

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Lorena Terene Lopes Guerra

**PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA DE MEDO: DIMORFISMO SEXUAL E
CONSOLIDAÇÃO TARDIA NA AMÍGDALA E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
MEDIAL**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Lorena Terene Lopes Guerra

**PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA DE MEDO: DIMORFISMO SEXUAL E
CONSOLIDAÇÃO TARDIA NA AMÍGDALA E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
MEDIAL**

Versão final

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Grace Schenatto Pereira
Moraes

Co-orientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão

043 Guerra, Lorena Terene Lopes.
Processamento da memória de medo: dimorfismo sexual e consolidação tardia na amígdala e no córtex pré-frontal medial [manuscrito] / Lorena Terene Lopes Guerra. – 2021.
60 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes. Co-orientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Córtex Pré-Frontal. 3. Tonsila do Cerebelo. 4. Consolidação da Memória. 5. Medo. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Mourão, Flávio Afonso Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO N° 539 DE LORENA TERENE LOPES GUERRA

"Processamento da Memória de Medo: Dimorfismo Sexual e
Consolidação Tardia na Amígdala e no Córtex Pré-frontal Medial"

LORENA TERENE LOPES GUERRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **14 de maio de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Lucas Miranda Kangussu, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
Profa. Dra. Cristina Martins e Silva, CCS/Universidade Federal do Espírito Santo
Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Coorientador
Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientadora

Belo Horizonte, 14 de maio de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Martins e Silva**, **Usuário Externo**, em 17/05/2021, às 19:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávio Afonso Gonçalves Mourão**, **Usuário Externo**, em 17/05/2021, às 21:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grace Schenatto Pereira Moraes**, **Chefe de departamento**, em 18/05/2021, às 08:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 18/05/2021, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0708946** e o código CRC **24F9090E**.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Memória	8
1.2. Memória de medo e seus substratos neurais	14
1.2.1. <i>Complexo amigdalóide</i>	15
1.2.2. <i>Córtex Pré-Frontal</i>	18
1.2.3. <i>Diferenças sexuais no condicionamento ao medo</i>	20
1.3. Genes de expressão imediata	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Animais	28
4.2. Medo condicionado ao contexto	28
4.2.1. <i>Análise de reação ao choque</i>	29
4.3. Imunofluorescência	30
4.3.1. <i>Microscopia</i>	32
4.3.2. <i>Análise de colocalização e quantificação das células</i>	32
4.4. Análises estatísticas	33
4.5. Desenho experimental	34
5. RESULTADOS	36
5.1. Em machos, mas não em fêmeas, o condicionamento com 1US é capaz de induzir memória de medo condicionado	36
5.2. Expressão diferencial de ZiF268 no mPFC entre os grupos 1US e 5US	39
6. DISCUSSÃO	43
6.1. As diferenças na expressão comportamental em machos e fêmeas não resulta de mudanças comportamentais durante o treino	43
6.3. A persistência da memória depende da atividade diferencial no mPFC	44
7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

AGRADECIMENTOS

Não se faz ciência sozinho. Esse ano mais do que nunca percebemos o quanto essa afirmação é verdadeira. Para fazer ciência de qualidade são necessários muitos pontos de vista discutindo um mesmo tema e, na rotina da universidade, isso acontece naturalmente. Cada um leva um café, um biscoito, uma história e, assim, a gente cria debates e teorias, algumas sérias e outras nem tanto. Sempre tivemos muitos desses momentos na rotina de laboratório e, quase naturalmente, eu fui absorvendo as discussões. Depois de um tempo naturalizamos o privilégio e as experiências que frequentar esses espaços nos proporcionam, agora que estou me despedindo, vou revisitando as lembranças e vem uma tristeza por essa despedida não ser presencial.

Em meio ao caos da pandemia, planejamos as alegrias a prazo. Infelizmente não vou estar aqui pra, depois que isso tudo passar, poder desfrutar junto aos amigos das coisas de que sentimos tantas saudades. Mas, ao longo desses sete anos, tenho muito a agradecer à UFMG e, principalmente, ao NNC.

Quero deixar meu agradecimento aos professores do NNC, especialmente à Grace, pelo acolhimento e todos os ensinamentos no dia a dia do laboratório. Espero que eu tenha sido capaz de devolver ao NNC um pouco do que aprendi com vocês. Como já disse, ciência não se faz sozinha, então preciso agradecer a todos os colegas de laboratório que, em tempos pré e pós pandêmicos, sempre se disponibilizaram para ouvir e me auxiliar ao longo dos experimentos. Flávio, Lara, Laura, Caio, Matheus, Paula, Léo e João Pedro, muito obrigada, é um privilégio poder contar com gente tão competente quanto vocês. Um agradecimento especial à Lara, Laura, Flávio e Paula pela companhia constante (mesmo que virtual) durante esse tempo. Agradeço ainda aos demais membros do NNC pelas discussões e aprendizados.

A UFMG também me acrescentou outras tantas pessoas maravilhosas e diferentes de mim, com quem aprendi demais. Elisa, Dani, Bel, Paty, Sofia e Torresmo obrigada por todo o apoio mesmo de longe. Um agradecimento especial à Florzinha que salvou minha quarentena com as fotos mais lindas. Lari, sinto muita saudade de conviver com você todos os dias. À equipe do GIZ também fica um agradecimento, o trabalho de vocês é lindo e necessário. E, para maior surpresa que a UFMG me deu,

fica todo meu amor e agradecimento pelo apoio constante. São quase sete anos com você também, Ian. Obrigada por deixar minha vida mais leve.

Ceguei à UFMG com um sonho: ser neurocientista. Mas antes dele, tive muitos outros. Obrigada papai e mamãe por terem alimentado todos os sonhos ao longo dos anos. Independente do sonho em ser atriz, jornalista ou arqueóloga, vocês sempre deram corda à minha curiosidade, alimentando a vontade de aprender que herdei de vocês. Fica um agradecimento especial ao meu tio que é quase um pai extra, titi João. E, por fim, aos meus amigos mais antigos, que me conheceram em todas as fases da vida e que são basicamente irmãos, fica um agradecimento e também uma saudade.

RESUMO

Nem todas as memórias persistem por toda a vida. De maneira geral, memórias com alta relevância emocional no momento de sua aquisição tendem a permanecer acessíveis por mais tempo. Entretanto, ainda não compreendemos inteiramente os mecanismos neurais responsáveis por distinguir memórias com diferentes pesos emocionais. Neste trabalho, modulamos a intensidade do conteúdo emocional de um traço de memória de medo contextual por meio da alteração da frequência (1 ou 5) de estímulos incondicionados (US) no momento da aquisição da memória. Utilizamos um gene de expressão imediata, Zif268, como marcador da plasticidade neural durante o processo de consolidação. A memória de medo persistiu por 24h em camundongos machos condicionados com 1US e 5US. Entretanto, apenas no condicionamento com 5US a memória persistiu por 30 dias. Em contrapartida, nas fêmeas, a memória de medo foi formada apenas após 5US. A seguir, testamos a hipótese de que é na consolidação sistêmica que os protocolos de 1US e 5US agem para formar memórias de medo com diferentes durações. Para testar essa hipótese, quantificamos a expressão de Zif268 12h pós aquisição, em duas áreas reconhecidas por participarem da consolidação sistêmica: córtex pré-frontal medial (mPFC) e amígdala basolateral (BLA). 12h pós-treino observamos uma diferença, entre 1US e 5US, na expressão de Zif268 no mPFC, mas não na BLA. Nossos resultados sugerem que traços de memória de medo contextual com carga emocional elevada (5US) levam a uma diminuição da plasticidade do mPFC durante a consolidação sistêmica, o que provavelmente diminui a modulação exercida pelo mPFC sobre outras estruturas e permite que a memória de medo contextual persista por 30 dias.

Palavras-chave: consolidação, córtex pré-frontal, amígdala, memória de medo.

ABSTRACT

Not all memories last for the lifetime. Generally speaking, memories with high emotional value during acquisition tend to remain accessible for longer periods. However, the mechanisms that interfere with memory endurance are not fully understood. In this work, we modulated the intensity of memory trace emotional value by altering unconditioned stimulus (US) frequency (1 or 5US) during acquisition of contextual fear memory. In male mice, the memory was present 1 day after conditioning in 1 and 5US groups. We used an immediate early gene, Zif268, as a marker for neural plasticity during consolidation. Nevertheless, only in the 5US group memory persisted for 30 days. On the other hand, only females in the 5US group expressed conditioned fear. Next, we tested the hypothesis that 1US and 5US protocols differently modulate memory formation during systems consolidation, which results in memories with distinct duration. In order to test it, we analyzed Zif268 expression 12h after acquisition in two areas known for their involvement in systems consolidation: the medial prefrontal cortex (mPFC) and the basolateral amygdala (BLA). 12h after training, a difference between 1US and 5US expression was found in mPFC, but not in BLA. Our results suggest that high emotional value contextual fear memory (5US) results in diminished plasticity in mPFC during systems consolidation, thus probably resulting in diminished modulation by mPFC over other structures, hence allowing memory to persist for 30 days.

Keywords: consolidation, prefrontal cortex, amygdala, fear memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. - Circuito da amígdala para aquisição do medo condicionado ao contexto.....	17
Figura 1.2. - Mecanismos intracelulares do Zif268.....	24
Figura 4.1. - Protocolo de dupla marcação Zif268/DAPI e análise da imunorreatividade de ZIF268.....	33
Figura 4.2. - Desenho do experimento 1.....	34
Figura 4.3. - Desenho do experimento 2.....	35
Figura 5.1. - Teste de memória de MCC recente e remota.....	37
Figura 5.2. - Comparação na expressão de comportamento de congelamento entre os machos e fêmeas dos grupos 1US e 5US.....	38
Figura 5.3. - Análise de reação ao choque.....	39
Figura 5.4. - Expressão de Zif268 em células do mPFC.....	40
Figura 5.5. - Expressão de Zif268 em células da amígdala basolateral.....	42
Figura 6.1. - Estados do engrama, em machos, ao longo do tempo	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala de análise de reação ao choque.....	29
---	----

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

1US - Treino com baixa relevância emocional	L-LTP - Potenciação de longa duração tardia
5US - Treino com alta relevância emocional	LTM - Memória de longa duração
AC - Córtex cingulado anterior	LTP - Potenciação de longa duração
AGm - Córtex agranular medial	MCC - Medo condicionado ao contexto
AMI - Amígdala	MCS - Medo condicionado ao som
AMPA - Ácido α -amino hidroximetil isoxazol propiônico	mPFC - Córtex pré-frontal medial
BA - Amígdala basal	NGS - Soro normal de cabra
BLA - Amígdala basolateral	NMDA - N-metil-D-aspartato
CE - Amígdala Central	NP - Neurônio principal
CS - Estímulo condicionado	PAG - Substância cinzenta periaquedutal
DAPI - Dicloridrato diamidino fenilindol	PBS - Tampão fosfato-salina
HIP - Hipocampo	PFA - Paraformaldeído
IEG - Gene de expressão imediata	PL - Pré-límbico
IL - Infra Límbico	PV - Interneurônios parvalbumina positivos
ITC - Células intercalares	SOM - Interneurônios somatostatina positivos
LA - Amígdala lateral	US- - Controle
	US - Estímulo incondicionado

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória

A memória é um fenômeno que ocorre a partir das interações entre o ambiente e o sistema nervoso e envolve mudanças na atividade e na organização celular desse sistema (DUDAI, 2004; JOSSELYN; TONEGAWA, 2020). Sendo tanto o ambiente quanto o sistema nervoso meios extremamente dinâmicos, a memória também partilha dessa característica. Porém, para seu melhor entendimento cabe uma divisão didática em três fases sucessivas: aquisição, consolidação e evocação da memória. Mas é verdade que essa divisão não reflete precisamente a realidade, na qual essas fases podem muitas vezes se sobrepor (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021).

A aquisição é o processo pelo qual as informações ambientais são captadas pelos receptores sensoriais, traduzidos e codificados, a partir de sinais químicos e ou físicos, que, por sua vez, são codificadas em traços de memórias ao alterar o padrão de ativação das assembleias neuronais. Com a formação desse novo traço de memória, ou engrama¹, a organização da rede se altera e, a partir disso, podem surgir novas memórias (DUDAI, 2004; KORTE; SCHMITZ, 2016).

Para possibilitar esta reorganização e permitir que ela se sustente, diferentes propriedades devem estar presentes, dentre elas a plasticidade sináptica. Podemos definir a plasticidade sináptica como mecanismos celulares, dependentes de atividade, que alteram o funcionamento e a eficácia da comunicação celular (ABRAHAM, WICKLIFFE C., 2008; YOUSUF *et al.*, 2020). A ideia de fortalecimento de conexões celulares como base para processos de aprendizagem foi proposta há mais de um século, em 1911, por Cajal e, antes mesmo que houvessem metodologias adequadas para a visualização e manipulação de mecanismos plásticos, modelos como o de Hebb (1949) já desenvolviam a noção de que essas alterações a nível

¹O termo engrama foi cunhado por Richard Semon, em 1904, e é relativo ao substrato físico (neural) que suporta o armazenamento e a evocação de memórias (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020).

sináptico poderiam levar a reajustes mais profundos e duradouros no sistema (NICOLL, 2017).

Dentre os mecanismos plásticos que podem estar envolvidos na aquisição, a potenciação de longa duração (LTP) dependente de receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) está entre os mais estudados (BLISS; LOMO, 1973; GOOSENS; MAREN, 2004; NICOLL, 2017; RICHARDSON *et al.*, 1992). Nesse mecanismo, a exposição repetida a um estímulo resulta no fortalecimento sináptico mediado pelo aumento da sinalização glutamatérgica. Ao ser liberado, o glutamato se liga aos receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), que são ionotrópicos, e o canal se abre possibilitando um influxo de cátions. Esse influxo promove uma despolarização celular o que, por sua vez, promove abertura de outro receptor ionotrópico glutamatérgico, o NMDA. A sequência temporal dos eventos é importante, uma vez que a abertura do canal NMDA não depende unicamente da ligação do glutamato, pois seu poro encontra-se obstruído por íons de magnésio enquanto o potencial de membrana está em repouso. A despolarização promovida pelos receptores AMPA repele o magnésio do poro do receptor NMDA, promovendo um influxo de cátions, mas principalmente de cálcio. Uma vez dentro da célula, o cálcio atua como sinalizador intracelular e promove mudanças na organização da célula que favorecem a manutenção da LTP (BLISS; LOMO, 1973; GOOSENS; MAREN, 2004; NICOLL, 2017; RICHARDSON *et al.*, 1992).

Podemos ainda dividir a LTP em duas fases: uma inicial, que não depende da síntese proteica e se inicia logo após o aumento das concentrações intracelulares de cálcio, e uma tardia (L-LTP), que depende da alteração de transcrição gênica e da síntese de proteínas *de novo*. Na fase inicial, receptores armazenados no meio intracelular são inseridos à membrana plasmática, facilitando posteriores despolarizações. Já a manutenção do influxo de cálcio por tempo mais prolongado, característica da fase tardia, aumenta a transcrição gênica ao promover a atividade de fatores de transcrição como o CREB (ASOK *et al.*, 2019).

Além disso, a associação temporal entre a atividade pré e pós-sináptica pode resultar numa sincronização da atividade neural, induzindo um mecanismo conhecido como “*spike timing-dependent plasticity*”, ou seja, a plasticidade dependente de uma temporização precisa da atividade em uma rede neural. Conseqüentemente, a comunicação entre os substratos passa a ser facilitada (FELDMAN, 2012).

Com a formação do novo engrama e a reorganização que o processo de aquisição promove no sistema, é necessário atingir novamente uma certa estabilidade para que as alterações na conectividade celular se estabeleçam e o conteúdo da nova memória não se altere expressivamente (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021; DUDAI, 2004). Isto ocorre durante a fase denominada consolidação, que vem sendo estudada desde o início do século 20 no ramo da psicologia. Utilizando testes com sequências de sílabas, Müller e Pilzecker, pioneiros do estudo da consolidação, perceberam que o desempenho dos voluntários era superior quando havia um intervalo entre o treino e o teste. A partir dessa observação, inferiram que a formação da memória não era um processo instantâneo e que, após sua aquisição, a memória passa por um processo de estabilização denominado “*consolidirung*” (LECHNER; SQUIRE; BYRNE, 1999; RUNYAN; MOORE; DASH, 2019).

De fato a formação da memória não é instantânea, a consolidação dura de horas a anos e, na verdade, é um processo quase contínuo, uma vez que as memórias que adquirimos estão sempre sendo atualizadas por meio de outro processo, descrito mais recentemente, denominado reconsolidação (ROEDIGER; DUDAI; FITZPATRICK, 2007). Entretanto, cabe aqui uma divisão entre a etapa que promove uma estabilização inicial, mais curta, e a consolidação sistêmica, um processo paralelo e que depende da comunicação entre estruturas corticais e subcorticais (KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013). Como as duas etapas se sobrepõem no tempo, é difícil separá-las de forma precisa, principalmente no que se refere às fases mais distantes do momento da aquisição, como a consolidação tardia.

A fase inicial, ou consolidação celular, dura apenas algumas horas após a aquisição e envolve mecanismos de plasticidade celular que resultam em um aumento da eficiência sináptica (ASOK *et al.*, 2019). O aumento pode ocorrer tanto em nível funcional, através de alterações na atividade e limiar de ativação celular, como na excitabilidade intrínseca, quanto em nível estrutural, no qual há uma alteração na estrutura celular e sináptica, como na sinaptogênese (YOUSUF *et al.*, 2020). Durante essa etapa da consolidação, a memória pode ser manipulada ou interrompida por diferentes fatores, como drogas que alteram a síntese proteica e de mRNAs ou interferência causada por outras memórias (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; OSORIO-GÓMEZ *et al.*, 2019; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2019).

Muito do que se tem na literatura sobre a consolidação celular se sobrepõe aos mecanismos da LTP, uma vez que esse é o tipo de plasticidade mais estudado. Assim como na LTP, essa etapa depende do aumento de cálcio intracelular e da modulação desse íon sobre proteínas, como cinases e fatores de transcrição, para alterar a atividade celular (ASOK *et al.*, 2019; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; KANDEL, 2001). Desse modo, é comum que os mecanismos de plasticidade sejam estudados através de *immediate early genes* (IEGs), categoria de genes ativados rapidamente em resposta à atividade sináptica (FRANKLAND *et al.*, 2006; GALLO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019; RICHARDSON *et al.*, 1992) (Maiores detalhes no item 1.3 desta introdução.)

Já o processo de consolidação sistêmica pode levar de horas a meses, envolve a integração entre diferentes substratos e resulta em memórias de longa duração (LTM). As LTM podem ainda ser divididas em recentes e remotas, entretanto a diferença temporal precisa entre essas duas formas de LTM depende da escala temporal utilizada. Em humanos, pode-se considerar que LTM recentes duram de semanas a meses, enquanto LTM remotas duram de meses a anos, podendo persistir por toda vida do indivíduo (ROESLER; MCGAUGH, 2019).

Por muito tempo, o modelo predominante de consolidação entendia a fase sistêmica como subsequente à consolidação celular, e que a estabilização do traço de memória seria mediada pela atividade de estruturas subcorticais pelo tempo necessário para amadurecer o engrama cortical, limitando a participação do córtex em fases iniciais da consolidação (FRANKLAND *et al.*, 2004; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). Atualmente, existem dados conflitantes na literatura sobre a extensão da influência de estruturas como o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (mPFC) nas fases de formação da memória, há, inclusive, trabalhos indicando que o mPFC pode ser importante desde a aquisição e que o hipocampo pode fazer parte da evocação de memórias remotas (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001; BLUM; HEBERT; DASH, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2013; KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019; VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006). Entretanto, a noção de que a comunicação entre estruturas corticais e subcorticais defini a manutenção ou não do traço de memória é mais consensual, e existem hipóteses que atribuem ao sono um papel importante nessa comunicação (KORTE; SCHMITZ, 2016; SIAPAS; WILSON, 1998; WALKER; STICKGOLD, 2004)

Apesar das variações na literatura, em tarefas comportamentais como as de condicionamento ao medo, a atuação hipocampal parece se tornar menos expressiva com o passar do tempo, e o processamento remoto acaba sendo sustentado, majoritariamente, pela atividade de estruturas corticais (KITAMURA *et al.*, 2017; SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019). Uma ideia central na defesa da corticalização de memórias remotas é a de que o engrama do córtex é mais estável. Entretanto, mesmo durante a consolidação sistêmica o traço de memória pode ser reativado, ou até mesmo evocado, por pistas ambientais, mas existem janelas temporais onde essa reativação ocorre naturalmente, por motivos que ainda não estão claros. Durante essas janelas específicas, o traço se torna novamente sensível à manipulações e pode ser alterado (KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018).

Uma dessas janelas acontece 12 horas após a aquisição, durante uma fase mais tardia da consolidação, e parece concentrar eventos celulares importantes que irão definir a estabilidade do traço de memória em tempos remotos (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; KATCHE *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2019). O bloqueio de síntese proteica no hipocampo neste momento leva ao prejuízo na evocação de memórias 7 dias após a aquisição, mas não interfere na expressão comportamental quando o teste é realizado apenas 2 dias depois do treino, o que mostra que a aquisição e as fases iniciais da consolidação ocorreram normalmente, apenas a retenção prolongada foi prejudicada (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007). Essa janela também parece ser importante durante a consolidação tardia de memórias de medo na amígdala (AMI) e no córtex pré-frontal medial (mPFC). O bloqueio da expressão de Arc, um IEG, na AMI 12 horas após a aquisição prejudica a memória 7 dias depois, mas não 2 dias (NAKAYAMA *et al.*, 2016). O bloqueio da síntese de proteínas *de novo* no mPFC afetou de forma antagônica a expressão de medo em animais submetidos a treinos com diferentes relevâncias emocionais (PEREIRA *et al.*, 2019)

Uma vez que adquirimos um novo traço de memória e ele consegue se sustentar através dos processos de consolidação, podemos evocar esta memória quando expostos novamente a uma situação semelhante à aquisição. A partir dessa interação que ocorre entre o ambiente e o traço de memória, pode haver uma reativação e, conseqüentemente, uma alteração comportamental resultante da atividade do engrama, produzindo um fenômeno — descrito por Richard Semon no

início do século 20 — conhecido como *ecforia* (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; SCHACTER; EICH; TULVING, 1978).

Existe ainda um outro destino possível para as memórias, o esquecimento. Esse mecanismo é tão importante para o bom funcionamento da memória quanto os outros já mencionados, visto que diariamente somos expostos a múltiplos estímulos e experiências que resultam em alterações plásticas e na formação de traços de memória. Como nem todos serão úteis, se faz necessário um mecanismo para contrabalançar os processos de aquisição e consolidação (DAVIS, RONALD L.; ZHONG, 2017; DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021; DUDAI, 2004). Apesar disso, o interesse sobre como esquecemos surgiu entre os pesquisadores do campo da neurobiologia bem depois do interesse por outras fases da formação da memória, e, por limitações metodológicas, a literatura sobre o tema se baseou por muito tempo basicamente em dados comportamentais (DAVIS, RONALD L.; ZHONG, 2017).

Uma hipótese ainda incipiente sobre o esquecimento levanta a possibilidade de mecanismos intrínsecos pró-esquecimento. Em um primeiro momento pode ser tentador imaginar o esquecimento como consequência passiva de uma consolidação mal sucedida, entretanto, a importância que o esquecimento tem na manutenção da homeostase, sugere que ele lance mão de estratégias ativas e mais eficientes. Um dos alvos moleculares mais interessantes para estudos na área, a proteína Rac-1, identificada inicialmente em estudos em *Drosophilas*, foi vinculada à facilitação do esquecimento em diferentes tarefas comportamentais. Ela atua via mecanismos de alteração da plasticidade celular, como o remodelamento de actinas (GAO *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; OH *et al.*, 2010; SHUAI *et al.*, 2011; TEJADA-SIMON, 2015). É interessante ressaltar que sua expressão é concomitante a diferentes proteínas envolvidas na consolidação celular, indicando que, desde sua formação, a persistência de uma memória é resultado do balanço entre consolidação e esquecimento (SHUAI *et al.*, 2010). A atuação conjunta desses dois mecanismos possibilita as mudanças na comunicação entre estruturas observada durante a consolidação sistêmica (RICHARDS; FRANKLAND, 2017).

Ao longo deste trabalho, memórias com destinos diferentes serão comparadas, visando entender melhor como a dinâmica entre o mPFC e a AMI varia entre a consolidação e o esquecimento.

1.2. Memória de medo e seus substratos neurais

O medo é um mecanismo de defesa inato, evolutivamente bem preservado, desencadeado por estímulos que representam perigo. Enquanto alguns estímulos desencadeiam naturalmente uma resposta defensiva, outros podem ser aprendidos de forma rápida e duradoura. Esse aprendizado permite que os seres vivos se adaptem às contínuas mudanças impostas pelo ambiente (KIM; JUNG, 2006).

Um dos protocolos mais usados para o estudo do medo, o condicionamento clássico ou Pavloviano, associa estímulos de natureza neutra (como estímulos olfativos, sonoros ou visuais) à estímulos capazes de evocar respostas inatas ou reflexas (BLANCHARD, ROBERT J.; FUKUNAGA; BLANCHARD, 1976; FANSELOW, 1980). Para tanto, as respostas condicionadas são estabelecidas através de apresentações de estímulos incondicionados (US) pareados à ocorrência de estímulos condicionados (CS). Esse processo de associação de estímulos caracteriza a base da aprendizagem associativa. (BARON, 1959; HOLLAND, 1977).

No condicionamento clássico ao medo, um estímulo sensorial neutro é apresentado pareado a um estímulo aversivo. Esse estímulo aversivo, por sua vez, ativa de forma reflexa respostas incondicionadas, inatas, de fuga ou luta (RESCORLA, 1968; WATSON; RAYNER, 1920). Após um ou vários pareamentos entre os estímulos, uma robusta memória associativa é criada, tornando o estímulo, inicialmente inócuo, um estímulo condicionado, capaz de desencadear as mesmas respostas reflexas que tipicamente ocorreriam na presença do perigo (KIM; JUNG, 2006).

Paradigmas de condicionamento clássico ao medo tipicamente utilizam pequenos animais (ratos, camundongos ou coelhos) como sujeitos experimentais. Em contingências bem controladas, o pareamento temporal entre estímulos condicionados (contexto, luz ou som) à estímulos incondicionados (choque na pata) gera robustas respostas condicionadas (KIM; JUNG, 2006; LEDOUX, 2003). Esses paradigmas são excelentes ferramentas para o estudo das interações entre as redes neurais (GONZALEZ *et al.*, 2013; KITAMURA *et al.*, 2017; LIKHTIK *et al.*, 2014; MCGARRY; CARTER, 2017). Essas interações são, em geral, plásticas, duradouras e facilmente analisadas através de respostas comportamentais estereotipadas, como

o congelamento (*Freezing*) (BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, 1972; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, 1969; BOUTON; BOLLES, 1979; FANSELOW, 1980) ou por técnicas mais refinadas como imunohistoquímica/fluorescência e eletrofisiologia (JONES *et al.*, 2001; ROGAN; LEDOUX, 1996; ROGAN; STÄUBLI; LEDOUX, 1997).

A partir de um protocolo relativamente simples é possível fazer vários ajustes, como intensidade do US e modalidade do CS, para induzir respostas comportamentais por longos períodos de tempo (KOL *et al.*, [S.d.]; SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019). Dentre as variações, o protocolo de medo condicionado ao contexto (MCC) é um dos mais bem estabelecidos para estudo da memória e já vem sendo usado há cerca de 50 anos. Nesse protocolo o CS é o contexto (composto por um conjunto de estímulos visuais, táteis e olfativos) e o US, um choque nas patas do animal (BLANCHARD, ROBERT J.; FUKUNAGA; BLANCHARD, 1976; CHAAYA *et al.*, 2019; ROY *et al.*, 2017). Durante o condicionamento esses estímulos são pareados através da atividade da amígdala (AMI) (WOLFF *et al.*, 2014).

1.2.1. Complexo amigdalóide

O processamento da memória de medo envolve diferentes estruturas, mas a associação dos estímulos CS e US, ocorre tipicamente na AMI (BAROT *et al.*, 2009). A AMI é um substrato subcortical encontrado rostralmente ao hipocampo, no lobo temporal medial (DAVIS, M.; WHALEN, 2001; WHALEN; PHELPS, 2009).

A amígdala é uma estrutura com características polimodais, onde ocorre grande fluxo de informações sensoriais, e que recebe inúmeras projeções corticais e subcorticais (LEDOUX, 2007). Essa estrutura, por sua vez, é composta de diferentes regiões com funções definidas na aquisição, expressão e extinção do MCC. Dentre elas, a porção lateral (LA) é a responsável pela associação CS-US, mas a saída de estímulos para outros núcleos e regiões do sistema nervoso depende da comunicação entre a LA e a porção basal (BA), de onde saem as projeções dos neurônios principais (NP). Por essa comunicação íntima as duas regiões são comumente referidas em conjunto, como complexo basolateral (BLA) (DUVARCI; PARE, 2014; WOLFF *et al.*, 2014).

Em condições basais, a BLA tem sua atividade intensamente regulada por um tônus GABAérgico, resultante da atividade de diferentes populações de

interneurônios (KASUGAI *et al.*, 2019; POLEPALLI; GOOCH; SAH, 2020). Os interneurônios responsáveis por esse tônus inibitório podem ser diferenciados por sua expressão de diferentes peptídeos, são exemplos os neurônios parvalbumina positivos (PV) e os neurônios somatostatina positivos (SOM). Ambas as populações atuam inibindo os NPs, os PV concentrando suas projeções na região perissomática, enquanto os SOM regulam a atividade de dendritos dos NPs. Além disso, os neurônios PV também atuam modulando os neurônios SOM.

Essas duas populações têm papéis distintos na aquisição de medo condicionado e possuem um fino balanço ativação/inibição, alterado pela apresentação do CS e do US. Durante a apresentação do CS, os neurônios PV estão ativos e inibem a atividade dos NPs, assim como inibem os SOM. A inibição dos neurônios SOM possibilita a entrada sensorial na BLA, através da conexão entre estruturas responsáveis pelo processamento sensorial e os NPs. Entretanto, durante a apresentação do US, ocorre uma mudança nessa dinâmica. O choque inibe a atividade dos interneurônios PV que, por sua vez, deixam de inibir os NPs, que aumentam sua atividade. Dessa forma, o balanço entre a atividade dos neurônios PV e SOM modula a entrada sensorial na BLA e a resposta dos NPs durante o condicionamento. A convergência de estímulos durante o condicionamento promove a integração do CS-US na AMI o que, ao promover um aumento na atividade dos NPs, eleva o tônus glutamatérgico, resultando em plasticidade mediada por uma LTP dependente de receptores NMDA (GOOSENS; MAREN, 2004).

Além da BLA, é importante destacar ainda os papéis das células intercalares (ITC) e do núcleo central (CE) da amígdala no circuito da memória de medo. O CE é a principal via de saída da AMI, projetando-se para regiões como hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e tronco encefálico (VIVIANI *et al.*, 2011). Composta principalmente por neurônios GABAérgicos, a CE pode ainda ser dividida entre as porções medial e lateral (DUVARCI; PARE, 2014). O condicionamento, assim como no complexo BLA, resulta em mudanças na dinâmica da CE. Durante a apresentação do CS, os NPs modulam a atividade das células ON e OFF da CE lateral, estimulando e/ou inibindo sua atividade. As células ON ao serem ativadas também contribuem para a inibição das células OFF. Uma vez inibidas, as células OFF deixam de inibir a atividade da CE medial (CIOCCHI *et al.*, 2010). Essa desinibição da CE medial promove um aumento da atividade das projeções inibitórias

em direção a substância cinzenta periaquedutal (PAG). A partir dessa inibição, ocorre um aumento da expressão de comportamento de congelamento e da analgesia (SUN, YING *et al.*, 2019).

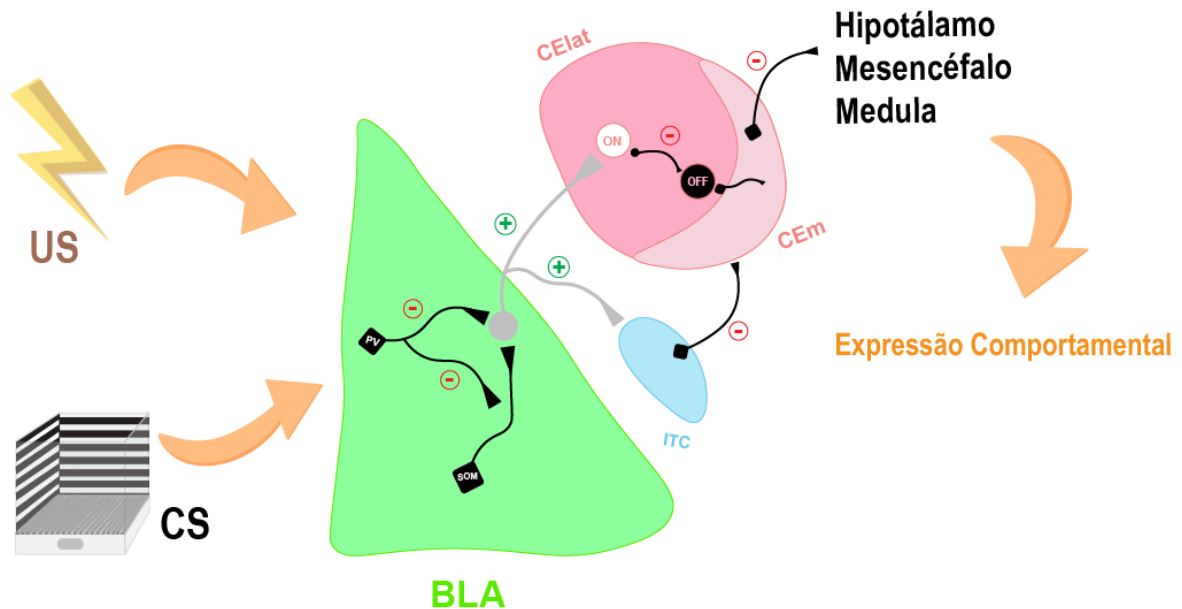


Figura 1.1 - Circuito da amígdala para aquisição do medo condicionado ao contexto. O processamento simultâneo na BLA do CS e do US promove um aumento da atividade dos interneurônios (neurônios pretos) PV, o que aumenta o tônus inibitório nos neurônios principais (célula cinza) e inibe os interneurônios SOM. A inibição da atividade dos SOM aumenta a excitabilidade dos neurônios principais que estimulam tanto as ITC quanto as células ON na CElat. As células ON atuam sobre as células OFF, reduzindo a inibição da CEm, o que aumenta o tônus inibitório em suas projeções, levando à expressão comportamental. CS - estímulo condicionado, US - estímulo incondicionado, BLA - amígdala basolateral, PV - neurônios parvalbumina positivos, SOM - neurônios somatostatina positivos, ITC - células intercaladas, CElat - amígdala central lateral, CEm - amígdala central medial, ON - neurônios on, OFF - neurônios off.

As ITCs são outra peça importante no complexo amigdalóide. Essas células são agrupamentos de neurônios GABAérgicos, que podem ser divididos em duas porções: ITCs mediais e laterais. As ITCs mediais localizam-se entre a BLA e a CE e podem ainda ser subdivididas em porção dorsal e ventral, sendo as responsáveis pela inibição da CE. Já as ITCs laterais realizam a inibição da BLA (JÜNGLING *et al.*, 2008).

Uma vez destacadas as diferentes peças envolvidas na indução da resposta de medo, o processo fica mais claro quando visto de forma linear. A condução do US até a BLA ativa os neurônios PV que, por sua vez, inibem os interneurônios SOM. Conseqüentemente, os NPs da BLA passam a receber estímulos vindos de áreas

sensoriais e se despolarizam, ativando as células ON na amígdala central lateral. Essas células são interneurônios inibitórios e modulam a atividade da amígdala central medial ao inibir as projeções das células OFF para a CE medial. Uma vez que a CE medial está ativa, suas projeções GABAérgicas para estruturas, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), levam à expressão de respostas de medo condicionado (Figura 1.1).

Mais que um papel na aquisição, a BLA tem também funções na consolidação e evocação de memórias de medo. O aumento na expressão de Arc, um IEG, na BLA, 12 horas após o treino, é importante para a manutenção prolongada da memória de medo (NAKAYAMA *et al.*, 2016; OU; YEH; GEAN, 2010), indicando que a atividade dessa região tem um papel importante nas fases mais tardias da consolidação. Além dos circuitos internos da amígdala, as projeções da BLA para outras regiões também são importantes, a comunicação entre esta região e o córtex pré-frontal medial é fundamental para o funcionamento de processos como a consolidação e a extinção das memórias de medo (KLAVIR *et al.*, 2017).

Alguns trabalhos afirmam que a amígdala possui um perfil mais amplo, sendo importante não só para o processamento de informações em situações aversivas, mas também para tomadas gerais de decisão e processamento de aspectos recompensatórios de eventos (BEYELER *et al.*, 2018; SANDER; GRAFMAN; ZALLA, 2003). Em virtude do amplo espectro de estímulos e eventos de diferentes valências, cujo processamento ocorre na amígdala, sugere-se que essa estrutura funciona como um detector de relevância. Sendo assim, a amígdala é uma peça importante durante a formação de memórias de medo, uma vez que a relevância atribuída aos estímulos pode alterar a forma como são percebidas e processadas informações associadas a ele (DAVIS, M.; WHALEN, 2001).

1.2.2. Córtex Pré-Frontal

Na regulação da emoção, o Córtex Pré-Frontal é reconhecido como um dos principais substratos que modula a resposta comportamental em processos complexos de tomadas de decisão. Esta modulação protege frágeis representações neurais de interferências causadas por distrações tanto externas quanto internas (BECHARA; DAMASIO; DAMASIO, 2000; COURTIN *et al.*, 2013).

As características funcionais mais estudadas do pré-frontal dizem respeito ao reconhecimento e a discriminação de contingências pré estabelecidas (BECHARA; DAMASIO; DAMASIO, 2000; HATA; OKAICHI, 2004; ZELINSKI *et al.*, 2010), junto a inibição de respostas comportamentais que não são mais consideradas relevantes (LIKHTIK *et al.*, 2005; MILAD; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2004; MORGAN, M. A.; LEDOUX, 1995; MORGAN, MARIA A.; SCHULKIN; LEDOUX, 2003; MOSCARELLO; LEDOUX, 2013; QUIRK *et al.*, 2003). Este reconhecimento é fundamental em processos preditivos inibindo ações inadequadas e auxiliando operações definidas como relevantes (LIKHTIK *et al.*, 2014).

Em termos anatômicos o mPFC corresponde à metade rostral do Córtex Frontal, sendo formado pelas áreas lateral, medial e orbital, anteriores ao Córtex Pré-Motor (Barbas, 1995). Em roedores, esta região consiste de quatro subdivisões principais: Agranular (Pré-Central) Medial (AGm), Cingulado Anterior (AC) (subdividido em dorsal e ventral), Córtex Pré-Límbico (PL) e Córtex Infra-Límbico (IL). Enquanto as subdivisões mais dorsais, AGm e AC, estão mais relacionadas a comportamentos motores, as regiões ventrais, PL e IL, são associadas a respostas emocionais e cognitivas (UYLINGS *et al.*, 2003; VERTES, 2004). Boa parte dos trabalhos vincula principalmente a atividade das regiões PL e IL ao processamento da memória de medo. Em duas publicações clássicas sobre o assunto, lesões na porção mais ventral do mPFC, da qual faz parte o IL e a parte mais ventral do PL, interferiram na extinção de memórias de medo em ratos (MORGAN; ROMANSKI; LEDOUX, 1993). Por outro lado, lesões na porção mais dorsal, que contém o PL e o córtex cingulado, resultaram em um aumento na expressão das respostas de medo no grupo lesionado e um aumento no tempo necessário para extinguir a memória de medo. Quando comparados diretamente, os animais com lesão dorsal expressaram níveis de congelamento mais elevados do que aqueles com lesão ventral, entretanto, apesar dos papéis antagônicos no processo de extinção que são classicamente atribuídos ao PL e IL, ambas as lesões resultaram em um prejuízo na extinção de memórias de medo condicionado ao som (MORGAN; LEDOUX, 1995). Em um trabalho mais recente, as projeções da BLA para o PL e IL foram temporariamente inibidas através de uma estimulação de alta frequência. A inibição da via BLA-PL resultou prejuízos tanto na formação quanto na extinção, enquanto na via BLA-IL a

duração da memória de medo fica prejudicada e a extinção facilitada, indicando que projeções aferentes podem alterar a atividade dessas regiões (KLAVIR *et al.*, 2017).

Ao contrário do que se pensava, o mPFC também parece ser fundamental na evocação de memórias de longa duração, uma vez que a inibição de síntese proteica nessa região alguns minutos antes do teste interfere negativamente na expressão de respostas de medo (BLUM; HEBERT; DASH, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2013). Por outro lado, memórias de curta duração, testadas 90 minutos após o treino, não são afetadas pelo tratamento (GONZALEZ *et al.*, 2013). E, além do PL e IL, o AC também parece ter uma papel no processamento de memórias de medo condicionado (FRANKLAND *et al.*, 2004; KOL *et al.*, 2020).

Projeções corticais eferentes modulam a atividade de vários núcleos amigdalares ao longo das diferentes fases do processamento desta memória. Na BLA, os neurônios glutamatérgicos do córtex comunicam-se com os neurônios principais através de conexões mono sinápticas e, muitas vezes, recíprocas (MCGARRY; CARTER, 2017). Já as conexões com as ITCs e com a CE, aumentam a atividade de neurônios GABAérgicos e reduzem a expressão do comportamento de medo (LEDOUX, 2007). Essas projeções do mPFC para a AMI são importantes na modulação da expressão de medo condicionado (LIKHTIK *et al.*, 2014).

1.2.3. Diferenças sexuais no condicionamento ao medo

Os anos de estudo empregados para elucidar as bases neurobiológicas do comportamento de medo possibilitaram a construção de um entendimento sólido acerca dos processos atuantes nas diferentes fases da formação da memória de medo. Ao longo dos mais de 50 anos nos quais esse paradigma vem sendo empregado, muitas inovações metodológicas foram sendo incorporadas, possibilitando a solução de problemas cada vez mais complexos (KITAMURA *et al.*, 2017; LIKHTIK *et al.*, 2014; SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019; VETERE *et al.*, 2017; YOUSUF *et al.*, 2020). Entretanto, no que se refere à falta de representação de sujeitos experimentais do sexo feminino, problema que atinge diferentes áreas da pesquisa em ciências biológicas, o campo de neurobiologia da memória não é exceção (LEE, 2018; MOGIL, 2020; PRENDERGAST; ONISHI; ZUCKER, 2014). A relutância no uso de fêmeas vem, muitas vezes, justificada pela dificuldade em

controlar as variações do ciclo hormonal, mas essa visão tem sido questionada. Uma revisão sistemática da literatura de dados comportamentais, morfológicos, fisiológicos e moleculares em trabalhos com camundongos machos e fêmeas, produzidos entre os anos 2009 e 2012, não encontrou diferença estatística na maioria das características avaliadas, com os machos apresentando maior variação em alguns pontos, inclusive nos níveis hormonais (PRENDERGAST; ONISHI; ZUCKER, 2014).

Por outro lado, embora não existam variações em todas as características antes imaginadas, parte dos trabalhos sobre memória e aprendizado indica que existem diferenças nos processos por trás da aprendizagem em machos e fêmeas (TRONSON; KEISER, 2019), até mesmo em mecanismos bem conservados como o aprendizado de medo. Em um estudo com protocolo de MCC foi encontrada diferença na expressão de congelamento — os machos apresentaram resposta de medo mais proeminente mesmo após treino com choque de baixa intensidade. Entretanto, quando o protocolo utilizado foi o de medo condicionado ao som (MCS), as diferenças não se repetiram (MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994). Em outro estudo, os machos apresentaram maior retenção da MCC, mas as fêmeas expressaram mais congelamento durante o som no teste de MCS, embora machos e fêmeas tenham sido capazes de recordar do som (GRESACK *et al.*, 2009). Por outro lado, em um experimento de MCC, fêmeas apresentaram resposta de medo mais intensa e prejuízo na discriminação entre o contexto do treino e um contexto neutro. Ainda foi analisada a atividade da BLA durante a evocação e as fêmeas apresentaram maior ativação nesta região em resposta à ambos os contextos (KEISER *et al.*, 2017).

Mesmo quando as diferenças não se traduzem em alterações no desempenho, mecanismos de processamento e estratégias comportamentais diferentes ocorrem em alguns tipos de memória. Foram observadas diferenças comportamentais durante o treino do MCS, com as fêmeas exibindo respostas de fuga mais frequentemente que machos (GRUENE *et al.*, 2015). Além de existir uma diferença no padrão da expressão do comportamento de congelamento ao longo do teste de MCC (WILTGEN *et al.*, 2001).

Essas contradições encontradas na literatura podem ser explicadas por diferenças no protocolo experimental, como o tipo de tarefa, a intensidade do US e número de pareamentos CS-US (MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994; WILTGEN

et al., 2001). De forma geral, no MCC as fêmeas parecem depender de protocolos mais longos ou mais intensos para aquisição da memória de medo.

1.3. Genes de expressão imediata

Os *immediate early genes* (IEGs), ou genes de expressão imediata, são uma categoria de genes, muitos descobertos em pesquisas com células cancerígenas, amplamente utilizados como marcadores de atividade sináptica (GALLO *et al.*, 2018; KHALAF; GRÄFF, 2019; SUKHATME *et al.*, 1988). As proteínas traduzidas a partir dos IEGs promovem a ativação de diferentes vias intracelulares, atuando como fatores de transcrição e modificando a atividade de outras proteínas (GALLO *et al.*, 2018; KHALAF; GRÄFF, 2019; SUKHATME *et al.*, 1988). Podem ser divididos em duas categorias: os reguladores, na qual estão inclusos o Zif268 e o cFos, e os efetores, como o BDNF e o Homer. A primeira categoria altera a síntese proteica de forma indireta através de alvos *downstream*, vinculando sinais extracelulares a alterações mais duradouras da expressão gênica, enquanto a segunda categoria codifica proteínas com funções mais diretas na atividade sináptica (BOZON; DAVIS; LAROCHE, 2002). Este conjunto de características tornam esses genes ferramentas importantes para estudar mecanismos de memória e aprendizado (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; FRITSCH *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2001; SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019), inclusive em humanos (SOLIMAN *et al.*, 2010).

Muitos dos estudos na área da consolidação usam os IEGs como ferramenta para visualização da atividade celular em tempos chave. Nos últimos anos, a expressão de IEGs têm sido associada a optogenética para mapear e controlar a atividade de circuitos importantes para formação de memórias (KITAMURA *et al.*, 2017; REDONDO *et al.*, 2014; ROY *et al.*, 2017). Entretanto, existem resultados contraditórios na literatura sobre quando e onde cada IEG é expresso, é provável que essas variações ocorram em razão da tarefa e protocolo utilizado em cada trabalho, além do que, é possível que a expressão proteica varie entre regiões em uma mesma janela (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; CHAAYA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019; SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019).

Uma das famílias consideradas IEGs é a *early growth response* (*egr*), composta por proteínas que atuam como fatores de transcrição e da qual fazem parte

quatro representantes, entre elas o Zif268 (também conhecido como Egr-1, Krox-24, Zenk, NGF1-A e Tis8), descrito pela primeira vez em 1987 (MILBRANDT, 1987). As proteínas transcritas por esta família gênica são definidas pela presença de proteínas conhecidas como “dedos de zinco” no domínio de ligação ao DNA. Sua ativação depende da indução de cascatas de segundos mensageiros, em geral cinases, resultante da interação entre ligantes e diferentes tipos de receptores, principalmente os glutamatérgicos (CONDORELLI *et al.*, 1994; MURPHY *et al.*, 1991). PKC, MAPK, ERK1 e ERK2 são exemplos de cinases que modulam a atividade Zif268 e, uma vez ativadas, migram para o núcleo e fosforilam fatores de transcrição que se mantêm ligados ao DNA, como CREB, promovendo um aumento da transcrição do gene *egr-1* (Figura 1.2) (HERDEGEN; LEAH, 1998; SUKHATME *et al.*, 1988).

Na área de neurobiologia da memória e do aprendizado, essa proteína desperta interesse pelo aparente envolvimento com processos de plasticidade (IZQUIERDO; N IZQUIERDO, 2004). Foi constatada sua expressão no giro denteado logo após a indução de uma LTP, e que sua expressão estava aumentada em formas mais duradouras da LTP, mesmo quando comparada a outros IEGs (ABRAHAM *et al.*, 1993; RICHARDSON *et al.*, 1992), o que pode indicar uma relação entre essa proteína e a manutenção desse mecanismo de plasticidade. No mesmo período, os primeiros genes com atividade modulada pelo Zif268 no sistema nervoso começaram a ser descritos, alguns exemplos são os genes responsáveis pela expressão das sinapsinas I e II (PETERSOHN *et al.*, 1995; THIEL; SCHOCH; PETERSOHN, 1994), da enzima glutamato desidrogenase (DAS *et al.*, 1993), e de neurofilamentos (POSPELOV; POSPELOVA; JULIEN, 1994).

Em estudos comportamentais com tarefas de memória, o Zif268 foi vinculado a memórias mais duradouras. O aumento na expressão dessa proteína na AMI está relacionado à formação de memórias de medo mais estáveis (HOFFMAN *et al.*, 2015). Animais *knockout* para *Zif268* têm déficits especificamente na consolidação de memórias de longa duração, em diferentes tarefas de memória (JONES *et al.*, 2001). Além dos efeitos na consolidação, durante a evocação de memórias de medo remotas, observa-se um aumento na expressão de Zif268 em diferentes regiões corticais (FRANKLAND *et al.*, 2004), e na AMI ela também já foi vinculada à extinção (WU *et al.*, 2015). Essas características tornam o Zif268 um marcador ideal para o estudo de memórias remotas.

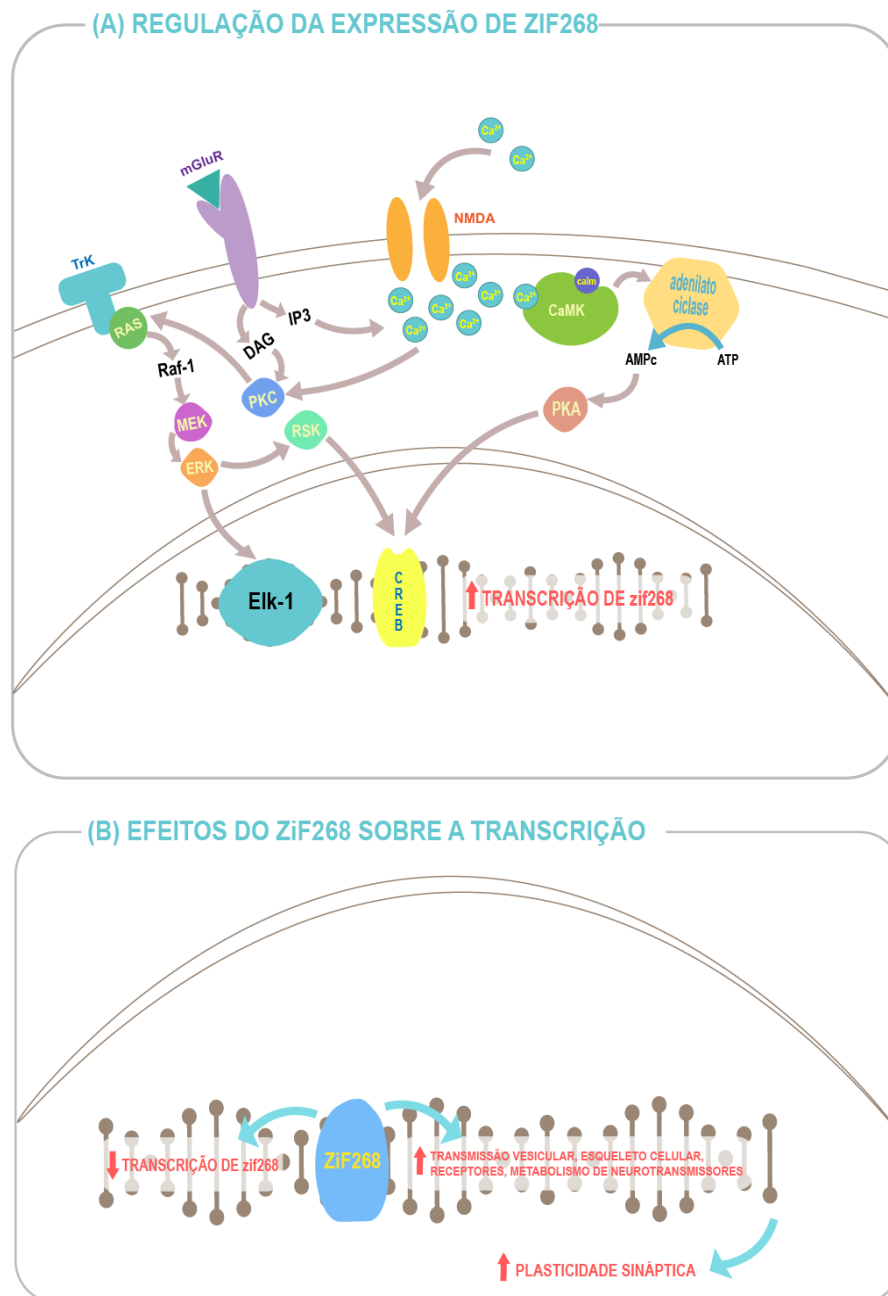


Figura 1.2. Mecanismos intracelulares do Zif268. (A) Exemplos de sinalização intracelular para aumento na expressão de Zif268 mediada pela atividade de receptores glutamatérgicos descritos em Bozon *et al.* (2002) (B) Resultados da atuação do Zif268 sobre a transcrição gênica.

2. JUSTIFICATIVA

Empiricamente todos nós sabemos que algumas memórias duram mais do que outras. Mas quais são os fatores que determinam o destino de uma memória?

As bases neurofisiológicas da memória têm sido desvendadas por meio de estudos que utilizam o paradigma de condicionamento ao medo contextual (FANSELOW, 1980; GULBRANDSEN; SPARKS; SUTHERLAND, 2013; OSORIO-GÓMEZ *et al.*, 2019; ZELIKOWSKY *et al.*, 2014). Algumas horas após a aquisição de uma memória de medo, ocorrem uma série de alterações moleculares já muito bem documentadas. Porém, parece pouco provável que um engrama codificado logo após a aquisição permaneça inalterado, principalmente quando falamos de memórias que duram anos. Logo, a compreensão dos mecanismos tardios, necessários para que uma memória persista ou não por longos períodos, tem sido alvo de investigação nesta área do conhecimento (DUDAI, 2004; KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013).

O córtex pré-frontal medial e a amígdala são áreas cerebrais que contribuem para a formação da memória de medo (BAROT *et al.*, 2009; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; GONZALEZ *et al.*, 2013; PEREZ-VILLALBA; MACKINTOSH; CANALES, 2008; SUN, YING *et al.*, 2019) e para a manutenção do traço de memória por períodos maiores de tempo (FRANKLAND *et al.*, 2006; KOL *et al.*, 2020; ZELIKOWSKY *et al.*, 2014).

Recentemente, demonstramos que a inibição da síntese de RNAs mensageiros no mPFC, realizada 12h após o condicionamento ao medo, além de aumentar o comportamento de medo dos animais 24h e 30 dias após, aumentou a expressão de c-Fos (marcador de atividade neural) nos núcleos basolateral e central da AMI (PEREIRA *et al.*, 2019). Esses resultados sugerem que o mPFC esteja modulando a atividade da AMI durante o processo de consolidação tardia (12h) e que o comprometimento desta modulação, pela inibição da transcrição, exacerba o medo condicionado e a ativação da AMI. Entretanto, apesar de promissores, estes resultados não explicam como o processo de consolidação tardia ocorre em nível fisiológico (na ausência de inibidores de transcrição) bem como não determinam se

este processo difere em se tratando de memórias de durações distintas, ou seja, 24h ou 30 dias.

Políticas de financiamento e publicações científicas vêm, ao longo dos últimos anos, buscando incentivar o uso simultâneo de machos e fêmeas nas pesquisas da área de biológicas. Essas iniciativas visam reduzir a discrepância existente na quantidade de dados de experimentos com fêmeas quando comparados à literatura com dados em machos, assim como melhorar a qualidade das publicações (MOGIL, 2020; TANNENBAUM *et al.*, 2019). Dados na literatura indicam dimorfismo entre homens e mulheres na formação de memórias de medo patológicas (OLFF, 2017), o que sugere diferenças sexuais no processamento de memórias de medo.

Neste trabalho, testamos se machos e fêmeas apresentam resposta comportamental semelhante em um protocolo experimental de medo condicionado ao contexto já padronizado para machos (PEREIRA *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se a carga emocional no momento da aquisição da memória de medo contextual altera a plasticidade da amígdala e do córtex pré-frontal medial na janela temporal de 12h da consolidação sistêmica.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a expressão comportamental de medo em machos e fêmeas, 1 dia e 30 dias, após condicionamento ao medo contextual com baixa (1US) e alta (5US) carga emocional.
- Analisar a expressão de ZIF268 na amígdala e córtex pré-frontal medial durante a janela de 12 horas após o condicionamento ao medo contextual com baixa (1US).
- Analisar a expressão de ZIF268 na amígdala e córtex pré-frontal durante a janela de 12 horas após o condicionamento ao medo contextual com alta (5US) carga emocional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 (Biotério Central da UFMG) com idade entre 8 e 16 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas padrão (no máximo cinco animais por gaiola), dentro de uma estante ventilada, com temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade entre 40-70%. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG: 198/2019).

4.2. Medo condicionado ao contexto

O protocolo de MCC consistiu em uma fase de treino e uma fase de teste (FANSELOW, 1980) e os animais foram expostos à caixa de condicionamento (AMARAL-JÚNIOR et al., 2019) com barras metálicas eletrizadas no assoalho. O aparato comportamental foi posicionado no interior de uma caixa de isolamento acústico (530 x 650 x 500mm), junto a uma câmera superior para o registro da atividade comportamental. O contexto ambiental foi definido com estímulos visuais, que consistiam em três paredes listradas e uma parede preta, e um papel umedecido com álcool 70% foi utilizado como pista olfativa. A caixa foi higienizada com álcool 70% entre cada sessão.

Durante a fase de treino, o grupo controle permaneceu por 120 segundos em livre exploração na caixa de condicionamento, sem receber nenhum estímulo incondicionado. Por sua vez, os animais do grupo experimental, condicionado, permaneceram 120 segundos em livre exploração, seguidos de 1x US ou 5x US (0.7mA) nas patas, com duração 2s. No grupo 5US, cada choque apresentou um intervalo interestímulo de 1 minuto. O animal foi retirado do aparato e retornou para a sua gaiola depois de 30 segundos após o último estímulo.

A fase de teste consistiu na reapresentação do contexto aversivo, 1 dia e 30 dias, após o treino. Os animais foram novamente colocados no aparato comportamental, no mesmo contexto (paredes, assoalho e odor) utilizado na fase de

treino, durante 5 minutos. Durante todas as etapas da tarefa, as fêmeas passaram pelo protocolo somente após os machos.

O comportamento de congelamento, caracterizado pela ausência total de movimentos (com exceção dos movimentos respiratórios), foi quantificado durante os 5 minutos de teste. Para a análise, o tempo total foi dividido em intervalos de 10 segundos e, para cada intervalo, o avaliador indicou se houve a ocorrência de episódios de congelamento (FANSELOW, 1980).

Após o último dia de teste, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg).

4.2.1. Análise de reação ao choque

A análise foi realizada de acordo com a escala de reação ao choque descrita por Nielsen e Crnic (2002) e traduzida na tabela 1. A análise da reação ao choque começou a ser feita simultaneamente ao início da apresentação do US e prosseguiu até um segundo após o final do choque, totalizando 3 segundos de análise para cada pareamento CS-US. Cada comportamento expresso pelo animal foi classificado de acordo com a tabela 1 e foi atribuído a um valor de *score*. Quando mais de um tipo de comportamento era expresso durante a janela de análise, foi considerado apenas aquele de maior *score*. Desta forma, para cada animal 1US foi atribuído um *score* e, para cada animal 5US, 5 *scores*.

Score	Comportamento	Descrição
0	Ausência de comportamento	Atividade normal sem qualquer reação perceptível.
1	Recuo	Mudança abrupta na postura corporal com pelo menos três patas no assoalho, permanecendo no mesmo local.
2	Sobressalto	Pequeno movimento horizontal para frente ou para trás (menos da metade do comprimento da câmara) ou pequeno movimento vertical (menor que a altura do corpo) com pelo menos duas patas restantes no chão.

3	Corrida	Movimento horizontal para a frente (maior que a metade da câmara) com pelo menos duas patas na grade ou movimento coordenado exagerado de patas.
4	Salto horizontal	Movimento horizontal (maior que a metade da câmara) com todas as quatro patas fora da grade em um movimento de mola e altura do corpo ou superior.
5	Salto vertical	Movimento vertical (maior que a altura do corpo) com todas as quatro patas fora do assoalho. O salto vertical foi distinguido do 'sobressalto' (2) pela velocidade e elevação da resposta e do 'salto horizontal' pela elevação vertical.

Tabela 1 - Escala de análise de reação ao choque (NIELSEN; CRNIC, 2002).

4.3. Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados com uma sobredose de xilazina (100mg/kg) e cetamina (100mg/kg) uma hora e meia após o tempo alvo, 12 horas após aquisição, no momento de maior expressão de ZiF268 (GALLO *et al.*, 2018; OU; YEH; GEAN, 2010). Diferente do protocolo anterior, apenas machos foram utilizados na imunofluorescência. Os camundongos tiveram os cérebros coletados após perfusão com 10 ml de tampão fosfato e salina (PBS) 10% (PBS 10%: Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, pH 7,4) e 10 ml de paraformaldeído (PFA) 2% m/v.

Após a perfusão, os cérebros permaneceram 24 horas em PFA 2% m/v, seguida de desidratação em solução de sacarose a 30% m/v. Os cérebros permaneceram na solução de sacarose até serem seccionados em um criostato (CM1850, Leica®). Fatias de 40µm, contendo o mPFC (referência a partir do bregma: AP: 1.54, LL: 0.6, DV: -3.2) e a amígdala (AMI) (referência a partir do bregma: AP: -2, LL: +3.15, DV: -3.4) (PAXINOS e FRANKLIN, 2019) foram obtidas e armazenadas à temperatura de -20°C em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona 1% m/v, PBS 10% e etileno glicol 30% v/v). Para cada animal experimental, foram selecionadas 5 fatias de cada um dos substratos.

As fatias foram posicionadas em placas de 16 poços e inicialmente incubadas com tampão citrato (1,47g de citrato de sódio para 500mL de água, pH=6.0) em uma sequência de diferentes temperaturas em um banho maria. As altas temperaturas às quais as amostras são expostas são importantes para a recuperação do antígeno, uma etapa do protocolo que auxilia na exposição dos epítomos de interesse após o processo de fixação. A incubação iniciou-se a 60°C durante 15 minutos, seguida por 100°C durante 40 s, e retornando a 60°C por mais 15 minutos. Por fim, as fatias permaneceram em temperatura ambiente durante 30 minutos.

Após a incubação com tampão citrato, as fatias foram lavadas com PBS (0,1M pH=7,4) por 3 vezes, cada lavagem com duração de 10 minutos. Em seguida, as fatias foram incubadas por 30 minutos em uma solução de bloqueio, preparada com soro normal de cabra (5% NGS, 0.5% Triton) diluído em PBS (0,1M pH=7,4). Após o bloqueio, o anticorpo primário para anti-EGR1 (IgG de camundongo, monoclonal Sigma®), na concentração de 1:500, foi adicionado em cada poço e as fatias foram incubadas sob agitação, a 4°C, por 24 horas.

Depois da incubação com o anticorpo primário para anti-EGR1, as fatias passaram por 3 lavagens com PBS (0,1M pH=7,4), com duração de 10 minutos cada. Na sequência, seguiu-se a incubação com um anticorpo secundário Alexa Fluor® 568 (IgG anti-camundongo produzido em cabra, Abcam®) na concentração de 1:500, diluído em solução de bloqueio (5% NGS, 0.5% Triton), sob agitação e protegido da luz, durante 2 horas. Ao fim da incubação com o anticorpo secundário para camundongo, foram realizadas 3 lavagens com PBS (0,1M pH=7,4), com duração de 5 minutos cada.

Em seguida, as fatias foram lavadas rapidamente com água destilada e incubadas com sulfato de cobre (CuSO₄, 1mM) solubilizado em acetato de amônio 50Mm (pH 5.0) por 1 hora. Após a incubação com sulfato de cobre, elas foram mais uma vez lavadas rapidamente com água destilada e incubadas com o Dicloridrato diamidino fenilindol (DAPI) (1:2500).

As fatias foram montadas sobre lâminas de aderência (Superfrost® Plus), utilizando meio de montagem aquoso (Hydromount™ - National Diagnostics). As lâminas foram armazenadas a -20°C e protegidas da luz. Posteriormente, as lâminas precisaram ser remontadas. Para tal, foram submersas em PBS à temperatura

ambiente até que a lamínula se soltasse. O meio foi substituído por Fluoromount-G™ (Thermo Fisher Scientific).

4.3.1. Microscopia

As fatias foram fotografadas em um microscópio de fluorescência (AxioImager M2 – Zeiss system), através do software Carl ZeissAxiovision 4.8. Foram obtidas imagens do mPFC e da AMI em objetivas de 5x e de 20x/0.5, através de dois filtros diferentes, um de excitação 587-625nm/emissão 647-670nm para o Alexa Fluor® 568, e outro de excitação 365nm/emissão 445-450nm para o DAPI. O tempo de exposição para cada filtro foi determinado com base no histograma de saturação de pixels, utilizando o número máximo possível de pixels abaixo do limite de saturação, e mantido constante entre as imagens.

4.3.2. Análise de colocalização e quantificação das células

As análises foram conduzidas com o uso do software FIJI, uma versão atualizada e gratuita do Image-J (SCHINDELIN *et al.*, 2012)(Figura 4.1.). Todas as imagens foram tratadas, utilizando um valor de filtragem fixo, para remover o *background* auto fluorescente. Em seguida, utilizando o *plugin colocalisation threshold* (http://fiji.sc/Colocalization_Threshold) (COSTES *et al.*, 2004) foi obtida uma imagem em 8-bits onde foram destacados todos os objetos colocalizados entre os dois canais (ZiF268+/DAPI) utilizados para captura das fotos. Após a obtenção dessa imagem, foi possível indicar um *threshold* de quantificação dos objetos de interesse, seguido de parâmetros pré-determinados para tamanho (25 a 100 μm^2) e circularidade dos objetos (0-1).

Ao final da análise, foram extraídos a contagem do número de células e o valor da área considerada na análise. Para cada fatia foi calculado o número de células pela área (mm^2) e, para definição do número de células por área de cada animal, foi calculada a média desse valor dentre todas as fatias.

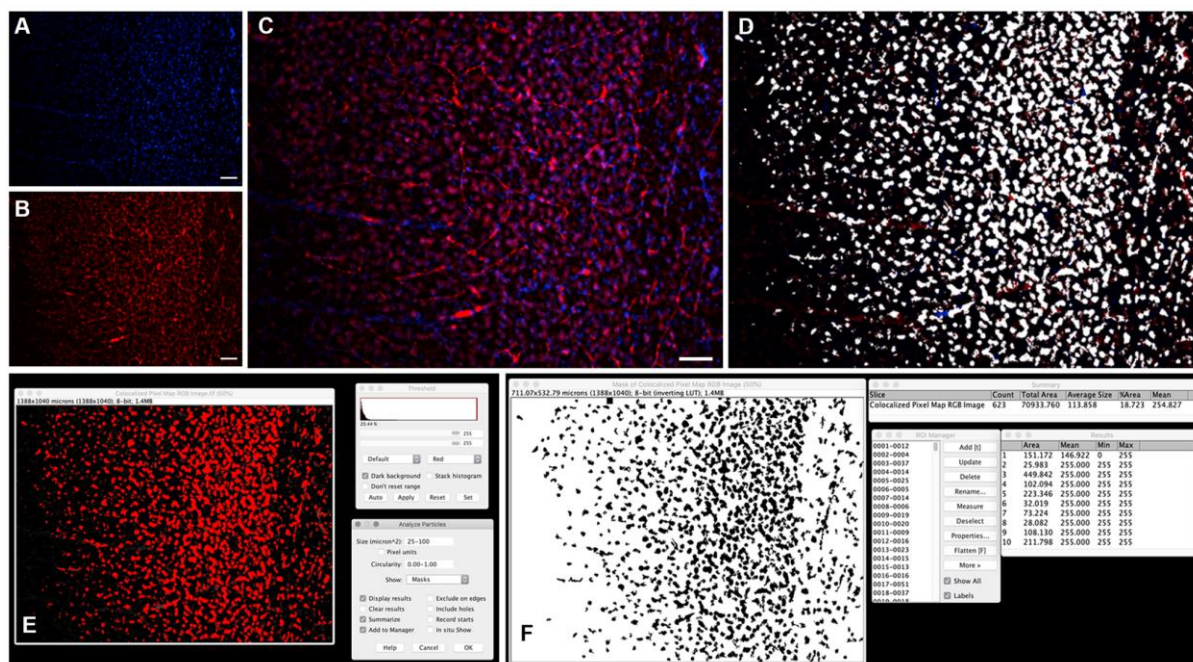


Figura 4.1.- Protocolo de dupla marcação Zif268 / DAPI e análise da imunorreatividade de Zif268. Os painéis acima representam imagens ilustrativas para o Córtex Pré-Límbico (PL). (A) Imagem ilustrativa para a marcação com DAPI. (B) Imagem ilustrativa para a marcação com Zif268. (C) Sobreposição das 2 imagens (composição com os 2 filtros). Amplificação: 20x/0.5. Barra de escala: 50 μm . O número de marcações positivas para Zif268/DAPI foram determinadas pelo *plugin colocalization threshold* do Image-J. (D) Células com marcação colocalizadas e convertidas para 8-bits. (E) *Threshold* de quantificação dos objetos de interesse. (F) Contagem dos objetos entre 25 e 100 μm^2 .

4.4. Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 8. Para a análise do comportamento de congelamento foram realizadas ANOVAs de duas vias, seguida pelo pós teste de Bonferroni, e de três vias, seguida pela análise de Tukey. Para analisar a escala de reação ao choque utilizamos o teste de Mann-Whitney U, um teste não paramétrico usado para comparar grupos independentes quando a variável é ordinal (LAERD STATISTICS, 2013).

Para a análise da expressão de Zif268, o número de células no grupos 1US e 5US foi normalizado em razão do número de células do grupo naive e convertido em porcentagem. Foram utilizados testes t não pareados para comparação entre os grupos, e teste t de amostra única para comparação com a linha de base, tanto nas análises do mPFC, quanto da BLA.

4.5. Desenho experimental

4.5.1. Experimento 1

O protocolo comportamental foi realizado em machos e fêmeas, visando comparar a expressão comportamental nos dois sexos. Os animais foram alocados em três grupos: controle (US-), treino com baixa relevância emocional (1US) e treino com alta relevância emocional (5US) (PEREIRA *et al.*, 2019) (Figura 4.2.). Os animais foram re-expostos à caixa para o teste, 1 e 30 dias após o treino.

A reação dos animais ao choque também foi analisada visando identificar variações na resposta comportamental de machos e fêmeas durante a apresentação do US. Existem dados na literatura que apontam para diferenças no comportamento entre os sexos durante a sessão de treino (GRUENE *et al.*, 2015).

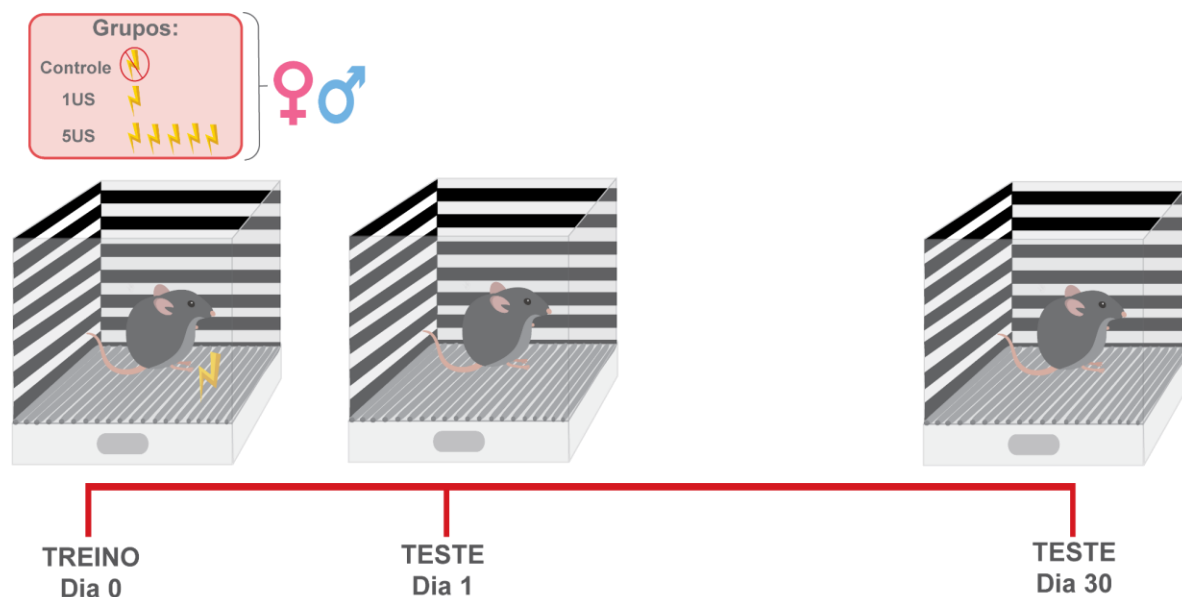


Figura 4.2. Desenho do experimento 1.

4.5.2. Experimento 2

Os animais utilizados no protocolo de imunofluorescência foram distribuídos em três grupos: 1US, 5US, de acordo com o descrito anteriormente, e naive, que não foi exposto à caixa de condicionamento (Figura 4.3.). Diferente do experimento

anterior, os animais foram submetidos apenas ao período de treino, sendo eutanasiados treze horas e meia após o protocolo de condicionamento. O tempo foi escolhido com base na literatura, uma vez que a janela de 12 horas após a aquisição está associada a um aumento de plasticidade e com a persistência de memórias remotas (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013). Durante a análise do mPFC, focamos especificamente nas regiões PL e IL, uma vez que seu papel durante a consolidação de memórias de medo já está mais bem estabelecido (SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019; VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006).

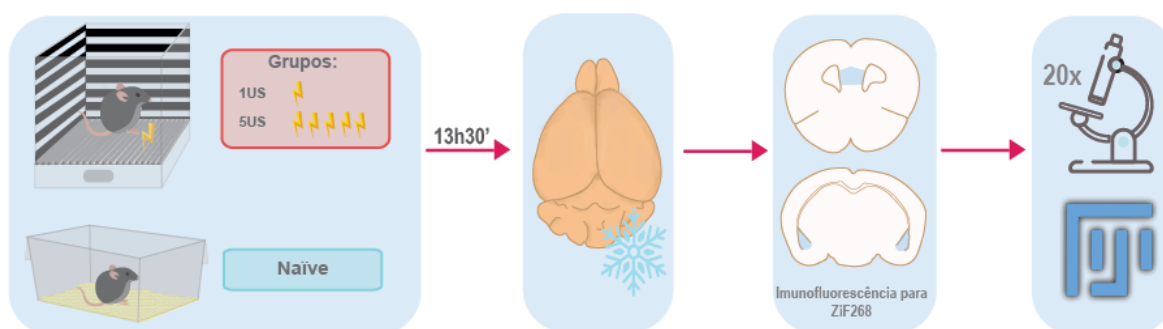


Figura 4.3. Desenho do experimento 2.

5. RESULTADOS

5.1. Em machos, mas não em fêmeas, o condicionamento com 1US é capaz de induzir memória de medo condicionado

Demonstramos previamente que a memória de medo condicionada ao contexto persiste por 30 dias em camundongos C57BL/6 machos submetidos ao condicionamento com 5US, mas não com 1US (Pereira et al., 2019). Neste trabalho, reproduzimos estes resultados e adicionamos um grupo experimental com animais fêmeas.

Foi realizado um teste de ANOVA de duas vias para comparação dos seguintes fatores: tempo (1d vs 30d) e treino (controle, 1US ou 5US) nos machos. Foram encontrados efeitos dos fatores treino ($F_{(2, 17)} = 23,92$; $P < 0,0001$) e sujeitos ($F_{(17, 17)} = 3,096$; $P = 0,0126$), mas não foram encontrados efeitos significativos nos demais fatores (Tempo: $F_{(1, 17)} = 3,117$; $P = 0,0954$; Interação: $F_{(2, 17)} = 0,9989$ $P = 0,3889$).

O teste de comparações múltiplas de Bonferroni encontrou diferenças entre os grupos quando comparados ao controle, com os animais 1US expressando resposta de medo condicionado um dia após o treino (US- vs. 1US: $p = 0,0099$), mas não mais trinta dias depois (US- vs. 1US: $p = 0,2073$) (Figura 5.1). Por outro lado, o grupo 5US, quando comparado ao controle, expressou valores significativos de congelamento nos dois tempos de teste (1d US- vs. 5US: $p < 0,0001$; 30d US- vs. 5US: $p < 0,0001$). Esses resultados reproduzem nossos achados prévios (Pereira et al., 2019).

Além da diferença em relação ao controle, o teste de Bonferroni também identificou diferença estatística entre os grupos 1US e 5US nos dois períodos de teste (1d: $p = 0,0106$; 30d: $p = 0,0058$).

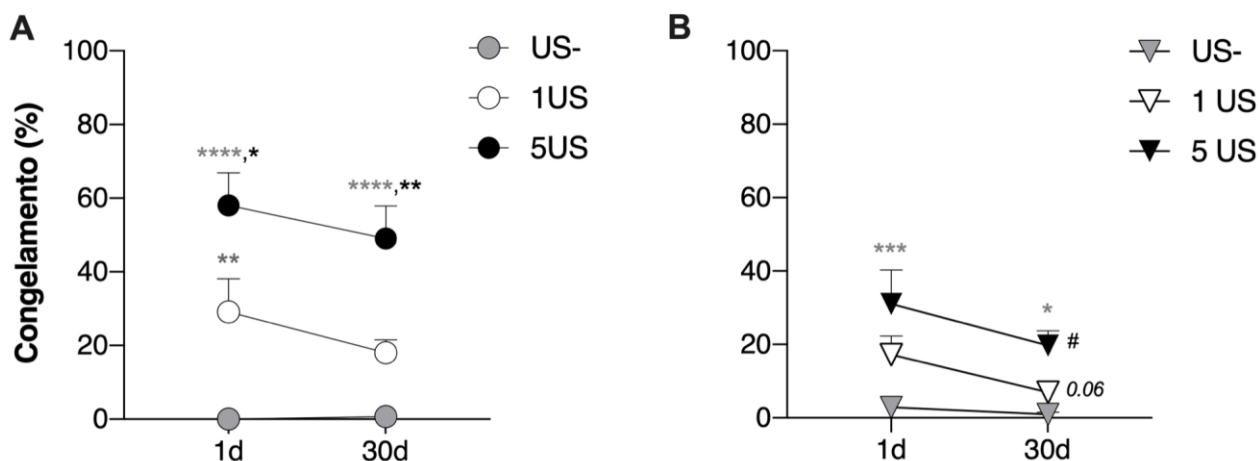


Figura 5.1 - Teste de memória de MCC recente e remota. (A) Comportamento de medo condicionado ao contexto em machos. **(B)** Comportamento de medo condicionado ao contexto em fêmeas (2-way ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Cores referentes às comparações entre grupos; # $p < 0,05$, Comparação entre o dia 1 e o dia 30).

Já em relação às fêmeas, a ANOVA de duas vias identificou diferenças entre os fatores tempo ($F_{(1, 16)} = 11,87$; $P = 0,0033$), treino ($F_{(2, 16)} = 8,510$; $P = 0,0030$) e sujeito ($F_{(16, 16)} = 4,293$; $P = 0,0029$), mas não foi encontrada interação entre os fatores ($F_{(2, 16)} = 1,809$; $P = 0,1957$). No teste de comparações múltiplas de Bonferroni, foi encontrada diferença estatística no grupo 5US, quando comparado ao grupo controle, nos dois tempos de teste (1d: $p = 0,0003$; 30d: $p = 0,0170$), entretanto o pareamento com apenas 1 choque não foi suficiente para induzir uma resposta de medo condicionada em nenhum dos dois tempos (1d: $p = 0,0910$; 30d: $p > 0,9999$) (Figura 5.1.).

Através de uma ANOVA de 3 vias foi possível comparar também os níveis de congelamento entre grupos 1US e 5US (Figura 5.2). O teste examinou os efeitos do sexo (machos e fêmeas), US (1US e 5US) e tempo (1 e 30 dias) Não houve interação significativa entre os 3 fatores ($F_{(1, 1)} = 0.02$; $p = 0.87$). Entretanto, observamos efeito principal do tempo ($F_{(1, 1)} = 6.1$; $p = 0.01$); do sexo ($F_{(1, 1)} = 31.0$; $p < 0.0001$) e do US ($F_{(1, 1)} = 35.9$; $p < 0.0001$). O teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou que um dia após o treino (1d), os animais machos condicionados com 5US apresentam maiores níveis de congelamento em comparação com animais condicionados com 1US (** $p < 0.001$), o que reproduz nossos resultados prévios. Em contrapartida, as fêmeas condicionadas com 5US não mostraram níveis de medo semelhantes aos machos nesta mesma condição ($p < 0.01$). Por fim, 30 dias pós-treino observamos altos

índices de medo nos animais machos condicionados com 5US, mas não em fêmeas submetidas ao mesmo protocolo de condicionamento (## $p < 0.01$).

Em seguida, fizemos uma análise de reação ao choque, através da qual podem ser identificadas diferenças no comportamento dos animais durante o treino (NIELSEN; CRNIC, 2002). O teste de Mann-Whitney não identificou diferença na expressão comportamental de machos e fêmeas 1US ($U=13$, $p=0,63$) (Figura 5.3. A) e 5US ($U=554$, $p=0,47$) (Figura 5.3. B) durante o condicionamento. Na figura 5.3. C, estão representadas as variações nas reações entre machos e fêmeas 5US ao longo dos pareamentos.

Em conjunto, os resultados apresentados na figura 5.2 indicam que para fins de estudo da memória remota através do protocolo utilizado de medo condicionado ao contexto é mais apropriado o uso de machos, e que, para estudos com fêmeas, é necessário um protocolo mais intenso com, por exemplo, mais pareamentos durante a sessão de treino.

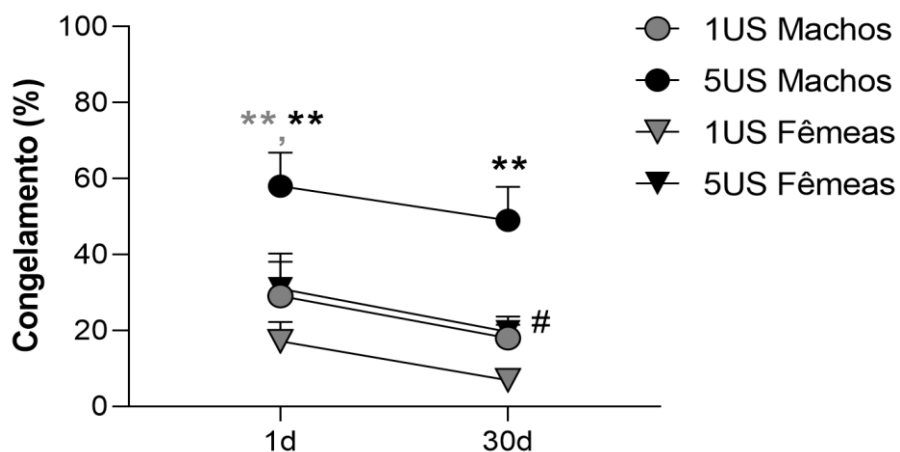


Figura 5.2 - Comparação na expressão de comportamento de congelamento entre os machos e fêmeas dos grupos 1US e 5US. (3-way ANOVA, $**p < 0,001$; Cores referentes às comparações entre grupos. # $p < 0,05$, comparação entre o dia 1 e o dia 30).

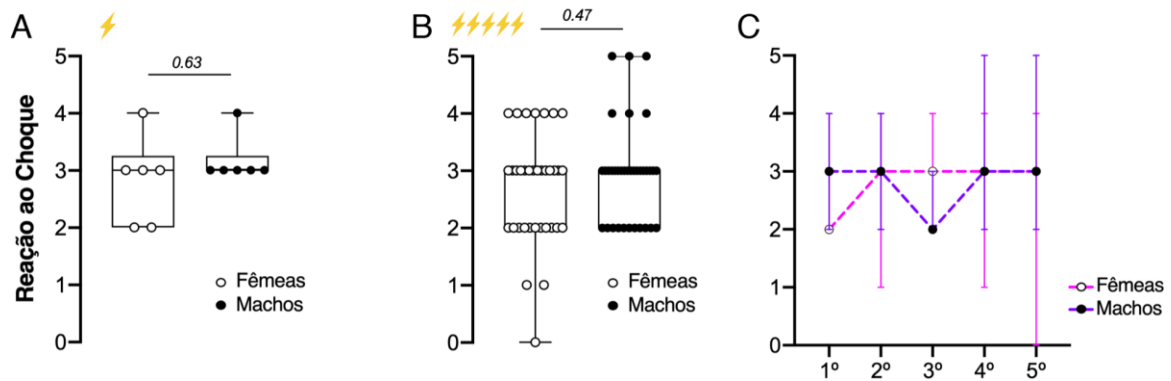


Figura 5.3 - Análise de reação ao choque. (A) Não houve diferença estatística na reação ao choque de machos e fêmeas submetidos ao treino com 1US (Teste Mann-Whitney, $p=0.63$) (B) Também não foram encontradas diferenças entre machos e fêmeas ao treino com 5US. (Teste Mann-Whitney, $p=0.47$). (C) Machos e fêmeas apresentaram comportamento semelhante ao longo das apresentações (Pontos representam a mediana da distribuição em cada apresentação com a respectiva variação entre o valor mínimo e o máximo).

5.2. Expressão diferencial de ZiF268 no mPFC entre os grupos 1US e 5US

Foram comparados os níveis de expressão de ZiF268 durante a consolidação tardia, na janela de 12 horas pós aquisição, entre os grupos 1US, 5US e naive, tanto para mPFC, quanto para a amígdala basolateral (BLA). Os valores apresentados foram normalizados pela média do grupo naive. Visto que, no experimento anterior, nosso protocolo não se revelou um bom modelo para estudo da consolidação de memórias remotas em fêmeas, utilizamos apenas machos durante esta etapa.

O padrão de expressão de ZiF268 no mPFC foi diferente entre os grupos 1US e 5US. Os animais 5US apresentaram uma redução significativa na expressão em relação a linha de base (Teste t de amostra única; $t=3,42$, $df=3$; $p=0,04$). Entre os animais do grupo 1US, houve um aumento não significativo na expressão de ZiF268 em relação à linha de base (Teste t de amostra única; $t=3,05$, $df=3$; $p=0,056$). A variação na expressão de ZiF268 entre os animais dos grupos 1US e 5US apresenta uma diferença significativa (Teste t não pareado; $t=4,45$, $df=6$; $p=0,0041$) (Figura 5.4).

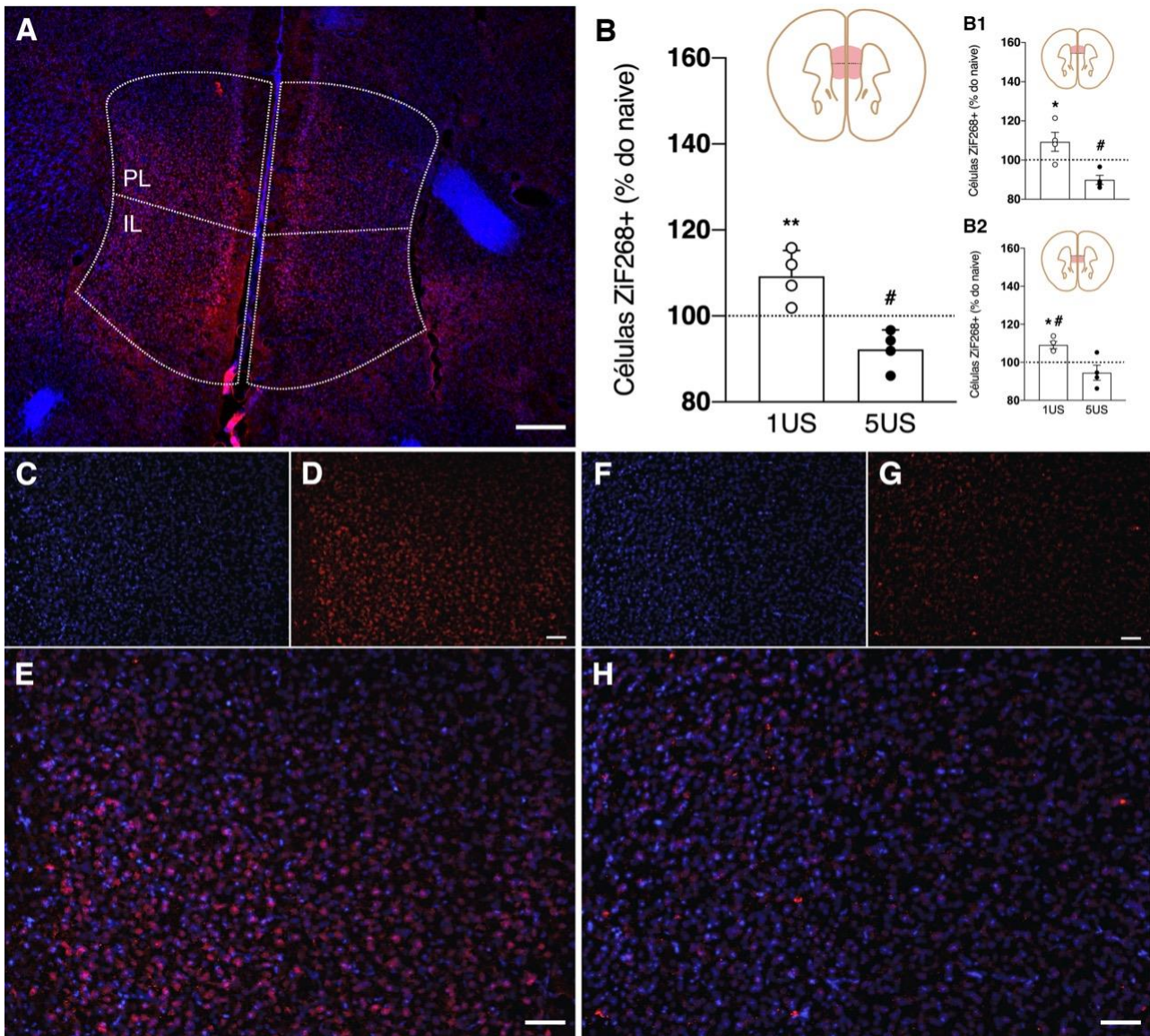


Figura 5.4. Expressão de Zif268 em células do mPFC. (A) Imagem do mPFC (aumento de 5x) indicando a região onde se localizam os córtices PL e IL. Barra de escala: 250 μ m (B) Comparação entre a expressão de Zif268 no mPFC nos animais dos grupos 1US e 5US (Teste t não pareado, ** indica diferença entre os grupos, $p=0.0041$; teste t de amostra única, # indica diferença quando comparado a linha de base, $p=0.0389$). (B1) Comparação entre a expressão de Zif268 no PL nos animais dos grupos 1US e 5US (Teste t não pareado, * indica diferença entre os grupos, $p=0.0112$; teste t de amostra única, # indica diferença quando comparado a linha de base, $p=0.0222$). (B2) Comparação entre a expressão de Zif268 no IL nos animais dos grupos 1US e 5US (Teste t não pareado, * indica diferença entre os grupos, $p=0.0163$; teste t de amostra única, # indica diferença quando comparado a linha de base, $p=0.0182$). (C-E) Interface entre PL e IL. Imagem representativa da imunofluorescência (Aumento de 20x/0.5) para o grupo 1US. Porção superior esquerda: DAPI; porção superior direita: Zif268; abaixo: Composição entre DAPI e Zif268. Barra de escala: 50 μ m. (F-H) Interface entre PL e IL. Imagem representativa da imunofluorescência (Aumento de 20x/0.5) para o grupo 5US. Porção superior esquerda: DAPI; porção superior direita: Zif268; abaixo: Composição entre DAPI e Zif268. Barra de escala: 50 μ m.

Em uma análise mais detalhada, o mPFC foi dividido entre duas porções: pré límbica (PL) e infra límbica (IL), e os grupos 1US e 5US foram comparados nas diferentes regiões através de um teste t não pareado, e comparados a linha de base através dos teste t de amostra única. Nas duas regiões foi identificada uma diferença significativa na expressão de ZIF268 entre os animais dos dois grupos (Teste t não pareado; PL: $t=3,61$, $df=6$; $p=0,011$; IL: $t=3,31$, $df=6$; $p=0,016$) (Figura 5.4 C-D). Além disso, observou-se que no PL, no grupo 5US, a expressão de ZIF268 foi significativamente menor comparado à linha de base (Teste t de amostra única; $t=4,37$, $df=3$; $p=0,02$), já IL o grupo 1US apresentou uma expressão significativamente maior em relação à linha de base (Teste t de amostra única; $t=4,82$, $df=3$; $p=0,017$).

Na BLA houve um aumento significativo na expressão de ZIF268 nos animais 5US quando comparados à linha de base (Teste t de amostra única; $t=3,14$, $df=4$, $p=0,03$), entretanto não houve diferença entre o grupo 1US quando comparado ao grupo 5US (Teste t não pareado; $t=1,0$, $df=8$; $p=0,35$) (Figura 4.5 B).

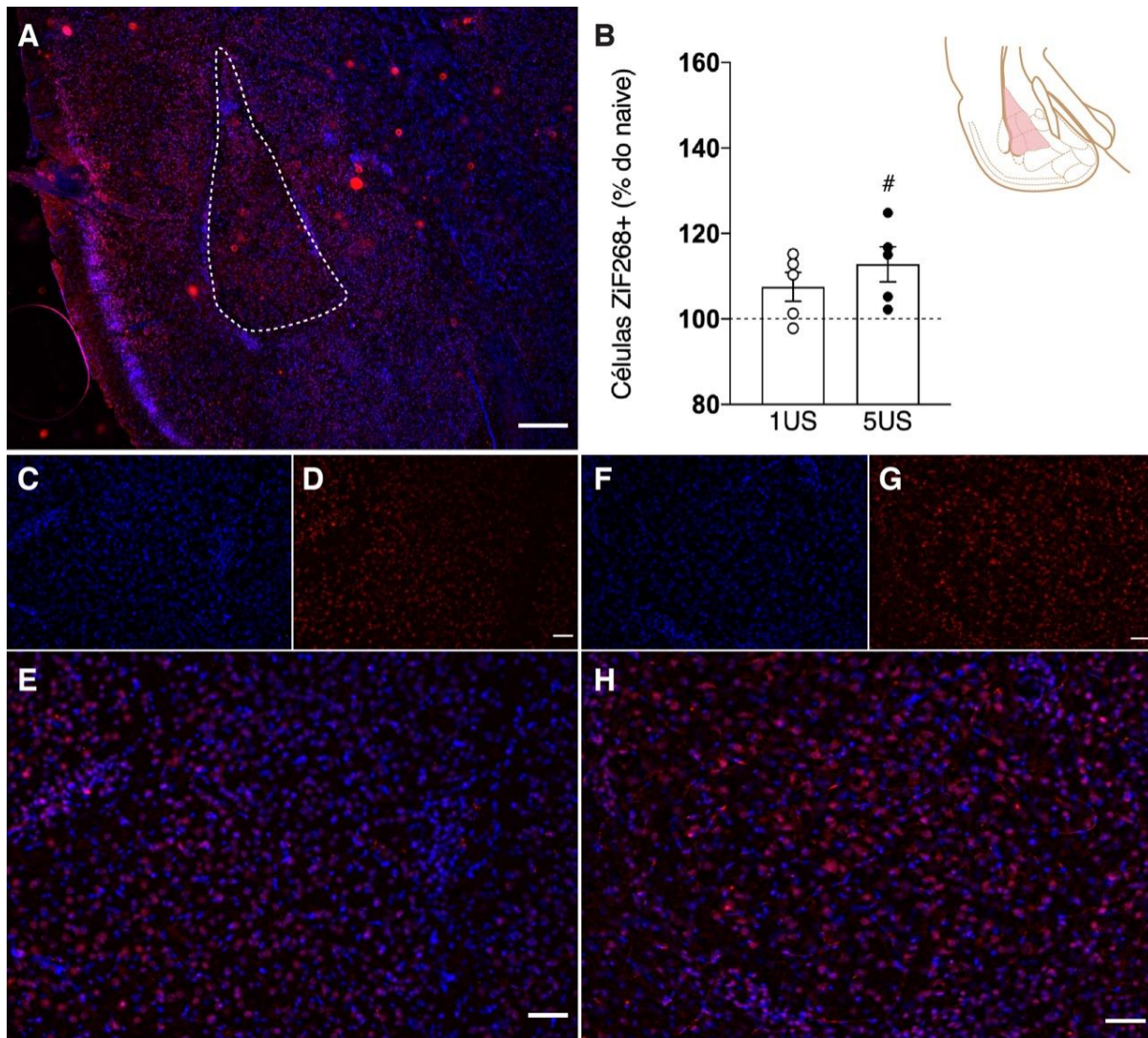


Figura 5.5. Expressão de Zif268 em células da amígdala basolateral. (A) Imagem do córtex temporal inferior com a representação da AMI (aumento de 5x). Barra de escala: 250 μ m. (B) Comparação entre a expressão de Zif268 no AMI nos animais dos grupos 1US e 5US (Teste t de amostra única em relação a linha de base, # indica diferença do naive, $p = 0.03$). (C-E) BLA. Imagem representativa da imunofluorescência (Aumento de 20x/0.5) para o grupo 1US. Porção superior esquerda: DAPI; porção superior direita: Zif268; abaixo: Composição entre DAPI e Zif268. Barra de escala: 50 μ m. (F-H) BLA. Imagem representativa da imunofluorescência (Aumento de 20x/0.5) para o grupo 5US. Porção superior esquerda: DAPI; porção superior direita: Zif268; abaixo: Composição entre DAPI e Zif268. Barra de escala: 50 μ m.

Através da alteração nos níveis de Zif268 é possível verificar que existem diferenças em sua expressão entre os animais que passaram pelos diferentes protocolos experimentais, mas essa diferença se restringiu ao mPFC.

6. DISCUSSÃO

6.1. As diferenças na expressão comportamental em machos e fêmeas não resulta de mudanças comportamentais durante o treino

Os resultados comportamentais neste trabalho indicam que os protocolos de treino com diferentes intensidades (1US e 5US) na tarefa de MCC resultam, nos machos, em memórias de longa duração. Entretanto, nas fêmeas, o treino de menor intensidade falhou em estabelecer uma memória 1 dia e 30 dias depois. Dados na literatura sugerem que existam diferenças entre o desempenho de machos e fêmeas em tarefas de medo condicionado. E outros trabalhos já encontraram diferenças entre machos e fêmeas no MCC, em geral com os machos se saindo melhor nessas tarefas, embora este nem sempre seja o caso (CHEN *et al.*, 2014; GRESACK *et al.*, 2009; KEISER *et al.*, 2017; PRYCE; LEHMANN; FELDON, 1999).

Uma teoria recorrente atribui essas diferenças a variações na percepção e processamento de estímulos sensoriais, e considera que o desempenho inferior das fêmeas resulta de um limiar sensorial mais elevado para percepção de estímulos nociceptivos. Essa visão, entretanto, vem sendo questionada. Uma revisão sistemática da literatura, publicada recentemente, analisou dados qualitativos sobre processamento de dor nos quais os dois sexos eram comparados. Os autores chegaram à conclusão que, embora os dados indiquem para uma diferença entre os sexos, a sensibilidade é maior nas fêmeas, e não o contrário (MOGIL, 2020). Apesar dessa discussão, não encontramos diferenças de reação entre os machos e fêmeas, nem nos animais 1US, nem nos 5US (Figura 5.3. A e B). O que indica que as diferenças observadas na expressão comportamental não estão associadas a variações na sensibilidade.

Esses resultados sugerem que a diferença entre machos e fêmeas no MCC resulta de variações no processamento que não podem ser resumidas apenas à percepção sensorial. Nesta direção existe uma outra teoria recorrente, que sugere que a disparidade na resposta de medo é fruto de diferenças no funcionamento do hipocampo, e que as fêmeas são menos eficientes durante a formação da representação do contexto que ocorre no HIP (MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994). Entretanto, essa visão também vem sendo questionada, à medida que surgem

evidências indicando que as diferenças na expressão de medo podem ser fruto de diferentes estratégias comportamentais, como a estratégia de exploração do contexto (GRUENE *et al.*, 2015; WILTGEN *et al.*, 2001), ou até mesmo nos mecanismos de processamento dessa memória, como assimetrias no recrutamento de diferentes substratos neurais (GRESACK *et al.*, 2009).

A teoria de múltiplos sistemas de aprendizagem, mais atual, sugere que as diferenças entre machos e fêmeas são causadas por diferentes estratégias aplicadas pelos indivíduos de cada sexo durante o aprendizado de memórias de medo (TRONSON; KEISER, 2019). De acordo com essa teoria, é possível que a maior ativação da amígdala observada em fêmeas durante o processamento do medo condicionado, em oposição à maior atividade hipocampal nos machos, seja uma aposta evolutiva para refinar a discriminação dos estímulos pertinentes e evitar o gasto energético para manutenção de memórias pouco relevantes (GRESACK *et al.*, 2009).

Considerando estes fatores, futuros estudos que busquem investigar memórias remotas em fêmeas devem lançar mão de protocolos diferentes. Uma possível solução para testar a hipótese acerca do prejuízo do processamento contextual nas fêmeas seriam tempos mais longos de habituação. Já em a segunda hipótese, sobre uma discriminação de estímulos mais refinada nas fêmeas, poderia ser testada através da tarefa de aprendizado revertido. Durante este protocolo a valência inicialmente atribuída ao CS é revertida, i.e. um animal já treinado para associar o CS a um estímulo aversivo é novamente treinado para associá-lo a uma recompensa (ZHANG; LI, 2018). Outra possibilidade seria utilizar protocolos com mais sessões de pareamento CS-US ou o uso de um US mais forte para os pareamentos (WILTGEN *et al.*, 2001).

6.3. A persistência da memória depende da atividade diferencial no mPFC

Para o protocolo de imunofluorescência escolhemos analisar a janela de 12 horas após a aquisição, pois ela concentra eventos celulares que parecem ser importantes durante consolidação tardia de memórias (KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013). De fato, encontramos uma diferença na expressão de Zif268 entre

os grupos 1US e 5US. No mPFC, ela foi mais intensa entre os animais do grupo 1US, com os animais do grupo 5US apresentando uma redução significativa em relação à linha de base e aos animais do grupo 1US (Figura 5.4.B). Essa diferença indica que a plasticidade no mPFC dos animais 5US pode estar sendo inibida ativamente.

A análise específica do córtex PL encontrou o mesmo padrão de ativação (Figura 5.4. B1), no IL, por outro lado, apenas os animais 1US apresentaram diferença significativa em relação à linha de base, pois houve um aumento de células ZIF268+ nestes animais. Tradicionalmente, o IL é vinculado a um papel em processos de extinção e esquecimento, ao modular a atividade de estruturas como a BLA e a CE (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021; QUIRK; MUELLER, 2008; VERTES, 2004). As regiões corticais apresentam alta concentração de interneurônios, que restringem potenciais excitatórios e modulam a atividade das projeções corticais, compostas pelas ramificações dos NPs, neurônios glutamatérgicos (MCGARRY; CARTER, 2017; SUN, QINGTAO *et al.*, 2019). A expressão de ZIF268 parece estar vinculada principalmente à ativação de receptores com atividade excitatória, sendo exemplos diferentes receptores glutamatérgicos. Nossos dados sugerem que um aumento na expressão de ZIF268 nos NPs pode indicar um aumento de atividade nas projeções IL-AMI.

O PL, por outro lado, é comumente associado à aquisição e persistência da memória de medo (VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006), mas também já foi implicado na aquisição das memórias de extinção (MORGAN, M. A.; LEDOUX, 1995). Assim como o IL, projeta para outras estruturas através dos NPs e também envia projeções recíprocas para a BLA (ORSINI *et al.*, 2011). Os trabalhos em geral parecem indicar que a atividade do PL é importante durante as fases de consolidação e evocação das respostas de medo condicionado, e lesões nessa estrutura resultam em uma expressão aumentada do comportamento de congelamento durante a evocação (MORGAN, M. A.; LEDOUX, 1995).

Em um primeiro momento parece estranho pensar que esteja ocorrendo uma inibição da plasticidade nesta região no 5US, uma vez que suas projeções favorecem a formação da memória de medo. Entretanto, essa região recebe projeções de outras estruturas envolvidas no processamento do medo aprendido, e é possível que esta inibição esteja envolvida com a manutenção da precisão da memória, evitando

processos como a generalização e a formação de memórias de medo patológicas. Resultados anteriores do nosso grupo reforçam a ideia de que a memória formada nos animais 5US não é patológica, e que os animais não a generalizam e conseguem extingui-la (PEREIRA *et al.*, 2019)

Trabalhos que analisaram outros IEGs na janela de 12 horas encontraram aumento no córtex, mas este resultado pode variar (NAKAYAMA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2019). É importante olhar com cuidado o gene utilizado em cada trabalho, pois diferentes IEGs regulam a expressão de mecanismos diferentes de atividade celular. No caso do Zif268, sua expressão parece estar vinculada a um aumento na sinalização sináptica e (GALLO *et al.*, 2018), embora já tenham observado sua expressão aumentada na amígdala e no hipocampo em outras janelas temporais (BAUMGÄRTEL *et al.*, 2008; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007), nenhum trabalho havia analisado antes sua expressão nesse tempo e no mPFC. As particularidades da função que cada IEG exerce na atividade celular ajudam a explicar as variações encontradas na literatura.

Ao encontro dos trabalhos que visualizaram um aumento de Zif268 na amígdala durante a consolidação, também observamos um aumento na expressão na BLA dos animais 5US (Figura 5.5. B). A amígdala tem um papel fundamental na discriminação da relevância de estímulos, e é possível que nesta janela de doze horas, os inputs amigdalares para o córtex mPFC estejam fornecendo as informações que serão consideradas pelo córtex, influenciando o destino de cada memória. As projeções para a região PL parecem ser particularmente importantes durante a consolidação (KLAVIR *et al.*, 2017). Como o Zif268 parece estar vinculado mais especificamente à plasticidade em projeções excitatórias, é possível que a BLA esteja alterando a atividade de interneurônios da região, que, por sua vez, inibiriam a atividade celular nos NPs.

De forma geral, nossos resultados indicam que a expressão diferencial de Zif268, na janela de 12 horas após aquisição, é um indicador do destino de cada memória. O aumento verificado na BLA dos animais 5US pode indicar ainda que a atividade desta estrutura é importante para a diferença encontrada entre os grupos no mPFC, uma vez que essa região tem uma papel na discriminação de estímulos e emite projeções tanto para o PL quanto para o IL, fundamentais para o aprendizado

e o esquecimento, respectivamente, da memória de medo (KLAVIR *et al.*, 2017; MORGAN, M. A.; LEDOUX, 1995).

O fino balanço na comunicação entre BLA e o mPFC faz com que, na disputa entre consolidação e esquecimento, a balança penda para um lado ou para outro de acordo com a relevância que essa memória possa ter em futuras situações. É possível que o esquecimento no animal 1US ocorra como consequência do aumento do tônus inibitório na amígdala, através da modulação exercida pelas projeções corticais, de modo a suprimir o traço da memória de medo através de um engrama inibitório e que, no grupo 5US, a supressão da plasticidade impeça essa inibição (BARRON *et al.*, 2017; DAVIS, RONALD L.; ZHONG, 2017).

Resultados anteriores do nosso grupo dão suporte à ideia de que o balanço entre a atividade da BLA e do mPFC são importantes para expressão da resposta de medo. Animais 5US que receberam um inibidor da síntese de RNAs mensageiros no mPFC 12 horas após a aquisição expressaram uma resposta de medo mais intensa quando testados tanto 2 dias, quanto 30 dias após a formação da memória. Entretanto, nos animais 1US, o tratamento resultou em uma redução na expressão de freezing (PEREIRA *et al.*, 2019). Isso pode parecer contraintuitivo quando pensamos no mPFC apenas como inibidor da expressão de medo, entretanto, a modulação do mPFC sobre a amígdala também é importante para expressão de comportamento de congelamento (LIKHTIK *et al.*, 2014).

Para entender melhor como a atividade das projeções recíprocas entre o mPFC e a AMI podem estar influenciando na consolidação tardia da memória de medo, trabalhos futuros podem analisar mais detalhadamente a interação entre as diferentes populações neuronais coexistentes nestas estruturas, uma vez que estas projeções interagem de forma complexa com os interneurônios presentes nas duas estruturas (SUN, QINGTAO *et al.*, 2019).

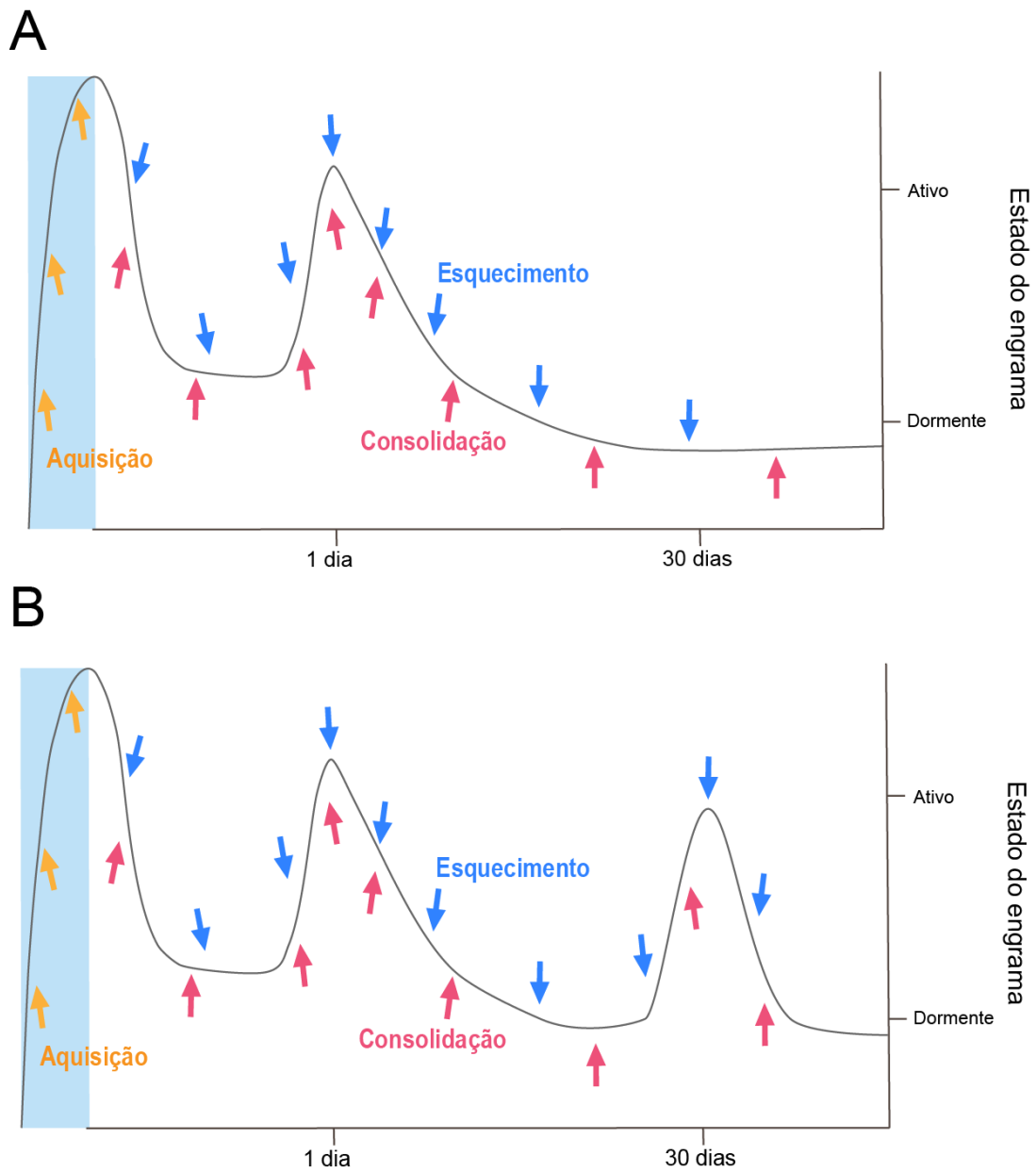


Figura 6.1. Estados do engrama, em machos, ao longo do tempo. Representação do balanço entre esquecimento e consolidação que se inicia após a aquisição. As setas representam os processos que favorecem cada fase da memória nomeadas na figura. (A) Estado de ativação do engrama 1 dia e 30 dias depois nos animais 1US. (B) Estado de ativação do engrama 1 dia e 30 dias depois nos animais 5US.

7. CONCLUSÃO

Protocolos diferentes são necessários para formar memórias com alto valor emocional em machos e em fêmeas, mas essa diferença não se deve necessariamente a uma divergência na percepção sensorial entre os dois sexos e pode refletir estratégias diferentes de processamento da memória de medo.

As diferenças no processamento da memória entre os animais submetidos a um treino de baixa relevância emocional (1US) e um treino de alta relevância (5US) podem ser visualizadas na janela de 12 horas após a aquisição. A atividade diferencial do mPFC entre os dois grupos sugere que a modulação exercida pelo córtex sobre outras estruturas cerebrais é importante na manutenção da memória até tempos mais remotos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W. C. *et al.* Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience*, v. 56, n. 3, p. 717–727, out. 1993.

ABRAHAM, Wickliffe C. Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 9, n. 5, p. 387, maio 2008.

ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*, v. 11, n. 1, p. 8–17, 2001.

ASOK, Arun *et al.* Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in neurosciences*, v. 42, n. 1, p. 14–22, jan. 2019.

BARON, Alan. Functions of CS and US in fear conditioning. *Journal of comparative and physiological psychology*, v. 52, n. 5, p. 591, 1959.

BAROT, Sabiha K. *et al.* Functional imaging of stimulus convergence in amygdalar neurons during Pavlovian fear conditioning. *PloS one*, v. 4, n. 7, p. e6156, 7 jul. 2009.

BARRON, Helen C. *et al.* Inhibitory engrams in perception and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 26, p. 6666–6674, 27 jun. 2017.

BAUMGÄRTEL, Karsten *et al.* Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nature neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 572–578, maio 2008.

BECHARA, A.; DAMASIO, H.; DAMASIO, A. R. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cerebral cortex*, v. 10, n. 3, p. 295–307, mar. 2000.

BEKINSCHTEIN, Pedro *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, v. 53, n. 2, p. 261–277, 18 jan. 2007.

BEYELER, Anna *et al.* Organization of Valence-Encoding and Projection-Defined Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell reports*, v. 22, n. 4, p. 905–918, 23 jan. 2018.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of comparative and physiological psychology*, v. 81, n. 2, p. 281–290, nov. 1972.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of comparative and physiological psychology*, v. 68, n. 1, p. 129–135, maio 1969.

BLANCHARD, Robert J.; FUKUNAGA, Kenneth K.; BLANCHARD, D. Caroline. Environmental control of defensive reactions to footshock. *Bulletin of the Psychonomic Society*, v. 8, n. 2, p. 129–130, 1 ago. 1976.

BLISS, T. V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the

dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, v. 232, n. 2, p. 331–356, jul. 1973.

BLUM, Sonja; HEBERT, April E.; DASH, Pramod K. A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport*, v. 17, n. 3, p. 341–344, 27 fev. 2006.

BOUTON, Mark E.; BOLLES, Robert C. Contextual control of the extinction of conditioned fear. *Learning and motivation*, v. 10, n. 4, p. 445–466, 1 nov. 1979.

BOZON, Bruno; DAVIS, Sabrina; LAROCHE, Serge. Regulated transcription of the immediate-early gene Zif268: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation. *Hippocampus*, v. 12, n. 5, p. 570–577, 2002.

CHAYYA, N. *et al.* Localization of Contextual and Context Removed Auditory Fear Memory within the Basolateral Amygdala Complex. *Neuroscience*, v. 398, p. 231–251, 1 fev. 2019.

CHEN, Li-Shen *et al.* Roles of testosterone and amygdaloid LTP induction in determining sex differences in fear memory magnitude. *Hormones and behavior*, v. 66, n. 3, p. 498–508, ago. 2014.

CIOCCHI, Stephane *et al.* Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, v. 468, n. 7321, p. 277–282, 11 nov. 2010.

CONDORELLI, D. F. *et al.* Glutamate receptor-driven activation of transcription factors in primary neuronal cultures. *Neurochemical research*, v. 19, n. 4, p. 489–499, abr. 1994.

COSTES, Sylvain V. *et al.* Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical journal*, v. 86, n. 6, p. 3993–4003, jun. 2004.

COURTIN, J. *et al.* Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. *Neuroscience*, v. 240, p. 219–242, 14 jun. 2013.

DAS, A. T. *et al.* Isolation and characterization of the rat gene encoding glutamate dehydrogenase. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 211, n. 3, p. 795–803, 1 fev. 1993.

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular psychiatry*, v. 6, n. 1, p. 13–34, jan. 2001.

DAVIS, Ronald L.; ZHONG, Yi. The Biology of Forgetting-A Perspective. *Neuron*, v. 95, n. 3, p. 490–503, 2 ago. 2017.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas; DO-MONTE, Fabricio H. Understanding the dynamic and destiny of memories. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 125, p. 592–607, 12 mar. 2021.

DUDAI, Yadin. *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond*. [S.l.]: Oxford University Press, 2004.

DUVARCI, Sevil; PARE, Denis. Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, v. 82, n. 5, p. 966–980, 4 jun. 2014.

FANSELOW, Michael S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *The Pavlovian journal of biological science*, v. 15, n. 4, p. 177–182, 1 out. 1980. Acesso em: 12 abr. 2019.

FELDMAN, Daniel E. The spike-timing dependence of plasticity. *Neuron*, v. 75, n. 4, p. 556–571, 23 ago. 2012.

FRANKLAND, Paul W. *et al.* Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning & memory*, v. 13, n. 4, p. 451–457, jul. 2006.

FRANKLAND, Paul W. *et al.* The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, v. 304, n. 5672, p. 881–883, 7 maio 2004.

FRANKLAND, Paul W.; BONTEMPI, Bruno. *The organization of recent and remote memories. Nature Reviews Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn1607>>. , 2005

FRITSCH, Brita *et al.* Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron*, v. 66, n. 2, p. 198–204, 29 abr. 2010.

GALLO, Francisco T. *et al.* Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 12, p. 79, 2018.

GAO, Qinqin *et al.* Post-training activation of Rac1 in the basolateral amygdala is required for the formation of both short-term and long-term auditory fear memory. *Frontiers in molecular neuroscience*, v. 8, p. 65, 4 nov. 2015.

GONZALEZ, Carolina *et al.* Medial prefrontal cortex is a crucial node of a rapid learning system that retrieves recent and remote memories. *Neurobiology of learning and memory*, v. 103, p. 19–25, jul. 2013.

GOOSENS, Ki A.; MAREN, Stephen. NMDA receptors are essential for the acquisition, but not expression, of conditional fear and associative spike firing in the lateral amygdala. *The European journal of neuroscience*, v. 20, n. 2, p. 537–548, jul. 2004.

GRESACK, J. E. *et al.* Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. *Neuroscience*, v. 159, n. 2, p. 451–467, 17 mar. 2009.

GRUENE, Tina M. *et al.* Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. *eLife*, v. 4, 14 nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.11352>>.

GULBRANDSEN, Tine L.; SPARKS, Fraser T.; SUTHERLAND, Robert J. Interfering with post-learning hippocampal activity does not affect long-term consolidation of a context fear memory outside the hippocampus. *Behavioural brain research*, v. 240, p.

103–109, 1 mar. 2013.

HATA, Toshimichi; OKAICHI, Hiroshige. Medial prefrontal cortex and precision of temporal discrimination: a lesion, microinjection, and microdialysis study. *Neuroscience research*, v. 49, n. 1, p. 81–89, maio 2004.

HERDEGEN, T.; LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain research. Brain research reviews*, v. 28, n. 3, p. 370–490, dez. 1998.

HOFFMAN, Ann N. *et al.* Chronic stress enhanced fear memories are associated with increased amygdala zif268 mRNA expression and are resistant to reconsolidation. *Neurobiology of learning and memory*, v. 120, p. 61–68, abr. 2015.

HOLLAND, P. C. Conditioned stimulus as a determinant of the form of the Pavlovian conditioned response. *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes*, v. 3, n. 1, p. 77–104, jan. 1977.

IZQUIERDO, I. N.; N IZQUIERDO, I. *NEUROSCIENCE: Zif and the Survival of Memory.* *Science.* [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1098139>>. , 2004

JONES, M. W. *et al.* A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature neuroscience*, v. 4, n. 3, p. 289–296, mar. 2001.

JOSSELYN, Sheena A.; TONEGAWA, Susumu. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, v. 367, n. 6473, 3 jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.aaw4325>>.

JÜNGLING, Kay *et al.* Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron*, v. 59, n. 2, p. 298–310, 31 jul. 2008.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2 nov. 2001.

KASUGAI, Yu *et al.* Structural and Functional Remodeling of Amygdala GABAergic Synapses in Associative Fear Learning. *Neuron*, v. 104, n. 4, p. 781–794.e4, 20 nov. 2019.

KATCHE, Cynthia *et al.* Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 1, p. 349–354, 5 jan. 2010.

KATCHE, Cynthia; CAMMAROTA, Martín; MEDINA, Jorge H. Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiology of learning and memory*, v. 106, p. 40–47, nov. 2013.

KEISER, Ashley A. *et al.* Sex Differences in Context Fear Generalization and

Recruitment of Hippocampus and Amygdala during Retrieval. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 2, p. 397–407, jan. 2017.

KHALAF, Ossama; GRÄFF, Johannes. Reactivation of Recall-Induced Neurons in the Infralimbic Cortex and the Basolateral Amygdala After Remote Fear Memory Attenuation. *Frontiers in molecular neuroscience*, v. 12, p. 70, 17 abr. 2019.

KIM, Jeansok J.; JUNG, Min Whan. 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, Takashi *et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, v. 356, n. 6333, p. 73–78, 7 abr. 2017.

KLAVIR, Oded *et al.* Manipulating fear associations via optogenetic modulation of amygdala inputs to prefrontal cortex. *Nature neuroscience*, v. 20, n. 6, p. 836–844, jun. 2017.

KOGAN, Jeffrey H.; FRANKLANDAND, Paul W.; SILVA, Alcino J. *Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. Hippocampus*. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1063\(2000\)10:1<47::aid-hipo5>3.0.co;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-1063(2000)10:1<47::aid-hipo5>3.0.co;2-6)>. , 2000

KOL, Adi *et al.* *Astrocytes Contribute to Remote Memory Formation by Modulating Hippocampal-Cortical Communication During Learning*. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/682344>>. 2020.

KORTE, Martin; SCHMITZ, Dietmar. Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. *Physiological reviews*, v. 96, n. 2, p. 647–693, abr. 2016.

LECHNER, H. A.; SQUIRE, L. R.; BYRNE, J. H. 100 years of consolidation—remembering Müller and Pilzecker. *Learning & memory* , 1999. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/content/6/2/77.short>>.

LEDOUX, Joseph. The amygdala. *Current biology: CB*, v. 17, n. 20, p. R868–74, 23 out. 2007.

LEDOUX, Joseph. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 23, n. 4-5, p. 727–738, out. 2003.

LEE, Suk Kyeong. Sex as an important biological variable in biomedical research. *BMB reports*, v. 51, n. 4, p. 167–173, abr. 2018.

LIKHTIK, Ekaterina *et al.* Prefrontal control of the amygdala. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 25, n. 32, p. 7429–7437, 10 ago. 2005.

LIKHTIK, Ekaterina *et al.* Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nature neuroscience*, v. 17, n. 1, p. 106–113, jan. 2014.

LIU, Yunlong *et al.* Hippocampal Activation of Rac1 Regulates the Forgetting of Object Recognition Memory. *Current biology: CB*, v. 26, n. 17, p. 2351–2357, 12 set. 2016.

MAREN, S.; DE OCA, B.; FANSELOW, M. S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain research*, v. 661, n. 1-2, p. 25–34, 24 out. 1994.

MCGARRY, Laura M.; CARTER, Adam G. Prefrontal Cortex Drives Distinct Projection Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell reports*, v. 21, n. 6, p. 1426–1433, 7 nov. 2017.

MILAD, M. R.; VIDAL-GONZALEZ, I.; QUIRK, G. J. Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behavioral neuroscience*, v. 118, n. 2, p. 389–394, abr. 2004.

MILBRANDT, J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*, v. 238, n. 4828, p. 797–799, 6 nov. 1987.

MOGIL, Jeffrey S. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 21, n. 7, p. 353–365, jul. 2020.

MORGAN, M. A.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behavioral neuroscience*, v. 109, n. 4, p. 681–688, ago. 1995.

MORGAN, Maria A.; SCHULKIN, Jay; LEDOUX, Joseph E. Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training. *Behavioural brain research*, v. 146, n. 1-2, p. 121–130, 30 nov. 2003.

MORGAN, M. A.; ROMANSKI, L. M.; LEDOUX, J. E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience letters*, v. 163, n. 1, p. 109–113, 26 nov. 1993.

MOSCARELLO, Justin M.; LEDOUX, Joseph E. Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 33, n. 9, p. 3815–3823, 27 fev. 2013.

MURPHY, T. H. *et al.* Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *Journal of neurochemistry*, v. 57, n. 6, p. 1862–1872, dez. 1991.

NAKAYAMA, Daisuke *et al.* Late Arc/Arg3.1 expression in the basolateral amygdala is essential for persistence of newly-acquired and reactivated contextual fear memories. *Scientific reports*, v. 6, p. 21007, 16 fev. 2016.

NICOLL, Roger A. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, v. 93, n. 2, p. 281–290, 18 jan. 2017.

NIELSEN, Darci M.; CRNIC, Linda S. Automated analysis of foot-shock sensitivity and concurrent freezing behavior in mice. *Journal of neuroscience methods*, v. 115, n. 2,

p. 199–209, 15 abr. 2002.

OH, Daeyoung *et al.* Regulation of synaptic Rac1 activity, long-term potentiation maintenance, and learning and memory by BCR and ABR Rac GTPase-activating proteins. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 30, n. 42, p. 14134–14144, 20 out. 2010.

OLFF, Miranda. Sex and gender differences in post-traumatic stress disorder: an update. *European journal of psychotraumatology*, v. 8, n. sup4, p. 1351204, 29 set. 2017.

ORSINI, Caitlin A. *et al.* Hippocampal and prefrontal projections to the basal amygdala mediate contextual regulation of fear after extinction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 31, n. 47, p. 17269–17277, 23 nov. 2011.

OSORIO-GÓMEZ, Daniel *et al.* Early memory consolidation window enables drug induced state-dependent memory. *Neuropharmacology*, v. 146, p. 84–94, 1 mar. 2019.

OU, Li-Chin; YEH, Shiu-Hwa; GEAN, Po-Wu. Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiology of learning and memory*, v. 93, n. 3, p. 372–382, mar. 2010.

PEREIRA-CAIXETA, Ana Raquel *et al.* Neurogenesis Inhibition Prevents Enriched Environment to Prolong and Strengthen Social Recognition Memory, But Not to Increase BDNF Expression. *Molecular neurobiology*, v. 54, n. 5, p. 3309–3316, jul. 2017.

PEREIRA, Luciana M. *et al.* Hippocampus and Prefrontal Cortex Modulation of Contextual Fear Memory Is Dissociated by Inhibiting De Novo Transcription During Late Consolidation. *Molecular neurobiology*, 9 jan. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-1463-4>>.

PEREZ-VILLALBA, A.; MACKINTOSH, N. J.; CANALES, J. J. Influence of massed and distributed context preexposure on contextual fear and Egr-1 expression in the basolateral amygdala. *Physiology & behavior*, v. 93, n. 1-2, p. 206–214, 28 jan. 2008.

PETERSOHN, Dirk *et al.* The Human Synapsin II Gene Promoter: POSSIBLE ROLE FOR THE TRANSCRIPTION FACTORS ZIF268/EGR-1, POLYOMA ENHANCER ACTIVATOR 3, AND AP2 (*). *The Journal of biological chemistry*, v. 270, n. 41, p. 24361–24369, 13 out. 1995.

POLEPALLI, Jai S.; GOOCH, Helen; SAH, Pankaj. Diversity of interneurons in the lateral and basal amygdala. *NPJ science of learning*, v. 5, p. 10, 3 ago. 2020.

POSPELOV, V. A.; POSPELOVA, T. V.; JULIEN, J. P. AP-1 and Krox-24 transcription factors activate the neurofilament light gene promoter in P19 embryonal carcinoma cells. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, v. 5, n. 2, p. 187–196, fev. 1994.

PRENDERGAST, Brian J.; ONISHI, Kenneth G.; ZUCKER, Irving. Female mice

liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 40, p. 1–5, mar. 2014.

PRYCE, C. R.; LEHMANN, J.; FELDON, J. Effect of sex on fear conditioning is similar for context and discrete CS in Wistar, Lewis and Fischer rat strains. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 64, n. 4, p. 753–759, dez. 1999.

QUIRK, Gregory J. *et al.* Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 23, n. 25, p. 8800–8807, 24 set. 2003.

QUIRK, Gregory J.; MUELLER, Devin. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 56–72, jan. 2008.

REDONDO, Roger L. *et al.* Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature*, v. 513, n. 7518, p. 426–430, 18 set. 2014.

RESCORLA, R. A. Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning. *Journal of comparative and physiological psychology*, v. 66, n. 1, p. 1–5, ago. 1968.

RICHARDS, Blake A.; FRANKLAND, Paul W. The Persistence and Transience of Memory. *Neuron*, v. 94, n. 6, p. 1071–1084, 21 jun. 2017.

RICHARDSON, C. L. *et al.* Correlation between the induction of an immediate early gene, *zif/268*, and long-term potentiation in the dentate gyrus. *Brain research*, v. 580, n. 1-2, p. 147–154, 15 maio 1992.

ROEDIGER, Henry L., III; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. (Org.). Science of memory: Concepts. v. 446, 2007. Disponível em: <<https://psycnet.apa.org/fulltext/2007-14484-000.pdf>>.

ROESLER, R.; MCGAUGH, J. L. Memory consolidation. 2019.

ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell*, v. 85, n. 4, p. 469–475, 17 maio 1996.

ROGAN, M. T.; STÄUBLI, U. V.; LEDOUX, J. E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, v. 390, n. 6660, p. 604–607, 11 dez. 1997.

ROY, Dheeraj S. *et al.* Silent memory engrams as the basis for retrograde amnesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 46, p. E9972–E9979, 14 nov. 2017.

RUNYAN, Jason D.; MOORE, Anthony N.; DASH, Pramod K. *Coordinating what we've learned about memory consolidation: Revisiting a unified theory. Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.02.010>>. , 2019

SANDER, David; GRAFMAN, Jordan; ZALLA, Tiziana. The human amygdala: an evolved system for relevance detection. *Reviews in the neurosciences*, v. 14, n. 4, p. 303–316, 2003.

SCHACTER, Daniel L.; EICH, James Eric; TULVING, Endel. Richard Semon's theory of memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, v. 17, n. 6, p. 721–743, 1 dez. 1978.

SCHINDELIN, Johannes *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jun. 2012.

SHUAI, Yichun *et al.* Distinct molecular underpinnings of *Drosophila* olfactory trace conditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 50, p. 20201–20206, 13 dez. 2011.

SHUAI, Yichun *et al.* Forgetting is regulated through Rac activity in *Drosophila*. *Cell*, v. 140, n. 4, p. 579–589, 19 fev. 2010.

SIAPAS, Athanassios G.; WILSON, Matthew A. *Coordinated Interactions between Hippocampal Ripples and Cortical Spindles during Slow-Wave Sleep*. *Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80629-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80629-7)>. , 1998

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

SOLIMAN, Fatima *et al.* A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science*, v. 327, n. 5967, p. 863–866, 12 fev. 2010.

SUKHATME, V. P. *et al.* A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*, v. 53, n. 1, p. 37–43, 8 abr. 1988.

SUN, Qingtao *et al.* A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex. *Nature neuroscience*, v. 22, n. 8, p. 1357–1370, ago. 2019.

SUN, Ying *et al.* Amygdala GABA Neurons Project To vIPAG And mPFC. *IBRO reports*, v. 6, p. 132–136, jun. 2019.

TANNENBAUM, Cara *et al.* Sex and gender analysis improves science and engineering. *Nature*, v. 575, n. 7781, p. 137–146, nov. 2019.

TEJADA-SIMON, Maria V. Modulation of actin dynamics by Rac1 to target cognitive function. *Journal of neurochemistry*, v. 133, n. 6, p. 767–779, jun. 2015.

THIEL, G.; SCHOCH, S.; PETERSOHN, D. Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor zif268/egr-1. *The Journal of biological chemistry*, v. 269, n. 21, p. 15294–15301, 27 maio 1994.

TONEGAWA, Susumu; MORRISSEY, Mark D.; KITAMURA, Takashi. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature reviews. Neuroscience*,

v. 19, n. 8, p. 485–498, ago. 2018.

TRONSON, Natalie C.; KEISER, Ashley A. A Dynamic Memory Systems Framework for Sex Differences in Fear Memory. *Trends in neurosciences*, v. 42, n. 10, p. 680–692, out. 2019.

VERTES, Robert P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, v. 51, n. 1, p. 32–58, jan. 2004.

VETERE, Gisella *et al.* Chemogenetic Interrogation of a Brain-wide Fear Memory Network in Mice. *Neuron*, v. 94, n. 2, p. 363–374.e4, 19 abr. 2017.

VIDAL-GONZALEZ, Ivan *et al.* Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning & memory*, v. 13, n. 6, p. 728–733, nov. 2006.

VIVIANI, Daniele *et al.* Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science*, v. 333, n. 6038, p. 104–107, 1 jul. 2011.

WALKER, Matthew P.; STICKGOLD, Robert. Sleep-dependent learning and memory consolidation. *Neuron*, v. 44, n. 1, p. 121–133, 30 set. 2004.

WATSON, J. B.; RAYNER, R. Conditioned emotional reactions. *Journal of experimental psychology*, 1920. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/journals/xge/3/1/1/?casa_token=TJdFaXEgBhkAAAAA:nFD TwSuoNh-yeeoGNblisJR3Oj8Rj2cJe__DLVSSIgXXjZJn0moHSm-ZNrOwyiNMnIUAJU2UOz-0YG2qOBg39I2T>.

WHALEN, Paul J.; PHELPS, Elizabeth A. *The Human Amygdala*. [S.l.]: Guilford Press, 2009.

WILTGEN, B. J. *et al.* Sex differences, context preexposure, and the immediate shock deficit in Pavlovian context conditioning with mice. *Behavioral neuroscience*, v. 115, n. 1, p. 26–32, fev. 2001.

WOLFF, Steffen B. E. *et al.* Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature*, v. 509, n. 7501, p. 453–458, 22 maio 2014.

WU, I-Tek *et al.* Amygdaloid zif268 participated in the D-cycloserine facilitation effect on the extinction of conditioned fear. *Psychopharmacology*, v. 232, n. 20, p. 3809–3819, out. 2015.

YOUSUF, Hanna *et al.* Modulation of intrinsic excitability as a function of learning within the fear conditioning circuit. *Neurobiology of learning and memory*, v. 167, p. 107132, jan. 2020.

ZELIKOWSKY, Moriel *et al.* Neuronal ensembles in amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 34, n. 25, p. 8462–8466, 18 jun. 2014.

ZELINSKI, Erin L. *et al.* Prefrontal cortical contributions during discriminative fear

conditioning, extinction, and spontaneous recovery in rats. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, v. 203, n. 2, p. 285–297, jun. 2010.

ZHANG, Xian; LI, Bo. Population coding of valence in the basolateral amygdala. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 5195, 5 dez. 2018.