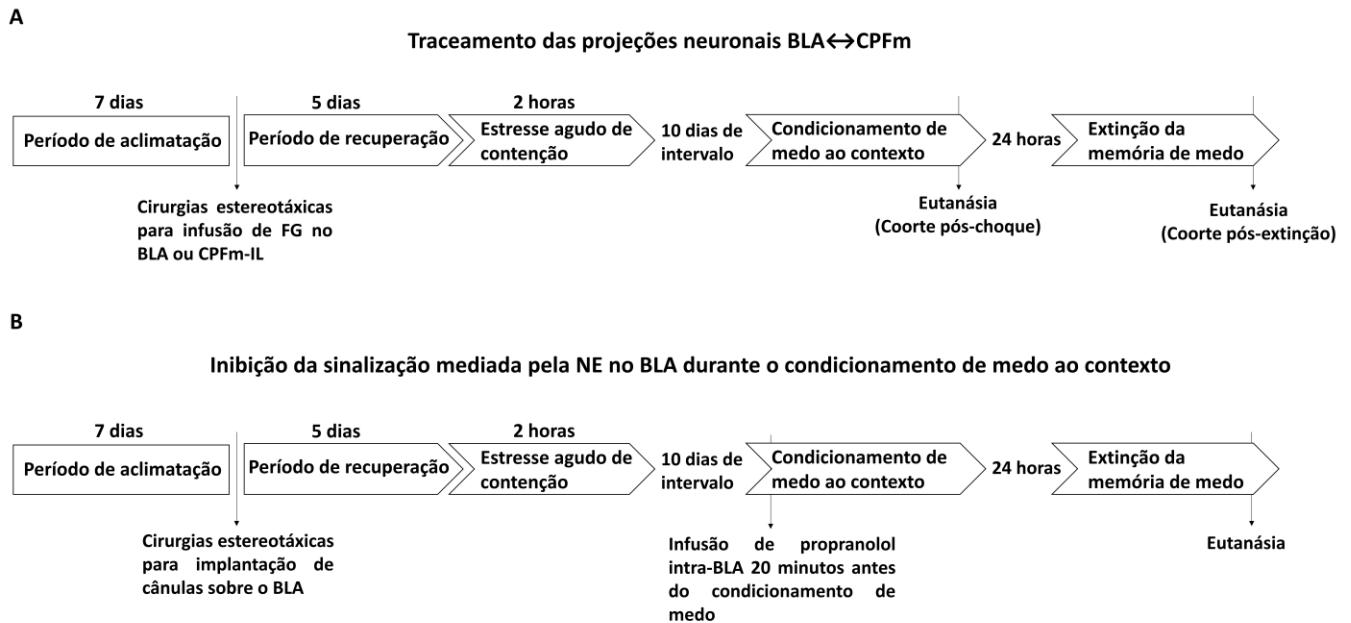


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental empregado.

3.3 Procedimentos cirúrgicos para injeção de traçador retrógrado no CPFm e BLA e implantação de cânulas no BLA para injeção de propranolol:

O traçador retrógrado foi injetado no SNC a partir de cirurgia esterotáxica, como descrito por NOVAES e SHAMMAH-LAGNADO, (2011) com algumas modificações. Brevemente, os animais foram anestesiados com isoflurano (4% de saturação em oxigênio para indução da anestesia e 2-3% para a manutenção), em seguida receberam uma dose de anti-inflamatório para analgesia via injeção subcutânea (Cetoprofeno, 5mg/kg) e foram acomodados no equipamento esterotáxico (Neurostar Neurosolutions, Kahnerweg, Alemanha). Após o processo de assepsia (etanol 70%, iodo 1% e glicerina 2%) e exposição do crânio, foram feitos pequenos orifícios na caixa craniana a partir do uso de brocas odontológicas, a fim de criar acesso para a passagem da agulha injetora de aço inoxidável acoplada a uma seringa Hamilton (5 µl, Hamilton Co, Reno, NV) fixada à torre do esterotáxico por meio de suporte adequado, pela qual se deu a injeção do traçador retrógrado. Todas as injeções foram realizadas ipsilateralmente, seguindo as coordenadas: para as injeções no BLA, A/P -2,5; M/L +/-5,1; D/V -7,0; para as injeções no CPFm-IL, A/P +3,0; M/L +/-0,6; D/V -4,0. As medidas são em

mm relativas ao bregma e à superfície do encéfalo. O FluoroGold (Fluorochrome) foi injetado a uma taxa de 0,05 μ l/min durante 10 minutos, totalizando 0,5 μ l por sítio de injeção. Durante os 3 dias seguintes à cirurgia, todos os animais receberam uma dose diária de anti-inflamatório (Cetoprofeno, 5mg/kg, subcutânea) para a prevenção de dor, além disso estiveram sob constante observação. Para realizar a injeção de propranolol no BLA, foram implantadas cânulas bilateralmente neste núcleo a partir de cirurgia estereotáxica, seguindo as coordenadas A/P -2.4, M/L +/-5.1, D/V -6.1 (as medidas são em mm relativas ao bregma e à superfície do encéfalo). As injeções de propranolol (1,5 μ g em 0,5 μ L de solução salina para cada hemisfério) foram realizadas 20 minutos antes do condicionamento de medo ao contexto, a uma taxa de infusão de 0.1 μ L/min, sendo que as agulhas (1mm de extensão superior às cânulas) permaneceram no local de injeção por 2 minutos para garantir a realização completa do volume injetado.

3.4 Estresse agudo de contenção:

Para realizar a sessão única de estresse agudo de contenção, o aparato utilizado consiste em um cano de PVC opaco (marrom) de 20 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro, com uma das extremidades fechadas e furos que permitem a circulação de ar. Durante o momento de contenção, os animais estiveram sob constante observação a fim de evitar estímulos estressores mais intensos do que o desejado, como caso o corpo do animal entre em contato com as próprias fezes ou tenha sua cauda levantada. Os animais permaneceram contidos no aparato por 2 horas, sob constante observação do experimentador, sempre dentro do período entre 9h00 e 12h00.

3.5 Extinção da memória de medo ao contexto:

O aparato utilizado consiste em uma caixa de condicionamento (28 x 26 x 23 cm) que possui uma base formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica dispostas de forma linear e conectadas a um gerador de choque elétrico (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, SP). Durante o dia de

treino cada animal foi introduzido individualmente na caixa de condicionamento pelo período de 2 minutos, seguido do estímulo incondicionado (EI, um choque nas patas de 1mA por 1s). Após 30 segundos posteriores ao EI, os animais foram conduzidos de volta às suas caixas de acomodação. Após 24 horas do treino, deu-se início às sessões de extinção, nas quais cada animal foi reintroduzido individualmente à arena de condicionamento e nela foram mantidos por 10 minutos na ausência do EI. O protocolo de extinção da memória de medo consistiu em sessões únicas de 10 minutos para cada animal ao longo de 6 dias, sempre com o mesmo intervalo de 24 horas. Ao fim de cada sessão, a caixa de condicionamento foi higienizada com álcool 5% a fim de evitar pistas olfatórias. Todas as sessões de treino e teste foram registradas por vídeo câmera (Logitech) e o tempo de congelamento (*freezing*), definido como a completa imobilidade do animal com ausência de movimentos das vibrissas e farejamentos, exceto por movimentos respiratórios, foi utilizado como medida de análise do comportamento de medo.

3.6 *Eutanásia dos animais e obtenção do material a ser analisado:*

Todos os animais foram profundamente anestesiados com isoflurano (5% de saturação em oxigênio) e a eutanásia foi realizada por perfusão transcardíaca, utilizando-se uma bomba peristáltica (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), com 200 mL de solução salina a 0,9% seguida por cerca de 500 mL de solução de formaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) a 4°C durante 21 minutos. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana e mantidos em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato de potássio (0,02M) a 4°C por 48h. Após esse período de crioproteção, os encéfalos foram retirados da solução de sacarose e congelados a -80 °C até o processamento histológico.

3.7 *Processamento do material histológico:*

Os encéfalos foram congelados a -80°C e, posteriormente, seccionados em criostato (Leica CM3050-S, Leica Biosystems, Alemanha) em plano coronal, a -28 °C, a uma espessura de 40 µm e armazenados em quatro compartimentos em

solução anticongelante (15% de sacarose – m/v, 30% de etilenoglicol – v/v, em tampão fosfato de sódio 0,05 M) a -20 °C. Para análise da expressão do traçador retrógrado, bem como dos genes marcadores de atividade neuronal, foram realizados ensaios de imunofluorescência e imuno-histoquímica, como descrito a seguir:

Imunofluorescência anti-FosB: Para a realização deste ensaio, foram selecionadas 13 fatias de cada encéfalo, compreendendo 4 cortes respectivos ao CPFm, 4 ao BLA, 2 ao hipocampo ventral e 3 ao LC. As secções foram obtidas dos seguintes casos ótimos: para aqueles cuja injeção foi realizada no BLA, foram utilizados os casos controle 4, controle 5, estresse 4 e estresse 5; para aqueles cuja injeção foi realizada no CPFm-IL, foram utilizados os casos controle 1, controle 2, controle 3, controle 4, estresse 1, estresse 2, estresse 3, estresse 4 e estresse 5. As fatias dos encéfalos foram incubadas em solução de bloqueio (solução de fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3% e soro de cabra a 3%) por 45 minutos, seguido de incubação em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário de interesse (anti-FosB obtido em camundongo, diluição 1:500, Cell signaling, EUA) por 24 horas. A seguir, os tecidos foram incubados em anticorpo secundário (AlexaFluor-488 obtido em cabra, anti-camundongo, diluição 1:1000, Thermo Fisher Scientific, EUA) por 2 horas. Posteriormente, após as lavagens, os cortes seguiram para montagem das lâminas (Superfrost Plus Slides, Thermo Fisher Scientific, EUA). A detecção do FluoroGold foi realizada pela excitação em luz U.V.

Imunofluorescência (anti-cFos): Foram selecionadas 13 fatias de cada encéfalo, compreendendo 4 cortes respectivos ao CPFm, 4 ao BLA, 2 ao hipocampo ventral e 3 ao LC. As secções foram obtidas de animais cuja eutanásia foi realizada após o condicionamento de medo ao contexto e apresentaram a injeção de traçador retrógrado em nível ótimo e restrita ao BLA - são eles os casos controle 1, controle 2, controle 3, estresse 1, estresse 2 e estresse 3. Os procedimentos seguiram conforme detalhado em seção anterior, entretanto as secções dos encéfalos foram

incubadas em anticorpo primário anti-cFos obtido em coelho (diluição 1:2000, Cell Signaling Technology, EUA) e anticorpo secundário AlexaFluor-594 feito em cabra (anti-Rabbit, diluição 1:1000; Thermo Fisher Scientific, EUA).

Imuno-histoquímica (anti-FosB e anti-EGR-1): Para análise da expressão dos genes marcadores de atividade neuronal, foram selecionados de 4 a 6 cortes dos encéfalos seccionados. As fatias dos encéfalos foram incubadas em solução de bloqueio (solução de fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3% e soro de burro a 3%) por 45 minutos, seguido de incubação em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário de interesse (anti-FosB obtido em coelho, diluição 1:1000, Santa Cruz, EUA ou anti-EGR-1 obtido em coelho, diluição 1:2000, Santa Cruz, EUA) por 65h. Em seguida, foram incubados em anticorpo secundário biotinilado (diluição 1:1000, obtido em burro; Vector Laboratories, EUA) por duas horas, seguido de incubação em solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC; diluição 1:200 em tampão fosfato de potássio a 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3%) por 1 hora e 30 minutos. O produto da reação de peroxidase foi visualizado utilizando-se 0,001% de peróxido de hidrogênio em solução de fosfato de potássio 0,02 Me 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloridro (DAB) como cromógeno. Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas.

3.8 Análise estatística dos resultados:

Foi utilizando a análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores seguidos pelos pós-testes de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente, para identificar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Comparações entre dois grupos experimentais foram realizadas por teste *t* ou Mann-Whitney. Foram adotados como estatisticamente significantes valores para $p < 0.05$. Além disso, utilizamos a estatística descritiva para obtenção de médias e erro padrão da média. O teste de normalidade de D'Agostino & Pearson foi realizado para verificação da distribuição amostral. Todas as análises foram realizadas no

programa GraphPad Prism 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA www.graphpad.com)

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir referem-se à investigação dos impactos tardios do estresse agudo de contenção sobre o déficit de extinção da memória de medo, isto por meio da avaliação da alteração comportamental verificada pela expressão da memória de medo durante os treinos de extinção e avaliação da atividade das projeções neuronais recíprocas entre o BLA e CPFm - além de outras estruturas que também configuram substratos importantes para o fenômeno da extinção da memória de medo, como LC e HPC -, com a finalidade de elucidar um possível mecanismo pelo qual o estresse exerce seus efeitos prejudiciais sobre este processo.

As análises foram realizadas em diferentes pontos do protocolo experimental adotado, ou seja, tanto imediatamente após o condicionamento de medo ao contexto quanto após o teste de extinção da memória de medo, o qual sucede os treinos de extinção. Para tal, foram feitos ensaios de imuno-histoquímica e imunofluorescência para identificação e quantificação de marcadores de atividade neuronal, como FosB, cFos e EGR-1.

Influência do estresse agudo de contenção sobre a extinção da memória de medo ao contexto

Como demonstrado pela figura 2A, os animais submetidos ao estresse agudo manifestaram, 10 dias após, maior percentual de *freezing* durante os treinos de extinção da memória de medo quando comparados aos animais não-estressados, sendo estatisticamente significante durante o treino 4. Por sua vez, a análise da área sob a curva indica um acumulado de *freezing* maior apresentado pelo grupo previamente estressado (figura 2B), confirmando a ocorrência tardia do déficit de extinção da memória de medo em função do estresse, em linha com resultados previamente obtidos pelo grupo (NOVAES, 2021).

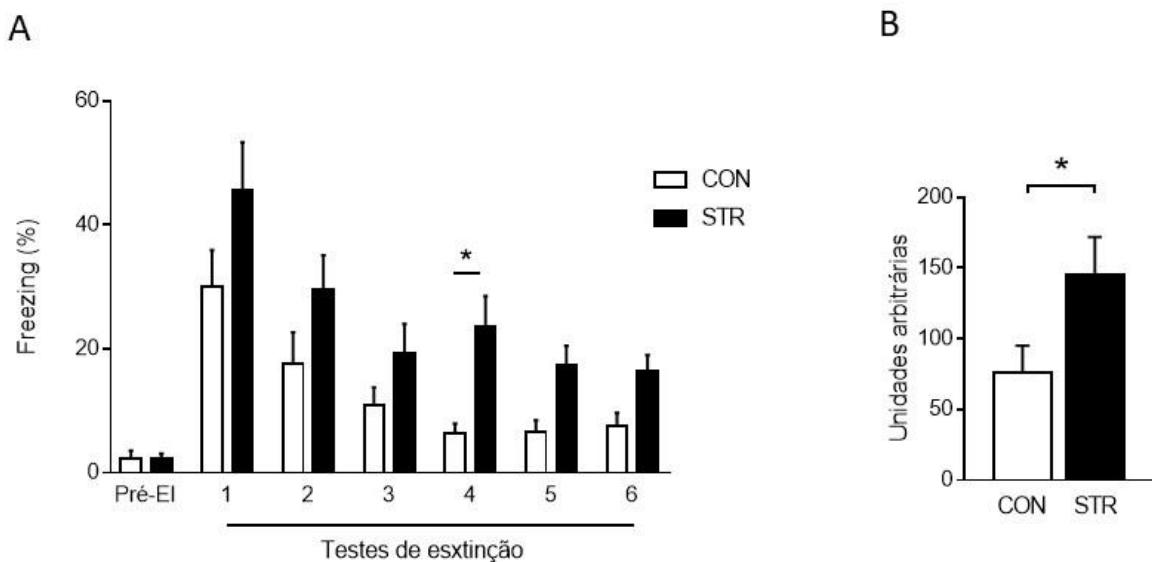


Figura 2. Estresse agudo promove, 10 dias depois, déficit de extinção da memória de medo. Porcentagem de *freezing* representando a manifestação da memória de medo ao contexto ao longo do treino e dos 6 dias consecutivos de teste. **(A)** Animais estressados (STR) apresentaram maior porcentagem de *freezing* nos teste 4 em comparação aos animais não estressados (CON) ($n = 9-10$ animais para cada grupo, ANOVA de duas vias: teste $F_6, 119 = 14,17, P < 0,0001$; estresse $F_1, 119 = 21,82, P < 0,0001$; interação teste-tratamento $F_6, 119 = 0,8847, P = 0,5085$). **(B)** Gráfico de colunas representando o valor total da área sob a curva, indicando que o acumulado de *freezing* realizado pelos animais estressados foi maior do que o desempenhado pelos animais não estressados ($n = 9-10$ animais para cada grupo, teste t *Student* bicaudal, $p = 0,0450$). Os resultados estão representados como média \pm SEM. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos são indicadas por * $P < 0,05$.

Imuno-histoquímica anti-FosB

Como mencionado, a proteína FosB é um marcador cumulativo da atividade neuronal. Desta forma, quando a eutanásia dos animais é realizada após o teste de extinção da memória de medo, a expressão de FosB indica o acumulado da atividade neuronal durante todo o protocolo de extinção da memória, como evidenciado adiante:

BLA: Não houve diferença significativa quanto a expressão de FosB entre animais estressados e controles. (P value = 0,8452; figura 3A)

CPFm – PL: Não foi observada diferença entre os valores correspondentes a expressão de FosB para ambos os grupos experimentais, como mostrado pela figura 3B. (P value = 0,0784)

CPFm – IL: Interessantemente, foi identificada diferença estatisticamente significante do número de células FosB positivas entre animais estressados e controles, sendo a maior média pertencente aos controles. (P value = 0,0455; figura 3C)

HPCd CA1: Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, como mostrado pela figura 3D. (P value = 0,3856)

HPCd CA3: Não foram observadas diferenças significativas entre animais estressados e controles. (P value = 0,8828; figura 3E)

HPCd DG: Não houve diferença no número de células FosB positivas entre animais estressados e controles, como visto na figura 3F. (P value = 0,6978)

Os resultados apresentados demonstram que há redução significativa da atividade neuronal do CPFm-IL durante o processo de extinção da memória de medo em animais previamente estressados, fornecendo indicativos interessantes para análise da conectividade entre esta estrutura e o BLA via projeções neuronais recíprocas.

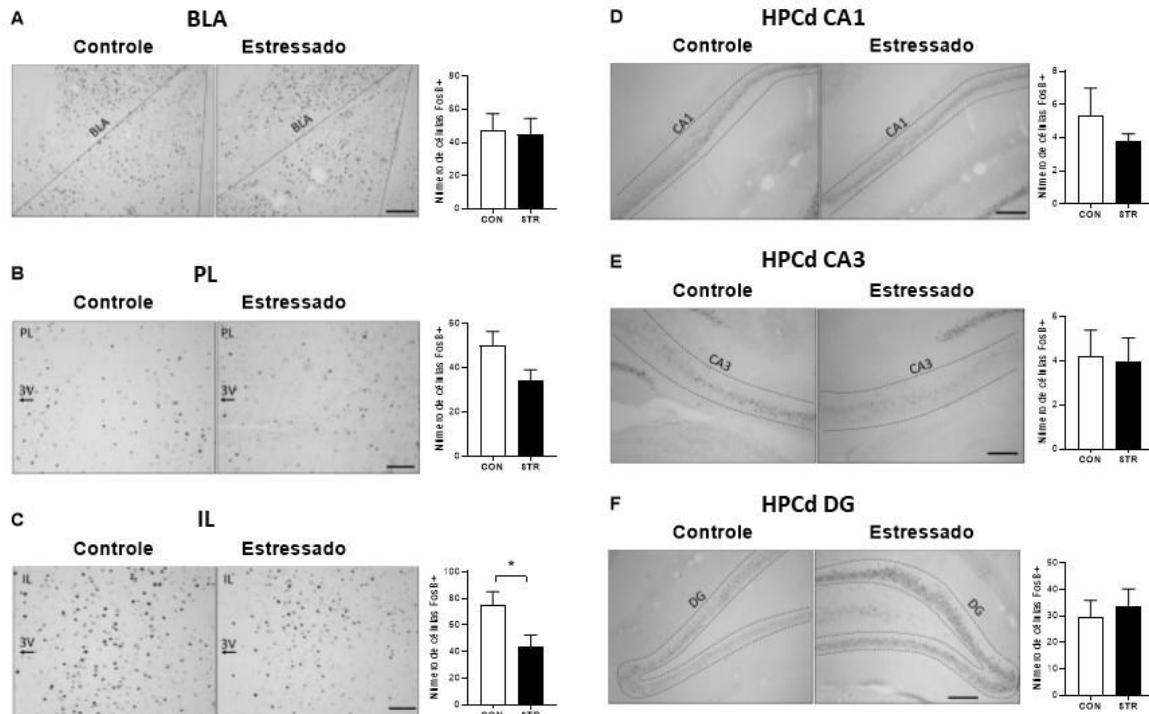


Figura 3. Expressão de FosB no BLA, CPFm-PL, CPFm-IL e HPCd (CA1, CA3 e DG) após extinção da memória de medo. Fotomicrografia ilustrativa (esquerda) e gráfico representando o total de células FosB positivas (direita) no BLA (A), PL (B), IL (C), HPCd CA1 (D), HPCd CA3 (E) e HPCd DG (F) nos animais controles e estressados. Teste t bicaudal não pareado em A, B, C, D, E e F. n = 5 para cada um dos grupos “CON” e “STR”. Barra de escala = 100 μ m (A, D, E, F); 50 μ m (B e C). Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por * (p<0,05) em relação ao grupo CON.

Imuno-histoquímica anti-EGR-1

A expressão de EGR-1 foi verificada em dois pontos diferentes do protocolo comportamental, após o condicionamento de medo ao contexto e após o teste de extinção da memória de medo, a fim de averiguar a atividade neuronal de estruturas de interesse pontualmente nestes momentos. A respeito do recrutamento neuronal imediatamente após o choque, não houve diferenças significativas quanto à expressão de EGR-1 no BLA ($P = 0,6537$; figura 4A), CPFm-PL ($P = 0,9439$; figura 4B), CPFm-IL ($P = 0,8944$; figura 4C), HPCd CA1 ($P = 0,2307$; figura 4D), HPCd DG ($P = 0,4220$; figura 4F), havendo redução significativa da expressão de EGR-1 no HPCd CA3 de animais estressados ($P = 0,0476$; figura 4E).

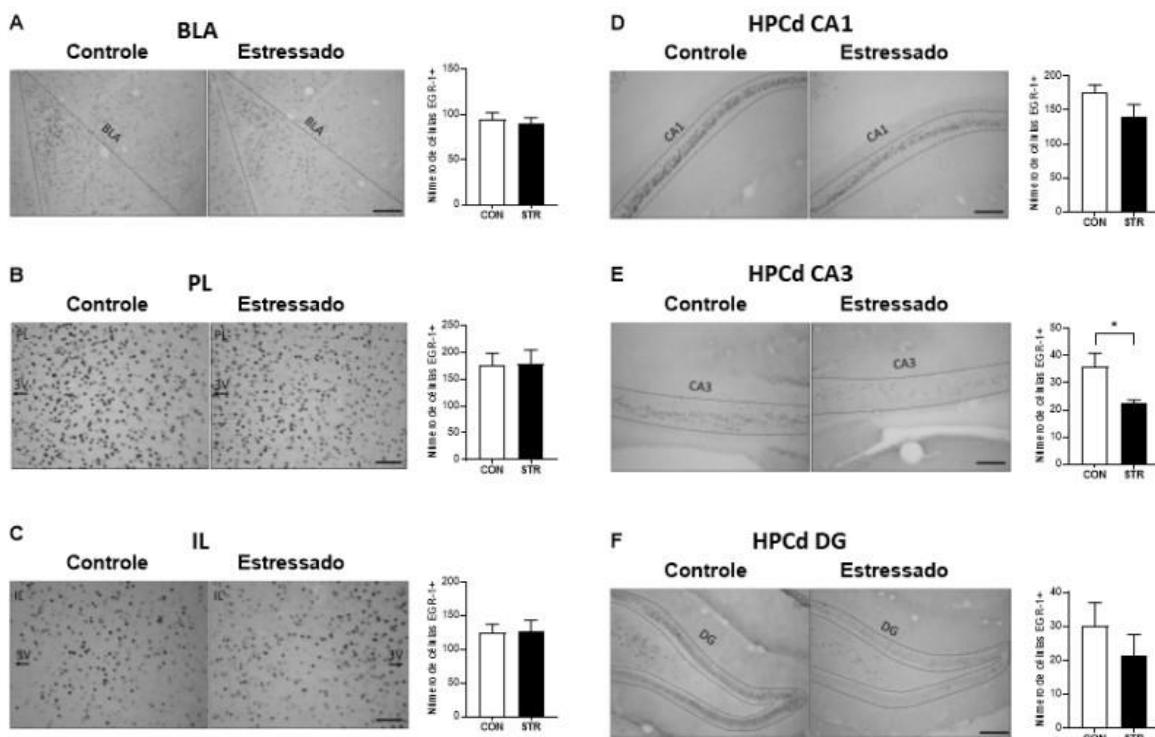


Figura 4. Expressão de EGR-1 no BLA, CPFm-PL, CPFm-IL e HPCd (CA1, CA3 e DG) durante a exposição ao estímulo incondicionado (choque nas patas). Fotomicrografia ilustrativa (esquerda) e gráfico representando o total de células EGR-1 positivas (direita) no BLA (A), PL (B), IL (C), HPCd CA1 (D), HPCd CA3 (E) e HPCd DG (F) nos animais controle e estressados. Teste t bicaudal não pareado em A, B, C, D, E e F. n = 5 para o grupo “CON” em A, B e C; n = 6 para o grupo “STR” em A, B e C. n = 2 para o grupo “CON” em D, E e F; n = 3 para o grupo “STR” em D, E e F. Barra de escala = 100 μ m (A, D, E e F); 50 μ m (B e C). Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por * (p<0,05) em relação ao grupo CON.

Já sobre as análises realizadas após o teste de extinção, não foram observadas diferenças significativas de expressão de EGR-1 em nenhuma das estruturas analisadas (BLA [P = 0,4230; figura 5A], CPFm-PL [P = 0,9934; figura 5B], CPFm-IL [P = 0,5179; figura 5C], HPCd CA1 [P = 0,2654; figura 5D], HPCd CA3 [P = 0,4796; figura 5E], HPCd DG [0,7495; figura 5F]).

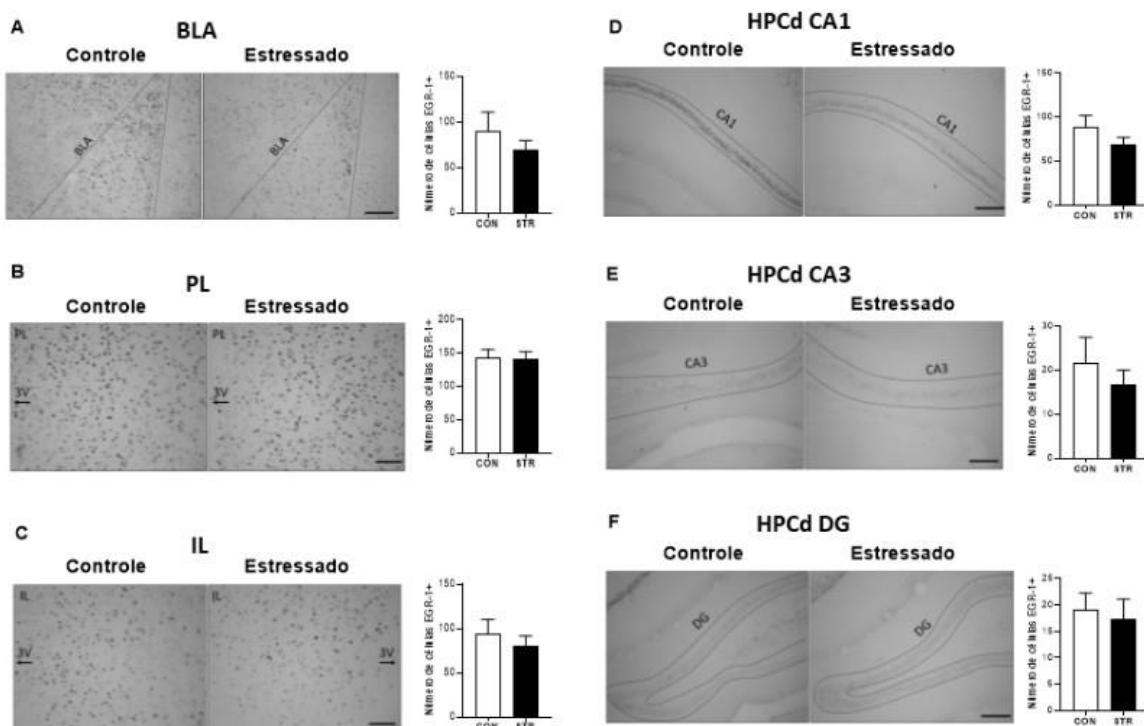


Figura 5. Expressão de EGR-1 no BLA, CPFm-PL, CPFm-IL e HPCd (CA1, CA3 e DG) após extinção da memória de medo. Fotomicrografia ilustrativa (esquerda) e gráfico representando o total de células EGR-1 positivas (direita) no BLA (A), PL (B), IL (C), HPCd CA1 (D), HPCd CA3 (E) e HPCd DG (F) nos animais controle e estressados. Teste t bicaudal não pareado em A, B e C. n = 7 para cada um dos grupos “CON” e “STR” em A, B e C. n = 4 para cada um dos grupos “CON” e “STR” em D, E e F. Barra de escala = 100 μ m (A, D, E e F); 50 μ m (B e C).

Imunofluorescência anti-FosB combinada com FG (após o teste de extinção)

A redução da atividade neuronal do CPFm-IL durante o processo de extinção da memória em animais previamente estressados tornou ainda mais interessante a investigação dos efeitos do estresse sobre esta estrutura, especialmente sobre sua conectividade com o BLA por meio de suas projeções neuronais recíprocas. Desta forma, os resultados a seguir visam identificar a influência do estresse agudo sobre as projeções neuronais CPFm → BLA e BLA → CPFm-IL durante o processo de extinção da memória de medo a partir da injeção de FG no BLA ou CPFm-IL (respectivamente) e ensaios de imunofluorescência anti-FosB:

Injeção de FG realizada no BLA (Projeções CPFm → BLA)

Devido ao número amostral ainda baixo, os resultados descritos nesta sessão são apenas qualitativos:

CPFm-IL: Verificamos forte marcação retrógrada, bem como larga presença de co-localização entre FG e FosB, ou seja, células de projeção ativadas repetidas vezes durante o processo de extinção da memória de medo, tanto em animais estressados quanto não-estressados. Proporcionalmente, a co-localização das marcações FG e FosB se mostrou maior entre animais estressados (63,57% x 49,79%). Caso esta tendência se verifique em análises futuras, poderemos concluir que a redução da ativiade neuronal do CPFm-IL se dá, principalmente, entre neurônios que não enviam projeções ao BLA. Estes resultados são ilustrados pela figura 6;

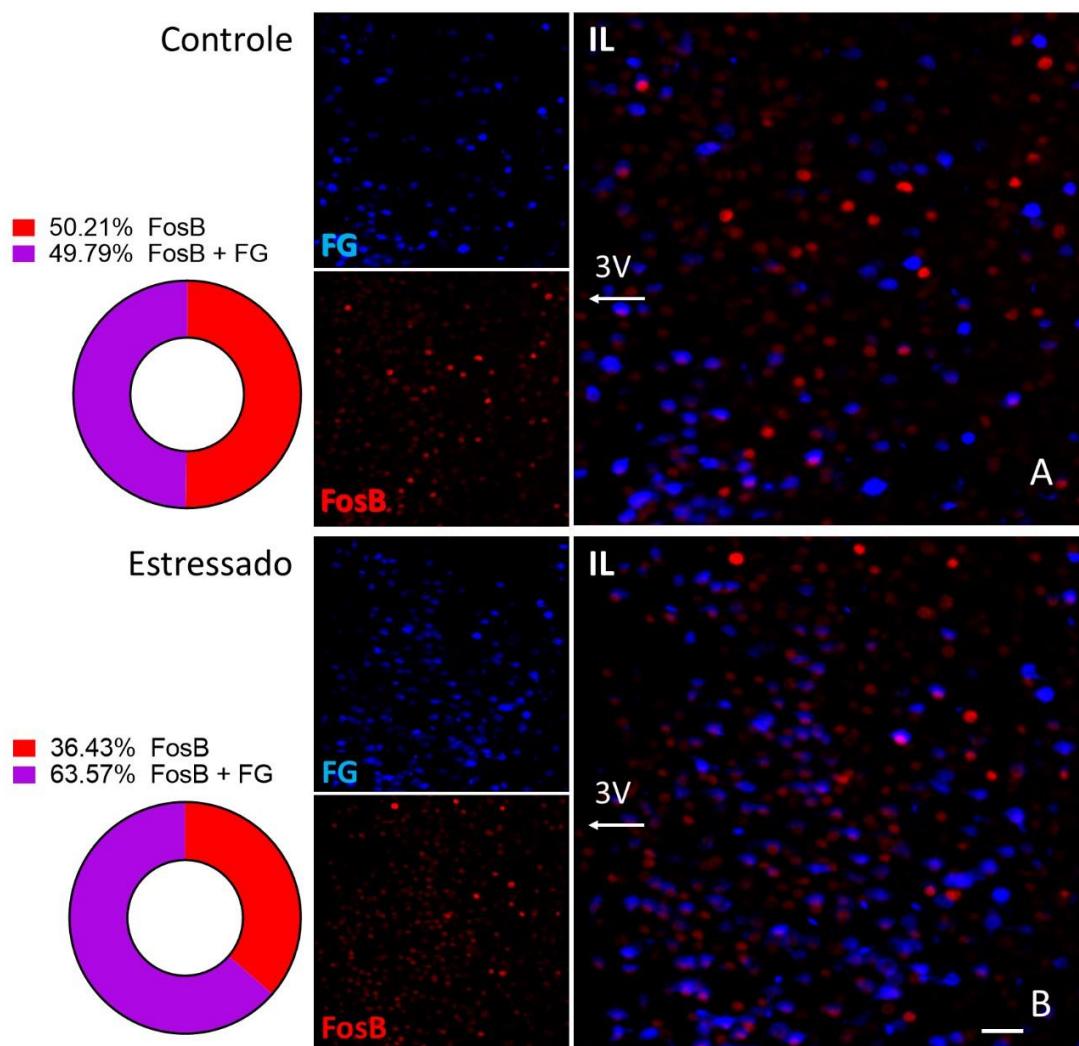


Figura 6. Expressão de FosB e FG (injeção no BLA) no CPFm-IL após extinção da memória de medo. Esquerda, representação gráfica da parte pelo todo ilustrando o total de células positivas para FosB (em vermelho) e células com dupla marcação para FosB e FG (em roxo), para o grupo controle (A) e estressado (B). Direita, fotomicrografia representativa do CPFm-IL após marcação para FosB (vermelho) e FG (azul) em animal controle (A) e estressado (B). Barra de escala = 100 μ m.

CPFm-PL: Houve menor marcação retrógrada demonstrada pelo menor número de células FG positivas em comparação ao observado na subdivisão CPFm-IL, apesar de larga presença de células FosB positivas, tanto entre animais estressados quanto controles. Não houve tendência de diferença na proporção do número de co-localizações entre os grupos experimentais (11,58% e 11,92% para

controles e estressados, respectivamente). Estes resultados estão demonstrados pela figura 7.

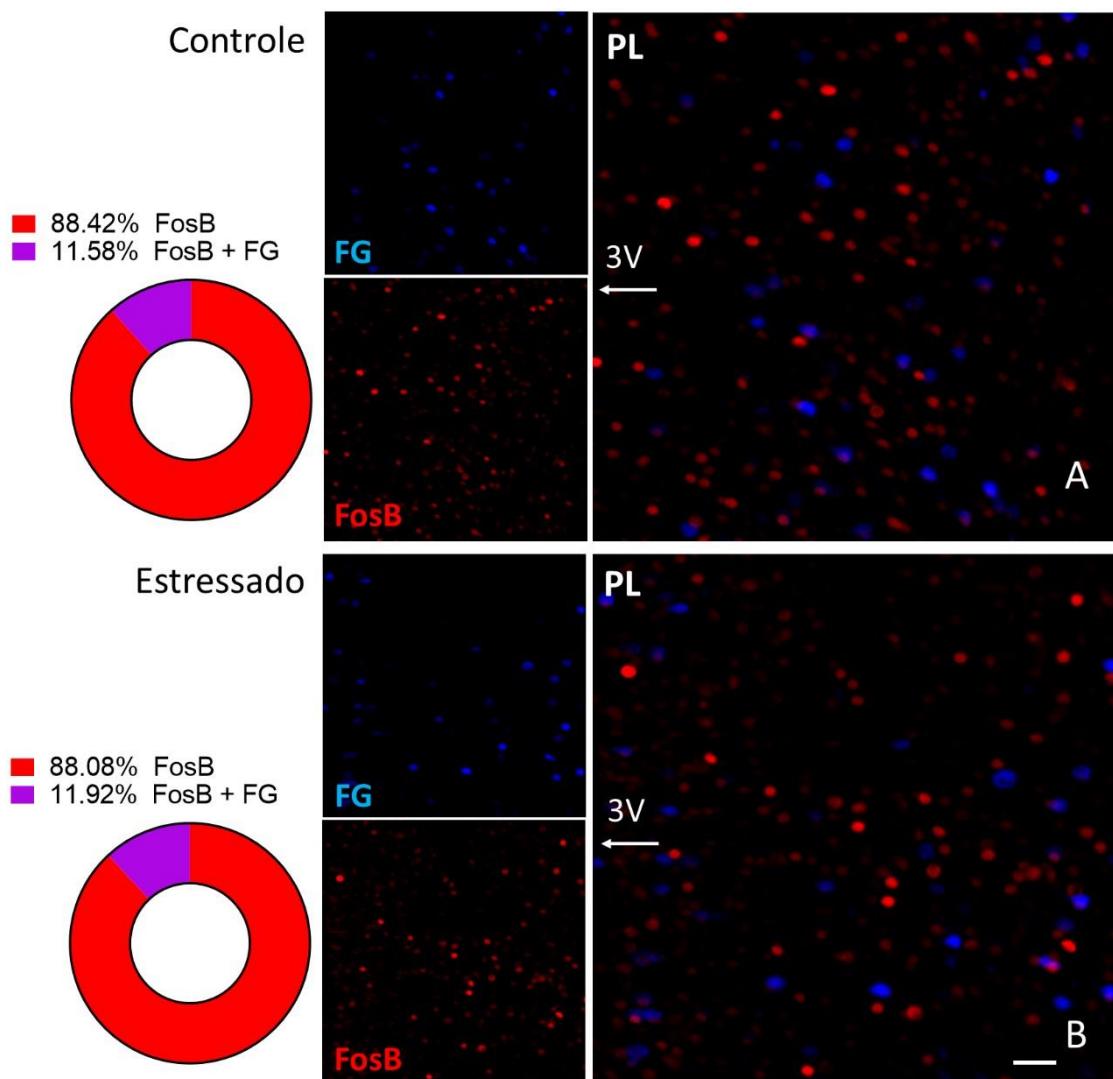


Figura 7. Expressão de FosB e FG (injeção no BLA) no CPFm-PL após extinção da memória de medo. Esquerda, representação gráfica da parte pelo todo ilustrando o total de células positivas para FosB (em vermelho) e células com dupla marcação para FosB e FG (em roxo), para o grupo controle (A) e estressado (B). Direita, fotomicrografia representativa do CPFm-PL após marcação para FosB (vermelho) e FG (azul) em animal controle (A) e estressado (B). Barra de escala = 100 μ m.

Injeção de FG realizada no CPFm-IL (Projeções BLA → CPFm-IL)

BLA: Apesar de marcação substancial de FG e FosB tanto em animais controles quanto estressados, verificamos uma maior expressão de FosB em animais estressados ($P = 0,0151$), acompanhada de maior co-localização de FG e FosB (células do BLA recrutadas que enviam projeções ao CPFm-IL), também maior em animais estressados ($P = 0,0208$). Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto à proporção de células com dupla marcação quando feita a razão pelo total de células FosB positivas ($P = 0,1575$). Estes resultados evidenciam que o estresse agudo prévio exerceu modulação positiva da atividade neuronal do BLA durante o processo de extinção da memória de medo, especialmente de suas projeções neuronais ao CPFm-IL (Figura 8);

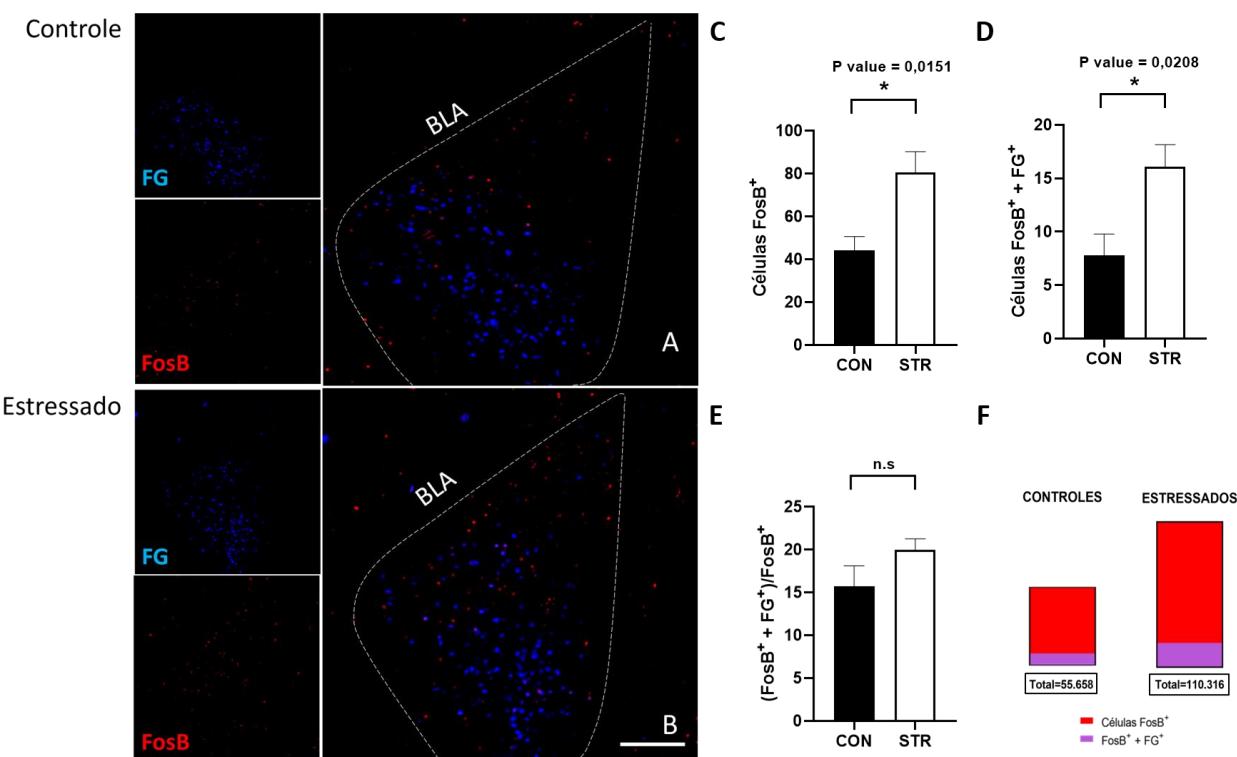


Figura 8. Expressão de FosB e FG (injeção no CPFm-IL) no BLA após extinção da memória de medo. Esquerda, foto micrografia representativa da expressão de FosB (vermelho) e FG (azul) no BLA de animais controles (A) e estressados (B) após extinção da memória de medo. Direita, gráficos representativos do total de células FosB positivas (C), FosB e FG positivas (D) e razão de co-localizações em relação ao total de FosB (E) no BLA de animais controles (“CON”) e estressados (“STR”) após extinção da memória e gráficos de parte pelo todo ilustrando o total de células FosB positivas (vermelho) e células FosB e FG positivas (roxo) no BLA de animais controles e estressados (F). Teste t bicaudal não pareado em C. n = 5 para os grupos “CON” e “STR” em C e D. Barra de escala = 500 μ m. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por * ($p<0,05$) em relação ao grupo CON.

Para avaliar a atividade neuronal do CPFm destes mesmos animais nos quais foram verificados os resultados a respeito da modulação do BLA e projeções BLA → CPFm-IL em função do estresse, foram coletados de 4 a 8 cortes do CPFm-IL e CPFm-PL contralaterais à injeção de FG dos mesmos casos analisados anteriormente, com os quais foram realizados ensaios de imunofluorescência anti-FosB. Esta análise foi realizada a fim de identificar uma possível relação entre o aumento da atividade neuronal do BLA e suas aferências ao CPFm-IL e a redução da atividade do CPFm-IL durante o processo de extinção da memória de medo anteriormente verificada;

CPFm-IL: Como demonstrado pela figura 9, os resultados de imuno-histoquímica anti-FosB foram reproduzidos, ou seja, houve uma redução significativa da atividade do CPFm-IL de animais estressados durante o processo de extinção da memória de medo, indicada pela menor expressão de FosB neste grupo quando comparado aos animais controles ($P = 0,0484$);

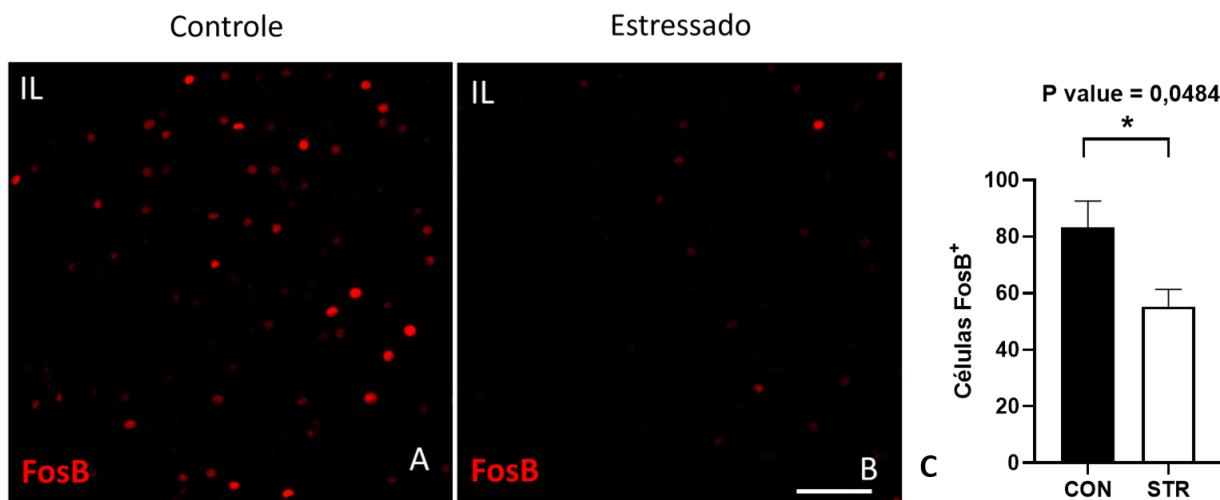


Figura 9. Expressão de FosB no CPFm-IL após extinção da memória de medo. Esquerda, foto micrografia representativa da expressão de FosB (vermelho) no CPFm-IL de animais controles (A) e estressados (B) após extinção da memória de medo. Direita, gráfico representativo do total de células FosB positivas (C) no CPFm-IL de animais controles (“CON”) e estressados (“STR”) após extinção da memória. Teste t bicaudal não pareado em C. $n = 5$ para o grupo “CON” e $n = 4$ para o grupo “STR” em C. Barra de escala = 200 μ m. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por * ($p < 0,05$) em relação ao grupo CON.

CPFm-PL: Interessantemente, houve um aumento expressivo da atividade neuronal do CPFm-PL entre animais estressados durante o processo de extinção da memória de medo, marcado pelo aumento significativo da expressão de FosB em animais estressados quando comparados aos controles ($P = 0,0009$; Figura 10);

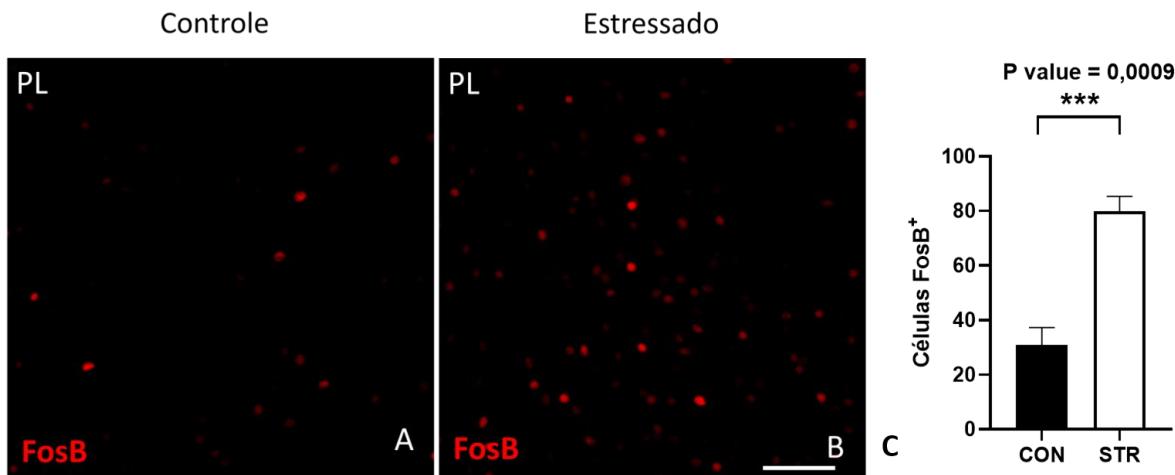


Figura 10. Expressão de FosB no CPFm-PL após extinção da memória de medo. Esquerda, foto micrografia representativa da expressão de FosB (vermelho) no CPFm-PL de animais controles (A) e estressados (B) após extinção da memória de medo. Direita, gráfico representativo do total de células FosB positivas (C) no CPFm-PL de animais controles (“CON”) e estressados (“STR”) após extinção da memória. Teste t bicaudal não pareado em C. $n = 5$ para o grupo “CON” e $n = 4$ para o grupo “STR” em C. Barra de escala = 200 μ m. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por *** ($p<0,001$) em relação ao grupo CON.

Coletivamente, esses dados evidenciam que o estresse agudo de contenção provoca, 10 dias após e durante o processo de extinção da memória de medo, aumento significativo da atividade neuronal do BLA e suas projeções ao CPFm-IL, bem como aumento da atividade do CPFm-PL, sendo que estes fenômenos são acompanhados da redução da atividade do CPFm-IL.

Imunofluorescência anti-cFos combinada com FG (após o condicionamento de medo ao contexto)

Até este ponto foram apresentados resultados respectivos à ativação neuronal durante o processo de extinção da memória de medo, entretanto, é sabido que o período de 10 dias entre a sessão de estresse agudo e o condicionamento de medo ao contexto configura uma janela fundamental para

mudanças plásticas ocorridas sobre os neurônios do BLA (NOVAES et al, 2018; NOVAES et al, 2021; MITRA et al, 2005). Ademais, GIUSTINO et al (2020) demonstraram que há relação inversamente proporcional entre o aumento da intensidade do estímulo estressor durante a exposição ao EI (intensidade do choque nas patas) e a eficiência do processo de extinção da memória de medo, ou seja, estressores de maior intensidade resultam em menor eficiência da extinção. Complementarmente, os autores mostraram que há correlação positiva entre a intensidade do estímulo estressor e aumento da liberação de NE no BLA (via projeções do LC), determinando a eficiência do processo de extinção. Estes achados sugerem que o estresse prévio pode exercer efeitos que modulam particularmente a aquisição da memória durante o condicionamento de medo ao contexto. Desta forma, para averiguar o papel das projeções CPFm → BLA na fase de aquisição da memória, realizamos ensaios de imunofluorescência anti-cFos em animais cuja injeção de FG foi realizada no BLA:

- *CPFm-IL*: Apesar de marcação retrógrada clara e larga presença de células cFos positivas em ambos os grupos experimentais, como demonstrado pela figura 11, não houve diferença significativa quanto à expressão cFos entre animais controles e estressados ($P = 0,0984$), nem diferença significativa na colocalização das marcações de cFos e FG ($P = 0,6872$). Também, não houve diferença quanto a proporção do número de colocalizações quando feita a razão pelo total de células cFos positivas ($P = 0,1995$). Estes dados evidenciam que o estresse prévio não exerce efeito sobre o CPFm-IL e suas projeções ao BLA no momento do condicionamento de medo ao contexto;

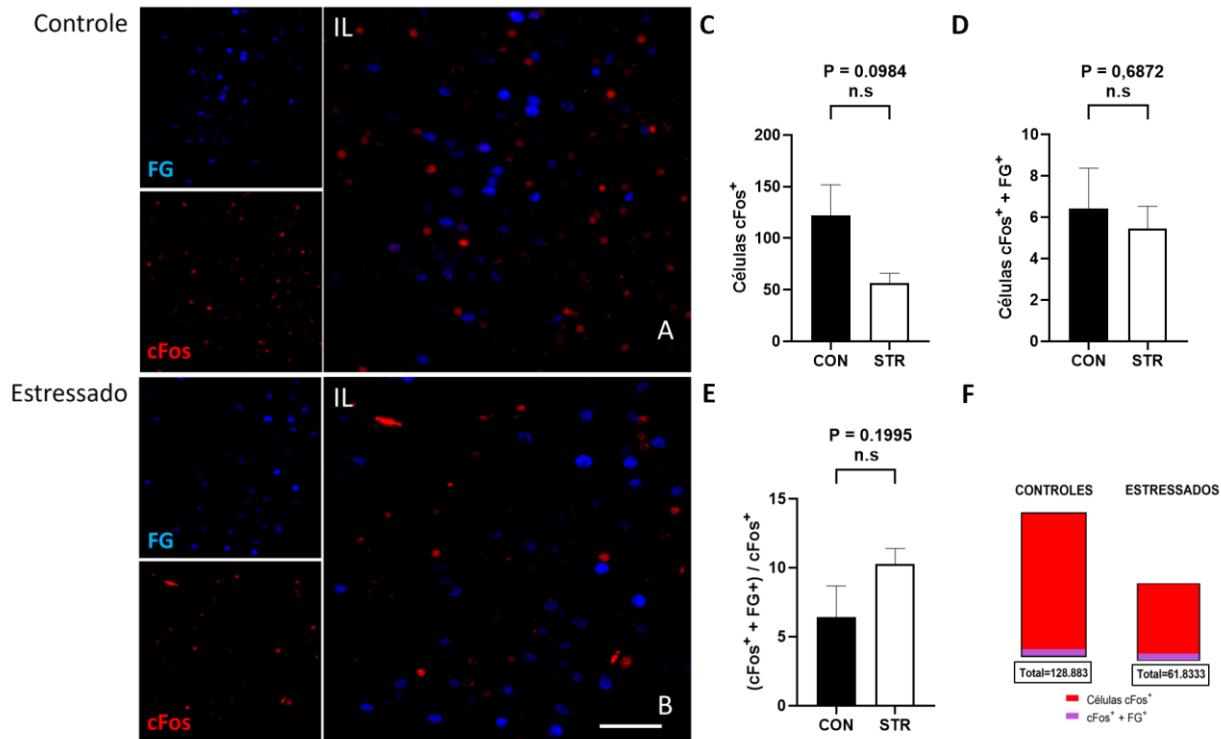


Figura 11. Expressão de cFos e FG (injeção no BLA) no CPFm-IL após condicionamento de medo ao contexto. Esquerda, foto micrografia representativa da expressão de cFos (vermelho) e FG (azul) no CPFm-IL de animais controles (**A**) e estressados (**B**) após condicionamento de medo ao contexto. Direita, gráficos representativos do total de células cFos positivas (**C**), cFos e FG positivas (**D**) e razão de co-localizações em relação ao total de cFos (**E**) no CPFm-IL de animais controles (“CON”) e estressados (“STR”) após condicionamento de medo e gráficos de parte pelo todo ilustrando o total de células cFos positivas (vermelho) e células cFos e FG positivas (roxo) no CPFm-IL de animais controles e estressados (**F**). Teste t bicaudal não pareado em C. n = 3 para os grupos “CON” e “STR” em C e D. Barra de escala = 200 μ m.

CPFM-PL: Como observado pela figura 12, houve marcação retrógrada menos substancial em relação ao CPFm-IL. Não houve diferenças quanto ao número de células cFos positivas ($P = 0,1245$) e colocalizações ($P = 0,2127$), bem como quanto à proporção de colocalizações pelo total de células cFos positivas ($P = 0,7090$). Isto demonstra que, de maneira semelhante ao observado acerca do CPFm-IL, o estresse agudo prévio não exerce efeitos sobre o CPM-PL e suas projeções ao BLA durante o condicionamento.

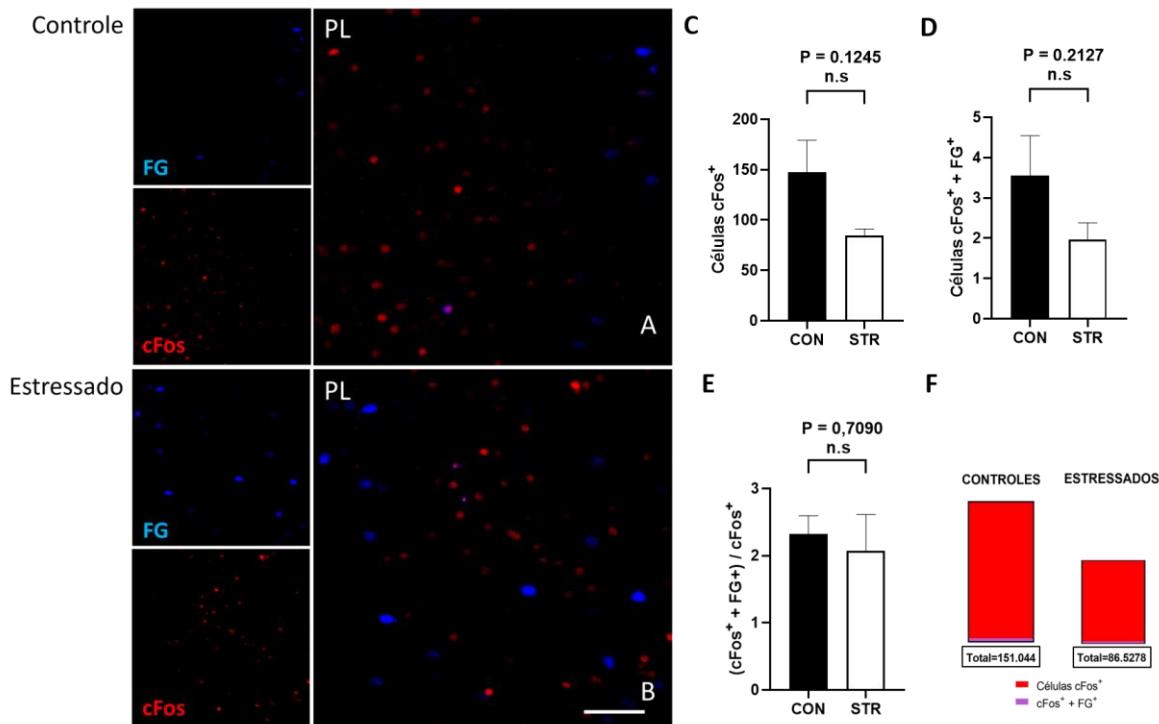


Figura 12. Expressão de cFos e FG (injeção no BLA) no CPFm-PL após condicionamento de medo ao contexto. Esquerda, foto micrografia representativa da expressão de cFos (vermelho) e FG (azul) no CPFm-PL de animais controles (A) e estressados (B) após condicionamento de medo ao contexto. Direita, gráficos representativos do total de células cFos positivas (C), cFos e FG positivas (D) e razão de co-localizações em relação ao total de cFos (E) no CPFm-PL de animais controles (“CON”) e estressados (“STR”) após condicionamento de medo e gráficos de parte pelo todo ilustrando o total de células cFos positivas (vermelho) e células cFos e FG positivas (roxo) no CPFm-PL de animais controles e estressados (F). Teste t bicaudal não pareado em C. n = 3 para os grupos “CON” e “STR” em C e D. Barra de escala = 200 μ m.

Presença de marcação retrógrada e atividade neuronal no LC

O LC é sabidamente a principal fonte da sinalização mediada por NE no sistema límbico. Como dito anteriormente, as projeções neuronais LC \rightarrow BLA são as responsáveis pela liberação de NE no BLA, sobretudo durante a exposição do animal ao estresse, o que afeta diretamente a eficiência do processo de extinção da memória de medo (GIUSTINO et al, 2020).

Não identificamos diferenças quanto a expressão de cFos (ativação neuronal imediata) no LC entre os grupos experimentais imediatamente após ao condicionamento de medo ($P = 0,7231$), inclusive em relação a ativação das projeções LC \rightarrow BLA propriamente ditas ($P = 0,3530$), como ilustrado pela figura

13. Em relação a expressão de FosB ao fim do protocolo de extinção da memória de medo, houve uma tendência de aumento na proporção de co-localizações de células FosB e FG positivas em animais previamente estressados, o que sugere um possível aumento da atividade neuronal das projeções LC → BLA durante o processo de extinção da memória (26,67% x 6,06%, estressados e controles, respectivamente), entretanto estes últimos resultados são apenas preliminares devido ao número amostral ainda baixo (Figura 14).

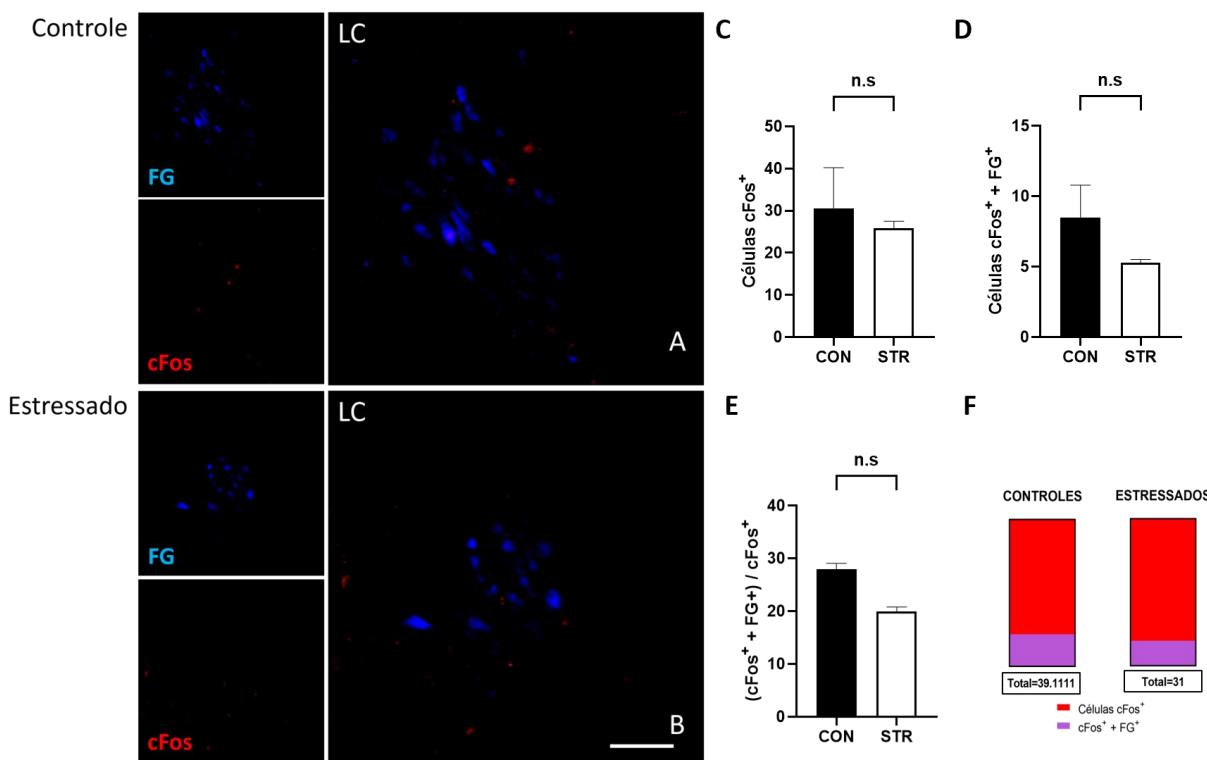


Figura 13. Expressão de cFos e FG (injeção no BLA) no LC após condicionamento de medo ao contexto. Esquerda, foto micrografia representativa da expressão de cFos (vermelho) e FG (azul) no LC de animais controles (A) e estressados (B) após condicionamento de medo ao contexto. Direita, gráficos representativos do total de células cFos positivas (C), cFos e FG positivas (D) e razão de co-localizações em relação ao total de cFos (E) no LC de animais controles (“CON”) e estressados (“STR”) após condicionamento de medo e gráficos de parte pelo todo ilustrando o total de células cFos positivas (vermelho) e células cFos e FG positivas (roxo) no LC de animais controles e estressados (F). Teste t bicaudal não pareado em C. n = 3 para os grupos “CON” e “STR” em C e D. Barra de escala = 200 μ m.

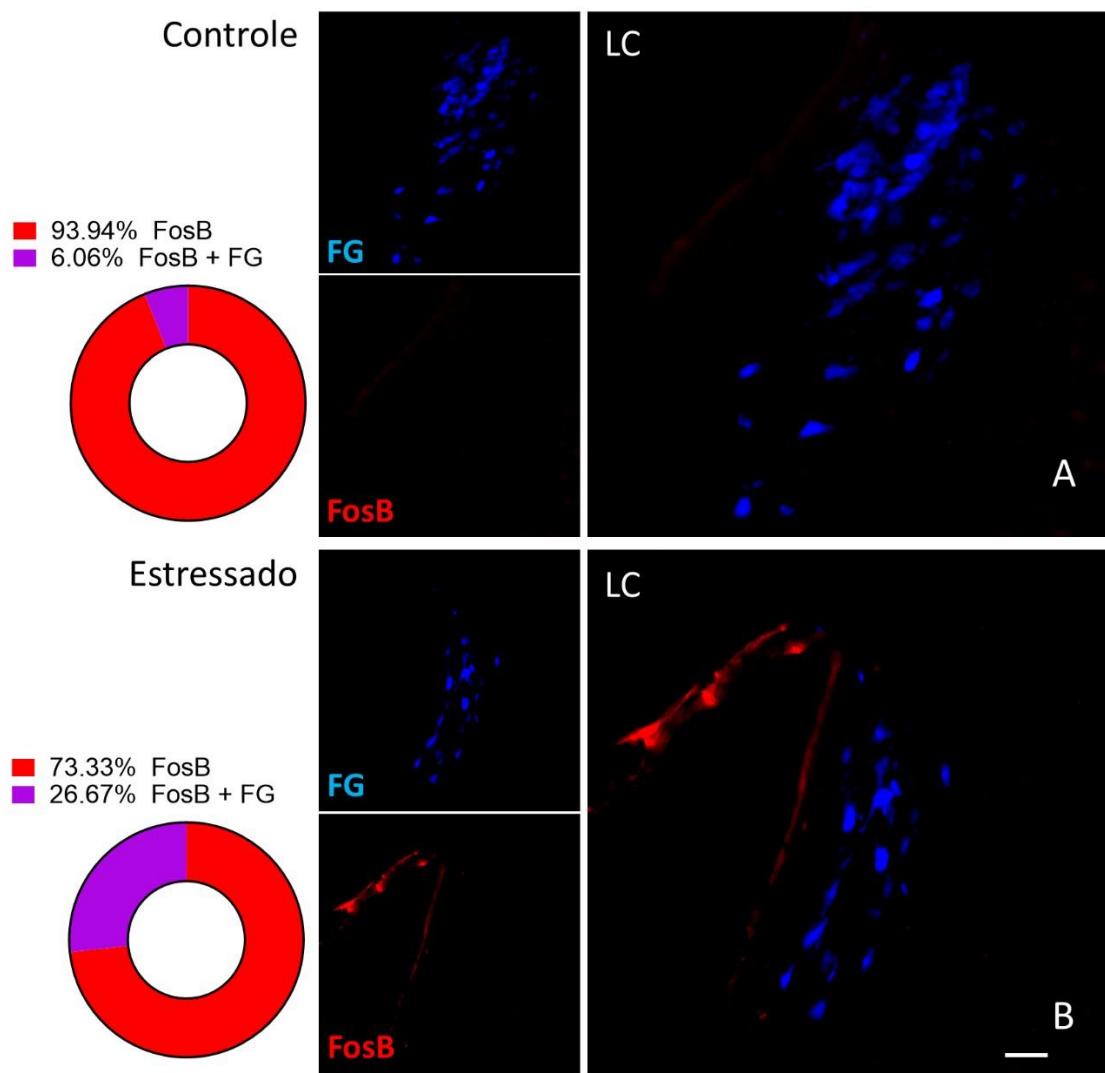


Figura 14. Expressão de FosB e FG (Injeção no BLA) no LC após extinção da memória de medo. Esquerda, representação gráfica da parte pelo todo ilustrando o total de células positivas para FosB (em vermelho) e células com dupla marcação para FosB e FG (em roxo), para o grupo controle (A) e estressado (B). Direita, fotomicrografia representativa do LC após marcação para FosB (vermelho) e FG (azul) em animal controle (A) e estressado (B). Barra de escala = 100 μ m.

Papel da sinalização mediada por norepinefrina no BLA durante o condicionamento e o impacto sobre o processo de extinção da memória de medo ao contexto

É sabido pela literatura que a liberação de NE no BLA exerce um efeito crítico na ocorrência do déficit de extinção da memória de medo, sendo esta liberação inversamente proporcional à eficiência do processo de extinção e diretamente proporcional a intensidade do estímulo estressor (GIUSTINO et al,

2020). Da mesma forma, é sabido que o aumento da retenção da memória em situações de alta excitação emocional é dependente do sinergismo das ações da NE e corticosterona no BLA (ROOZENDAAL et al, 2006). Essas evidências apontam para a importância da sinalização mediada por NE no BLA no momento do condicionamento sobre o déficit de extinção da memória de medo induzido por estresse agudo. Para verificar se há uma relação entre o déficit de extinção promovido tardivamente pelo estresse e a sinalização de NE no BLA no momento do aprendizado, foram realizadas injeções de propranolol (antagonista β -adrenérgico não-seletivo) no BLA imediatamente antes da submissão dos animais ao condicionamento de medo.

Como mostra a figura 15A, o grupo de animais previamente estressados que recebeu injeção de solução salina manifestou o déficit de extinção da memória de medo evidenciado pelo maior percentual de *freezing* executado durante os treinos de extinção 4 e 5, quando comparados aos animais controles (não-estressados que receberam injeção de solução salina). Interessantemente, os animais estressados que receberam injeção intra-BLA de propranolol tiveram comportamento semelhante aos controles, evidenciando que a inibição da sinalização norepinefrinérgica no BLA no momento do condicionamento de medo foi capaz de reverter o efeito prejudicial tardio do estresse agudo sobre a extinção da memória. Ademais, o grupo de animais não-estressados que recebeu injeção de propranolol executou percentual mediano de *freezing* durante todo o paradigma comportamental, o que sugere o papel da NE sobre neurônios do BLA na aquisição da memória de medo.

A figura 15B apresenta a área sob a curva em relação ao percentual de *freezing* efetuado durante todo o protocolo experimental e confirma que o grupo de animais estressados que receberam injeção de solução salina desempenhou maior acumulado de *freezing* quando comparado aos demais grupos experimentais. Tanto o grupo estressado quanto não-estressado que receberam injeção de propranolol apresentaram acumulado de *freezing* semelhante aos animais controles (não-estressados, salina), confirmado o papel da sinalização

norepinefrinérgica no BLA durante o condicionamento de medo para a ocorrência do déficit de extinção da memória de medo.

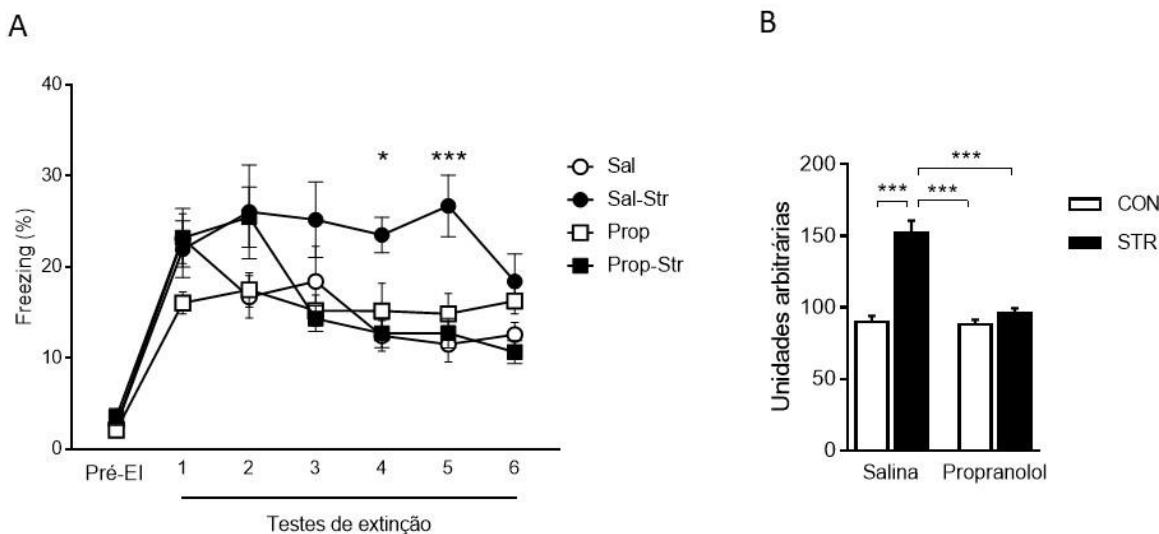


Figura 15. Injeção de propranolol no BLA previamente ao condicionamento de medo ao contexto previne o efeito tardio do estresse sobre o déficit de extinção da memória de medo. (A) Animais estressados e administrados com salina apresentaram maior porcentagem de *freezing* nos testes 4 e 5 em comparação aos animais não estressados. Animais administrados com propranolol, independente se estressados ou não, não apresentaram diferenças na porcentagem de *freezing* em comparação aos animais salina não estressados ($n = 8-11$ animais para cada grupo, ANOVA de duas vias: teste $F_6, 229 = 24,85, P < 0,0001$; tratamento $F_3, 229 = 11,98, P < 0,0001$; interação teste-tratamento $F_{18}, 229 = 2,045, P = 0,0087$). (B) Gráfico de colunas representando o valor total da área sob a curva, indicando que o acumulado de *freezing* realizado pelos animais estressados e tratados com salina foi maior do que o desempenhado pelos animais dos demais grupos experimentais ($n = 8-11$ animais para cada grupo, ANOVA de duas vias: estresse $F_1, 33 = 38,22, P < 0,0001$; tratamento $F_1, 33 = 26,72, P < 0,0001$; interação estresse-tratamento $F_1, 33 = 23,44, P < 0,0001$). Os resultados estão representados como média \pm SEM. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos são indicadas por * $P < 0,05$. CON, animais não estressados; STR, animais estressados.

5. DISCUSSÃO

Com os resultados apresentados neste Trabalho de Conclusão de Curso, confirmamos que a exposição de ratos ao estresse agudo de contenção por duas horas causa, 10 dias após, o déficit da extinção da memória de medo, confirmando resultados prévios do grupo (NOVAES et al, 2021) e dialogando com trabalhos presentes na literatura especializada, incluindo de nosso grupo, que evidenciam a necessidade de uma janela de 10 dias após o estresse para que

este exerce seus efeitos patogênicos, como o surgimento do comportamento do tipo ansioso ou o déficit da extinção da memória de medo (NOVAES, 2018; NOVAES et al, 2021; MITRA et al, 2005; ZHANG et al, 2019). Identificamos, de forma inédita, um efeito modulatório tardio do estresse sobre a atividade neuronal de estruturas fundamentais para o processo de extinção da memória de medo, como BLA, CPFm-PL e CPFm-IL, além das projeções neuronais BLA → CPFm-IL, o que sugere um possível mecanismo de ação do estresse. Associado a isto, evidenciamos que a sinalização mediada por NE no BLA durante o condicionamento de medo ao contexto é um componente fundamental do efeito deletério do estresse sobre a extinção da memória de medo.

Identificamos que o CPFm-PL sofre aumento da atividade neuronal durante o processo de extinção da memória de medo em função da exposição prévia ao estresse. VIDAL et al, (2006) mostrou que a estimulação elétrica do CPFm-PL causa prejuízo para extinção da memória de medo, o que dialoga diretamente com nossos achados a respeito deste núcleo. Por outro lado, utilizando a técnica de optogenética, MAREK e colegas (2018) evidenciaram a importância da atividade de projeções neuronais excitatórios que partem do CPFm-PL e atingem CPFm-IL para o funcionamento adequado do processo de extinção da memória de medo, implicando o envolvimento deste primeiro núcleo no processo de extinção de forma inédita. Somado a isto, verificamos que o estresse prévio causou redução significativa da atividade neuronal do CPFm-IL, estrutura fundamental para o processo de extinção da memória (AKIRAV et al, 2006; LAURENT e WESTBROOK, 2009; SIERRA-MERCADO et al, 2011; THOMPSON et al, 2010). De fato, as subdivisões CPFm-PL e CPFm-IL estão relacionadas com a expressão da memória de medo e extinção desta, respectivamente (LIKHTIK et al, 2005; CHO et al, 2013), em linha com o aumento da atividade neuronal do CPFm-PL e redução no CPFm-IL de forma concomitante ao déficit de extinção da memória de medo que foram observados com este trabalho.

Demonstramos que o estresse agudo de contenção aumenta a atividade neuronal do BLA, indicada pela expressão de FosB, durante o processo de extinção da memória de medo, fenômeno acompanhado do déficit deste mesmo

processo. É sabido que após 10 dias da submissão ao estresse agudo de contenção há, além de remodelamento plástico dos neurônios presentes no BLA, evidenciado pelo aumento da arborização dendrítica e aumento da atividade neuronal neste mesmo núcleo, o surgimento do comportamento do tipo ansioso (MITRA et al, 2005; ZHANG et al, 2019; NOVAES et al, 2018; NOVAES et al, 2021; NOVAES-Submetido). Muito embora tenhamos identificado modulação da atividade neuronal do BLA durante o processo de extinção da memória de medo em função do estresse prévio, as análises foram feitas sobre a totalidade deste núcleo. KIM e colegas (2016) caracterizaram a existência de duas populações neuronais distintas distribuídas pelo eixo rostro-caudal do BLA, identificadas pelos marcadores genéticos *Rps2* (neurônios responsivos à estímulos de valor negativo presentes em porções rostrais do complexo, majoritariamente) e *Ppp1r1* (neurônios responsivos à estímulos de valor positivo encontrados, em maioria, em porções caudais do núcleo). Desta forma, torna-se interessante a busca pelo tipo de subpopulação neuronal afetada pelo estresse e seus mediadores que registrou aumento de atividade e como isto se relaciona ao fenômeno de resistência ao processo de extinção da memória de medo.

Vimos que o aumento da atividade neuronal do BLA ocorre, também, em suas projeções ao CPFm-IL, ou seja, o estresse prévio não só modula positivamente a atividade do BLA e CPFm-PL e negativamente a atividade do CPFm-IL durante o processo de extinção da memória, mas causa aumento do recurtamento de projeções neuronais que partem do BLA ao CPFm-IL durante o mesmo momento. Torna-se interessante a busca pelo elo entre o aumento da atividade das projeções BLA → CPFm-IL e redução da atividade neuronal do CPFm-IL, podendo-se supor a existência de sinapses com interneurônios inibitórios presentes no CPFm-IL. Além disso, é fundamental entender como a modulação positiva da atividade do CPFm-PL se insere neste contexto a partir da análise de suas aferências e eferências ao BLA (BLA→CPFm-PL e CPFm-PL→BLA, estas últimas não estudadas por este trabalho).

Em linha com trabalho recente de DAVIS et al, (2017), no qual a conectividade entre BLA, CPFm-PL e CPFm-IL é apresentada como um

microcírculo bidirecional auto modulado cujo equilíbrio determina o sucesso da extinção da memória de medo, identificamos a influência tardia do estresse agudo de contenção sobre a atividade destas estruturas e, especificamente, sobre as projeções BLA → CPFm-IL, de modo a perturbar o equilíbrio do microcírculo e resultar em déficit de extinção da memória de medo, propondo-se assim um possível mecanismo de atuação do estresse sobre a alteração do fenótipo comportamental estudado.

Trabalhos presentes na literatura especializada mostram que há relação entre a sinalização mediada por NE e os efeitos do hormônio corticosterona – principal glicocorticoide murino, cujo pico de concentração plasmática é atingido em situações estressoras - ambos atuando em sinergismo sobre neurônios do BLA. ROOZENDAAL et al, (2006) demonstra que a inibição da ação da norepinefrina no BLA a partir do uso do antagonista β -adrenérgico não-seletivo propranolol em animais emocionalmente excitados previne o efeito da corticosterona sobre o aumento da retenção da memória, enquanto que a estimulação da ação da NE, também no BLA, a partir da infusão de ioimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) em animais não excitados emocionalmente resgatou o efeito de aumento da retenção da memória pela corticosterona visto em animais excitados. Recentemente, foi publicado trabalho no qual a estimulação da atividade de projeções neuronais do LC para o BLA (as quais liberam NE no BLA) causa o déficit de extinção da memória de medo quando associada à estímulo estressor de baixa intensidade, mimetizando o efeito de estressores de alta intensidade (GIUSTINO et al, 2020).

A partir de injeções intra-BLA de propranolol realizadas previamente ao condicionamento de medo ao contexto, inibimos a sinalização mediada por NE no BLA durante o momento de aprendizado do medo e observamos a reversão do déficit de extinção da memória de medo visto em animais estressados, o que confirma o papel crucial da NE sobre os neurônios deste núcleo para que haja o efeito prejudicial do estresse. Por outro lado, animais não-estressados que receberam injeção de propranolol apresentaram nível mediano de *freezing* em todos os treinos de extinção, quando é esperado um nível elevado para todos os

grupos experimentais durante o 1º treino de extinção da memória. Levantamos a hipótese deste fenômeno ser devido à ausência da sinalização norepinefrinérgica durante o momento do condicionamento, pois os efeitos da corticosterona sobre a memória são dependentes da excitação emocional (mediada pela liberação de NE, inclusive no BLA) e, como inibimos esta sinalização no BLA durante o condicionamento de medo, também reduzimos o componente de excitação emocional do protocolo comportamental, tornando os animais menos susceptíveis aos efeitos da corticosterona e, portanto, do estresse causado pelo próprio condicionamento de medo.

Coletivamente, evidenciamos que o estresse agudo de contenção por duas horas é capaz de causar o déficit de extinção da memória de medo em ratos 10 dias após, em linha com achados prévios do grupo (NOVAES et al, 2021). De forma inédita, demonstramos que o déficit da extinção da memória de medo é acompanhado do aumento da atividade neuronal do BLA e do CPFm-PL durante o treino de extinção da memória. Além disso, é também acompanhado do aumento da atividade das projeções neuronais enviadas do BLA ao CPFm-IL e redução da atividade neuronal do próprio CPFm-IL. Vimos que a sinalização mediada por NE no BLA durante o condicionamento de medo ao contexto é fundamental para a ocorrência do efeito prejudicial do estresse sobre a extinção da memória de medo.

6. CONCLUSÃO

Identificamos um possível mecanismo pelo qual o estresse agudo exerce, tardivamente, seu efeito deletério sobre o processo de extinção da memória, envolvendo tanto a modulação positiva sobre a atividade dos neurônios do BLA, CPFm-PL e projeções neuronais BLA → CPFm-IL e modulação negativa da atividade do CPFm-IL, quanto a sinalização norepinefrinérgica no BLA durante o condicionamento de medo ao contexto. Novos estudos são necessários para avaliar se a modulação da atividade das estruturas e projeções citadas são diretamente afetadas pela alteração da sinalização norepinefrinérgica no BLA durante o condicionamento de medo ao contexto.

7. BIBLIOGRAFIA

- AKIRAV I, RAIZEL H, MAROUN M. Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA(A) agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. **Eur J Neurosci**, n. 23(3), p. 758-764, 2006.
- BALDI E, BUCHERELLI C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, p. 53, p.160-190, 2015.
- BERMAN DE, DUDAI Y. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. **Science**, n. 291(5512), p. 2417-2419, 2001.
- BLOODGOOD DW, SUGAM JA, HOLMES A, KASH TL. Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. **Translational Psychiatry**, n. 8, p. 60, 2018.
- BUKALO O, PINARD CR, SILVERSTEIN S, BREHM C, HARTLEY ND, WHITTLE N, COLACICCO G, BUSCH E, PATEL S, SINGEWALD N, HOLMES. Prefrontal inputs to the amygdala instruct fear extinction memory formation. **Sci. Adv**, n.1, p. e1500251, 2015.
- CHO DI, KIM J, LEE H, KIM JI, SUNG Y, CHOI JE, VENKAT SJ, PARK P, JUNG H, KAANG BK. Synaptic correlates of associative fear memory in the lateral amygdala. **Neuron**, n. 109(17), p. 2717-2726.e3, 2021.
- CHO JH, DEISSEROTH K, BOLSHAKOV VY. Synaptic encoding of fear extinction in mpfc-amamygdala circuits. **Neuron**, n. 80, p. 1491–1507, 2013.
- DAVIS P, ZAKI Y, MAGUIRE J, REIJMERS LG. Cellular and oscillatory substrates of fear extinction learning. **Nature Neurosci**, n. 20 (11), p. 1624-1633, 2017.
- DAVIS P, ZAKI Y, MAGUIRE J, REIJMERS LG. Cellular and oscillatory substrates of fear extinction learning. **Nature Neurosci**, n. 20 (11), p. 1624-1633, 2017.
- FENDT M, FANSELOW MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev**, n. 23(5), p.743-760, 1999.
- GIUSTINO TF, RAMANATHAN KR, TOTTY MS, MILES OW, MAREN S. Locus Coeruleus Norepinephrine Drives Stress-Induced Increases in Basolateral Amygdala Firing and Impairs Extinction Learning. **J. Neurosci**, n. 40(4), p. 907–916, 2020.
- GROSS C, HEN R. The developmental origins of anxiety. **Nat Rev Neurosci**. n. 5, p. 545-552, 2004
- HALE MW, BOUWKNECHT JA, SPIGA F, SHEKHAR A, LOWRY CA. Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. **Brain Res Bull**, n. 71, p. 174–182, 2006.
- HEIMER L, VAN HOESEN GW. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, n. 30(2), p. 126-147, 2006.

- HERRY C, CIOCCHI S, SENN V, DEMMOU L, MULLER C, LUTHI A. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, n. 454(7204), p. 600-606, 2008.
- HOLMES NM, PARKES SL, KILLCROSS AS, WESTBROOK RF. The basolateral amygdala is critical for learning about neutral stimuli in the presence of danger, and the perirhinal cortex is critical in the absence of danger. **J Neurosci**, n. 33(32), p. 13112-13125, 2013.
- IZQUIERDO A, WELLMAN CL, HOLMES A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. **J Neurosci**, n. 24;26(21), p. 5733-5738, 2006.
- KELLETT J, KOKKINIDIS L. Extinction deficit and fear reinstatement after electrical stimulation of the amygdala: implications for kindling-associated fear and anxiety. **Neuroscience**, n. 127(2), p. 277-287, 2001.
- KIM J, PIGNATELLI M, XU S, ITOHARA S, TONEGAWA S. Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. **Nat Neurosci**, n. 19(12), p. 1636-1646, 2016.
- KNOX D, GEORGE SA, FITZPATRICK CJ, RABINAK CA, Maren S, Liberzon I. Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats. **Learn Mem**, n. 12;19(2), p. 43-49, 2012.
- LAURENT V, MARCHAND AR, WESTBROOK RF. The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear. **Learn Mem**, n. 15(5), p. 304-314, 2008.
- LAURENT V, WESTBROOK RF. Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. **Learn Mem**, n. 15(9), p. 657-666, 2008.
- LAURENT V, WESTBROOK RF. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. **Learn Mem**, n. 25;16(9), p. 520-529, 2009.
- LEDOUX JE. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, n. 23, p. 84-155, 2000.
- LEDOUX JE. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cell Mol Neurobiol**, n. 23(4-5), p. 727-38, 2003.
- LIKHTIK E, PAZ R. Amygdala-prefrontal interactions in (mal)adaptive learning. **Trends Neurosci**, n. 38, p. 158-166, 2015.
- LIKHTIK E, PELLETIER JG, PAZ R, PARÉ D. Prefrontal control of the amygdala. **J. Neurosci**, n. 25, p. 7429-7437, 2005.
- LUTHI A, LUSCHER C: Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders. **Nat Neurosci**, n. 17, p. 1635-1643, 2014.
- MAHAN AL, RESSLER KJ. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends Neurosci**, n. 35(1), p. 24-35, 2012.

- MAREK R, XU L, SULLIVAN RKP, SAH P. Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. **Nat Neurosci**, n. 21(5), p. 654-658, 2018.
- MAREN S, QUIRK GJ. Neuronal signalling of fear memory. **Nat Rev Neurosci**, n. 5, p. 844-852, 2004.
- MAROUN M, LOANNIDES PJ, BERGMAN KL, KAVUSHANSKY A, HOLMES A, WELLMAN CL. Fear extinction deficits following acute stress associate with increased spine density and dendritic retraction in basolateral amygdala neurons. **Eur J Neurosci**, n. 38, p. 2611–2620, 2013.
- MCEWEN B. S., BOWLES N. P., GRAY J. D., HILL M. N., HUNTER R. G., KARATSOREOS I. N., et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nat. Neurosci**, n. 18, p.1353–1363, 2015.
- MILAD MR, QUIRK GJ. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. **Annu. Rev. Psychol**, n. 63, p.129–151, 2012.
- MITRA R, JADHAV S, MCEWEN BS, VYAS A, CHATTARJJ S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. **Proc Natl Acad Sci**, n. 102(26), p. 9371-9376, 2005.
- MORGAN M, LEDOUX J. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behav Neurosci**, n. 109, p. 681–688, 1995.
- MYERS KM, DAVIS M. Mechanisms of fear extinction. **Mol. Psychiatry**, n. 12, p. 120–150, 2007.
- NIEMINEN SA, SIRVIO J, TEITTINEN K, PITKANEN A, AIRAKSINEN MM, RIEKKINEN P. Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. **Physiology & behavior**, n. 51, p. 845-849, 1992.
- NOVAES LS, BUENO-DE-CAMARGO LM, MUNHOZ CD. Environmental enrichment prevents the late effect of acute stress-induced fear extinction deficit: the role of hippocampal AMPA-GluA1 phosphorylation. **Transl Psychiatry**, n. 11(1), p. 18, 2021.
- NOVAES LS, DOS SANTOS NB, PERFETTO JG, GOOSENS KA, MUNHOZ CD. Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxiety-related behavior but not changes in basolateral amygdala spine density. **Psychoneuroendocrinology**, n. 98, p. 6-10, 2018.
- NOVAES LS, SHAMMAH-LAGNADO SJ. Projections from the anteroventral part of the medial amygdaloid nucleus in the rat. **Brain Res**, n. 1421, p. 30–43, 2011.
- PITMAN R. K., RASMUSSEN A. M., KOENEN K. C., SHIN L. M., ORR S. P., GILBERTSON M. W., et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nat. Rev. Neurosci**, n. 13, p. 769–787. 2012
- QUIRK GJ, RUSSO GK, BARRON JL, LEBRON K (2000). The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. **J Neurosci**, n. 20, p. 6225–6231, 2000.

RAUCH SL, WHALEN PJ, SHIN LM, MCLNERNEY SC, MACKLIN ML, LASKO NB, et al. Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: A functional MRI study. **Biol Psychiatry**. n. 47, p. 769–776, 2000

ROOZENDAAL B, OKUDA S, VAN DER ZEE EA, MCGAUGH JL. Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. **Proc Natl Acad Sci**, n. 103(17), p 6741-6746, 2006.

ROZESKE RR, VALERIO S, CHAUDUN F, HERRY C. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. **Genes. Brain. Behav**, n. 14, p. 22–36, 2015.

Santini E, Quirk GJ, Porter JT. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. **J Neurosci**. 2008; 28(15):4028-36.

SENN V, WOLFF SBE, HERRY C, GRENIER F, EHRLICH I, GRUNDEMANN J, FADOK JP, MULLER C, LETZKUS JJ, LUTHI A. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. **Neuron**, n. 81, p. 428–437, 2014.

SIERRA-MERCADO D, PADILLA-CCOREANO N, QUIRK GJ. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**. N. 36(2), p. 529-538, 2011.

SILVEIRA MC, SANDNER G, GRAEFF FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, n. 56, p. 115–118, 1993.

STROBEL, C., MAREK, R., GOOCH, H. M., SULLIVAN, R. K. & SAH, P. Prefrontal and auditory input to intercalated neurons of the amygdala. **Cell reports**, n. 10, p. 1435–1442, 2015.

THOMPSON BM, BARATTA MV, BIEDENKAPP JC, RUDY JW, WATKINS LR, MAIER SF. Activation of the infralimbic cortex in a fear context enhances extinction learning. **Learn Mem**, n. 17(11), p. 591-599, 2010.

TOVOTE P, FADOK JP, LUTHI A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nat. Rev. Neurosci**, n. 16, p. 317–331, 2015.

VIDAL-GONZALEZ I, VIDAL-GONZALEZ B, RAUCH SL, QUIRK GJ. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learn Mem**, n. 13(6), p. 728-733., 2006

VOGEL E, KRABBE S, GRUNDEMANN J, WAMSTEEKER, CUSULIN JI, LUTHI A. Projection-specific dynamic regulation of inhibition in amygdala micro-circuits. **Neuron**, n. 91, p. 644–651, 2016.

WANG DV, WANG F, LIU J, ZHANG L, WANG Z, LIN L. Neurons in the amygdala with response-selectivity for anxiety in two ethologically based tests. **PLoS One**, n. 6(4), p. e18739, 2011.

WILBER AA, WALKER AG, SOUTHWOOD CJ, FARRELL MR, LIN GL, REBEC GV et al. Chronic stress alters neural activity in medial prefrontal cortex during retrieval of extinction. **Neuroscience**, n. 174, p. 115–131, 2011.

- YEHUDA R. Post-traumatic stress disorder. **N Engl J Med**, n. 346, p. 108–114.
- ZHANG, H. H., MENG, S. Q., GUO, X. Y., ZHANG, J. L., ZHANG, W., CHEN, Y. Y., LU, L., YANG, J. L., & XUE, Y. X. Traumatic stress produces delayed alterations of synaptic plasticity in basolateral amygdala. **Frontiers in Psychology**, 10(OCT).

8. ANEXOS



Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB II - 05508 009
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 5091-7753 - e-mail: ceu@icb.usp.br

Decl. CRUA.94.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **85/2016/CEUA**, válido até **11/08/2020**, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Carolina Demarchi Munhoz**, do Departamento de **Farmacologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Vitor Augusto Laurino Juliano** na equipe do Projeto de Pesquisa: **"A relação entre a ativação dos receptores de glicocorticoides e a hipereexcitabilidade dos neurônios do complexo basolateral da amigdala na ansiedade tardia induzida por estresse agudo em ratos e sua implicação no déficit de extinção da memória de medo"**, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 23 de maio de 2019.

Luciane Valéria Sita
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Vitor.A
24/09/2021

Data e assinatura do aluno(a)

Leonardo S. Noras
01/10/2021

Data e assinatura do orientador(a)