

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

Thaysa Lara Gonçalves Mello

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL SOBRE A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE**  
**MEDO CONDICIONADO**

Belo Horizonte

2022

Thaysa Lara Gonçalves Mello

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL SOBRE A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE  
MEDO CONDICIONADO.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de mestre.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra Grace Schenatto Pereira Moraes  
Coorientadora: Dra. Paula Santana Lunardi

Belo Horizonte

2022

043

Mello, Thaysa Lara Gonçalves.

Efeitos do isolamento social sobre a extinção da memória de medo condicionado [manuscrito] / Thaysa Lara Gonçalves Mello. – 2022.  
69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra Grace Schenatto Pereira Moraes. Coorientadora: Dra. Paula Santana Lunardi.

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

1. Farmacologia. 2. Isolamento Social. 3. Memória. 4. Condicionamento (Psicologia). 5. Medo. 6. Extinção Psicológica. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Lunardi, Paula Santana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO Nº 563 DE THAYSA LARA GONÇALVES MELLO**

**"Efeitos do Isolamento Social Sobre A Extinção da Memória de Medo Condicionado"**

**THAYSA LARA GONÇALVES MELLO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **19 de outubro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Profa. Dra. Ana Flávia Santos Almeida**, FAMINAS

**Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira**, ICB/UFMG

**Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes**, ICB/UFMG - Orientadora

**Belo Horizonte, 19 de outubro de 2022.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício de Araujo Moreira**, Professor do Magistério Superior, em 21/10/2022, às 08:56, 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**, Professora do Magistério Superior, em 26/10/2022, às 09:52, 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 **Ana Flávia Santos Almeida**, Usuário Externo, em 31/10/2022, às 14:29, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?)



[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador **1835265** e o código CRC **2CAFD7C8**.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Cláudio e Jane, pelo imenso carinho, cuidado e amor que foram fundamentais nos momentos difíceis dessa trajetória. Obrigada por nunca medirem esforços para com nossa família, é por isso que pude exercer o mestrado.

Ao meu irmão, Thiago, por sempre me lembrar do meu encanto pela ciência.

À professora Grace por ter me aceitado como sua aluna e não desanimar mesmo em tempos difíceis da pandemia, permitindo um ambiente de incentivo ao trabalho.

À Paula pela imensa paciência comigo e dedicação ao meu trabalho. Obrigada pelos momentos de amizade e descontração necessários em tantos momentos de estresse.

Ao Léo por sempre se apresentar disponível para ajudar nos experimentos.

Aos colegas e professores do Núcleo de Neurociências, em especial ao grupo de pesquisa da professora Grace, pelo acolhimento, ensinamentos e qualquer ajuda.

Aos meus amigos pela compreensão e apoio, em especial, Aline, Marcelo e Wesley. Obrigada a todos por não desistirem da minha amizade. Vocês foram essenciais para aliviar o estresse.

Ao Renet pela competência profissional e cuidado que me possibilitou chegar até aqui.

“Knowing is thekey to caring, and with caring there is hope that people will be motivated to take positive actions. They might not care even if they know, but they can’t care if they are unaware.”

- Sylvia Earle.

## RESUMO

A memória de medo exibe grande relevância para nossa sobrevivência. No entanto, sua permanência e evocação por períodos prolongados e em situações não aversivas podem caracterizar um atributo mal adaptativo. Considerando o fato de que o isolamento social (IS) pode causar efeitos deletérios em funções cognitivas e emocionais, como prejuízo na memória, investigou-se se o IS pode facilitar ou prejudicar a extinção de uma memória aversiva. Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 foram mantidos agrupados ou submetidos ao IS de 7 dias, seguido da tarefa de condicionamento pavloviano ao medo contextual, com 3 estímulos incondicionados (US). Machos e fêmeas extinguiram a memória, entretanto as fêmeas isoladas tiveram uma pior extinção em comparação com os machos isolados. A seguir, outro grupo de animais nas mesmas condições experimentais foi exposto ao condicionamento com 1US, que é mais brando. Para confirmar que mesmo com 1US os animais consolidaram a memória de medo, adicionamos grupos naïves. Machos e fêmeas condicionaram e apresentaram comportamento de *freezing* superior aos seus respectivos grupos naïves. Apesar de não termos observado diferença entre os grupos, no geral, os animais machos isolados mostraram um nível menor de *freezing*, o que pode indicar uma extinção facilitada ou um aprendizado prejudicado. Para melhor caracterizar a memória de medo em machos, utilizamos o condicionamento ao medo auditivo, com 1 ou 3 US. Entretanto, não observamos diferenças entre os animais agrupados e isolados. Por fim, não houve diferença entre os grupos quanto ao comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado. Enquanto na atividade locomotora, as fêmeas isoladas percorreram uma distância maior no campo aberto em comparação com os machos isolados. Em conjunto, os resultados sugerem que o efeito do IS sobre a extinção de memórias de medo se manifesta, mesmo que brandamente, apenas nas fêmeas.

**Palavras-chave:** Isolamento social; Memória de medo condicionado; Extinção.

## ABSTRACT

Fear memory exhibits great relevance to our survival. However, its permanence and retrieval for prolonged periods and in non-aversive situations can characterize a maladaptive attribute. Considering the fact that social isolation (SI) can cause deleterious effects on cognitive and emotional functions, such as memory impairment, we investigated whether SI can facilitate or impair the extinction of an aversive memory. Male and female C57BL/6 mice were kept grouped or subjected to a 7-day IS, followed by a Pavlovian contextual fear conditioning task with 3 unconditioned stimuli (US). Males and females extinguished memory, however, isolated females had a worse extinction compared to isolated males. Then, another group of animals under the same experimental conditions was exposed to conditioning with 1US, which is milder. To confirm that even with 1US the animals consolidated the fear memory, we added naïve groups. Males and females conditioned and presented freezing behaviour superior to their respective naïve groups. Although we did not observe any difference between the groups, in general, the isolated male animals showed a lower level of freezing, which may indicate a facilitated extinction or impaired learning. To better characterize fear memory in males, we used auditory fear conditioning, with 1 or 3 US. However, we did not observe differences between the grouped and isolated animals. Finally, there was no difference between the groups regarding anxious-like behaviour in the elevated plus maze. While in locomotor activity, isolated females covered a greater distance in the open field compared to isolated males. Taken together, the results suggest that the effect of S on the extinction of fear memories is manifested, albeit mildly, only in females.

**Key-words:** Social isolation; conditioning fear memory; extinction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Circuito neural do medo condicionado.....	17
Figura 2 - Fenômenos de recuperação da resposta condicionada após extinção ....	20
Figura 3 - Caixa de condicionamento .....	25
Figura 4 - Imagem ilustrativa do protocolo de condicionamento ao medo contextual.....	26
Figura 5 - Imagem ilustrativa do protocolo de condicionamento ao medo auditivo. ..	27
Figura 6 - Labirinto em cruz elevado.. .....	28
Figura 7 - Campo aberto.. .....	29
Figura 8 - Desenho experimental do condicionamento de memória de medo contextual forte.....	29
Figura 9 - Desenho experimental do condicionamento de memória de medo contextual fraca.....	30
Figura 10 - Desenho experimental do condicionamento de memória de medo auditivo, forte e fraca.....	31
Figura 11 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em machos, com 3 US. ....	36
Figura 12 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em fêmeas, com 3 US. ....	39
Figura 13 - Comparação na expressão de comportamento de <i>freezing</i> entre machos e fêmeas durante o experimento de extinção da memória de medo condicionado ao contexto, com 3 US.....	40
Figura 14 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em machos, com 1 US.. .....	44
Figura 15 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em fêmeas, com 1 US. ....	47
Figura 16 - Comparação na expressão de comportamento de <i>freezing</i> entre machos e fêmeas durante o experimento de extinção da memória de medo condicionado ao contexto, com 1 US.....	48
Figura 17 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao tom, em machos, com 3 US-CS.....	51
Figura 18 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao tom, em machos, com 1 US-CS.....	54
Figura 19 - Teste do labirinto em cruz elevado, em machos e fêmeas. ....	55
Figura 20 - Análise locomotora no teste de campo aberto. ....	56

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

BA – Amígdala basal

BICBIO-2 – Biotério setorial do Departamento de Fisiologia Biofísica

BLA – Amígdala basolateral

BMA – Amígdala basomedial

CeA – Amígdala central

CeL – Núcleo lateral

CeM – Núcleo medial

CEUA/UFMG – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais

cm – Centímetros

CR – Resposta condicionada

CS – Estímulo condicionado

DRN – Núcleo dorsal da rafe

E – Neurônios de extinção

E2 – 17 $\beta$ -estradiol

F – Neurônios de medo

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GH – Animais agrupados

LA – Amígdala Lateral

h – Horas

IF – Infra-limbico

IL – Infra-limbico

ITC – Células intercaladas

ITC-a – Célula intercalar a

ITC-b – Célula intercalar b

ITCI – Células intercaladas laterais

ITCm – Células intercaladas mediais

IS – Isolamento social

mA – Miliampères

min – Minutos

mPFC – Córtex pré-frontal medial

P – Valor-p

PFC – Córtex pré-frontal

PL – Pré-lobulocéfalo

PTSD – Transtorno do estresse pós-traumático

P4 – Progesterona

s – Segundos

SEM – Erro médio padrão

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

US – Estímulos incondicionados

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	MEMÓRIA	23
1.2	MEMÓRIA DE MEDO	14
1.3	ISOLAMENTO SOCIAL	20
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>23</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
4.1	TESTES COMPORTAMENTAIS	24
4.1.1	Caixa de condicionamento ao medo	24
4.1.2	Condicionamento ao medo contextual	25
4.1.3	Condicionamento ao medo auditivo	26
4.1.4	Labirinto em cruz elevado	27
4.1.5	Campo aberto	28
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL	29
4.2.1	Experimento 1: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória contextual forte?	29
4.2.2	Experimento 2: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória contextual fraca?	30
4.2.3	Experimento 3: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória de medo auditivo forte?	30
4.2.4	Experimento 4: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória de medo auditivo fraca?	31
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
5.1	EM MACHOS, O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 3US	32
5.2	EM FÊMEAS, O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 3US	36
5.3	EM COMPARAÇÃO COM OS MACHOS, FÊMEAS ISOLADAS SOCIALMENTE APRESENTAM MEDO ELEVADO NO TESTE DA EXTINÇÃO, APÓS PROTOCOLO DE 3US	39
5.4	EFEITO FACILITATÓRIO DO ISOLAMENTO SOCIAL EM MACHOS CONDICIONADOS COM O PROTOCOLO DE 1US	41

5.5	EM FÊMEAS,O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 1US.....	44
5.6	O SEXO DO ANIMAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 1US .....	47
5.7	O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO TOM, PELO PROTOCOLO DE 3US-CS .....	48
5.8	O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO TOM, PELO PROTOCOLO 1 US-CS.....	51
5.9	O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO PROVOCOU COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO NOS ANIMAIS.....	54
5.10	O ISOLAMENTO SOCIAL AUMENTA A ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DE FÊMEAS.....	55
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
6.1	AUSÊNCIA DE EFEITO DO ISOLAMENTO SOCIAL NOS EXPERIMENTOS DE MEDO CONTEXTUAL, EM MACHOS E FÊMEAS.....	57
6.2	DIFERENÇA ENTRE SEXOS NO TESTE DE EXTINÇÃO .....	59
6.3	AUSÊNCIA DE EFEITO DO ISOLAMENTO SOCIAL NOS EXPERIMENTOS DE MEDO AUDITIVO.....	60
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## INTRODUÇÃO

### MEMÓRIA

De acordo com a ideia de que memórias são mudanças nos modelos internos do mundo ou em conhecimentos, Dudai e colaboradores (2007) conceituam memória como “retenção ao longo do tempo de representações internas dependentes da experiência, ou da capacidade de reativar ou reconstruir tais representações” (ROEDIGER III; DUDAI; FITZPATRICK, 2007).

Como forma didática de estudar os processos mnemônicos, a formação do traço da memória é representada por uma sequência de etapas. A fase inicial é a aquisição da memória, quando ocorre a codificação de estímulos novos provenientes do ambiente externo. Essa é então seguida pela retenção temporária dessa informação, ainda instável, que logo será esquecida ou consolidada. A consolidação da memória é a estabilização do traço da memória, quando a informação é retida por tempo prolongado ou até permanente. A última fase é a evocação da memória, processo em que ocorre o acesso à informação retida, trazendo-a à tona, seja como forma de pensamento ou comportamento (DUDAI, 2002). Ainda, após a evocação, o traço da memória pode reentrar em um estado ativo ou instável necessitando ser reestabilizado através de outro processo chamado reconsolidação (NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000), ou, dependendo do tipo de memória, essas podem ser enfraquecidas pelo processo de extinção (QUIRK; MUELLER, 2008), como ocorre com memórias associativas, por exemplo, a memória de medo condicionado, tema deste trabalho.

### MEMÓRIA DE MEDO

O debate sobre o conceito de “medo” vem se desenrolando no panorama da neurociência há um tempo. No centro deste debate está a visão de que o medo é um estado consciente e subjetivo referente a humanos, em vez de estados inatos inerentes a animais. Por outro lado, o mesmo termo é utilizado para se referir a comportamentos como luta, fuga e *freezing* (congelamento), e reações fisiológicas que ocorrem simultaneamente a esses comportamentos, os quais podem ser

reconhecidos em outras espécies. Desta forma, conceitua-se o medo como um mecanismo de defesa em resposta a estímulos sensoriais que denotam perigo iminente e que promovem no organismo respostas comportamentais e fisiológicas de defesa, com enorme valor para a sobrevivência (LEDOUX; PINE, 2016).

O medo pode ser dividido em medo inato e medo condicionado. Vários estímulos são capazes de gerar medo inato: presença de predadores, indivíduos agressivos ou aspectos do ambiente, como a distância do solo. Tais informações são evolutivamente bem preservadas entre os animais, incluindo humanos. Já o medo condicionado provém da experiência, que dá origem a uma memória associativa entre estímulo aversivo e um estímulo neutro, se tratando de uma habilidade que nos permite recordar e evitar adversidades futuras (RUDY, 2014).

As memórias de medo condicionado podem ser classificadas em duas categorias, dependendo do conteúdo do estímulo. Quando é formado por uma única pista (unimodal), como um som, denomina-se memória de medo condicionado “à pista” (*cued fear memory*), ou mais especificamente como memória de medo condicionado ao tom, predominantemente dependente da amígdala. Quando este é composto pelo contexto (polimodal), que reúne os variados aspectos de um ambiente (componentes visuais, olfatórios, auditivos, dentre outros), a memória é denominada de memória de medo contextual. Esta é predominantemente dependente do hipocampo, região onde se estabelece inicialmente a representação do contexto (SMITH; BULKIN, 2014).

Devido à conservação evolutiva das regiões cerebrais e redes neurais relacionadas à memória de medo, roedores são amplamente utilizados para o estudo deste tipo de memória, a partir do condicionamento clássico Pavloviano. A formulação básica deste condicionamento baseia-se em um aprendizado associativo por meio do pareamento de um estímulo aversivo incondicionado (US) a um estímulo condicionado (CS), inicialmente neutro, o qual se torna uma pista para o primeiro. Por consequência, o indivíduo passa a temer o CS, demonstrando comportamentos e respostas fisiológicas características do medo (resposta condicionada, CR) (KIM; JUNG, 2006).

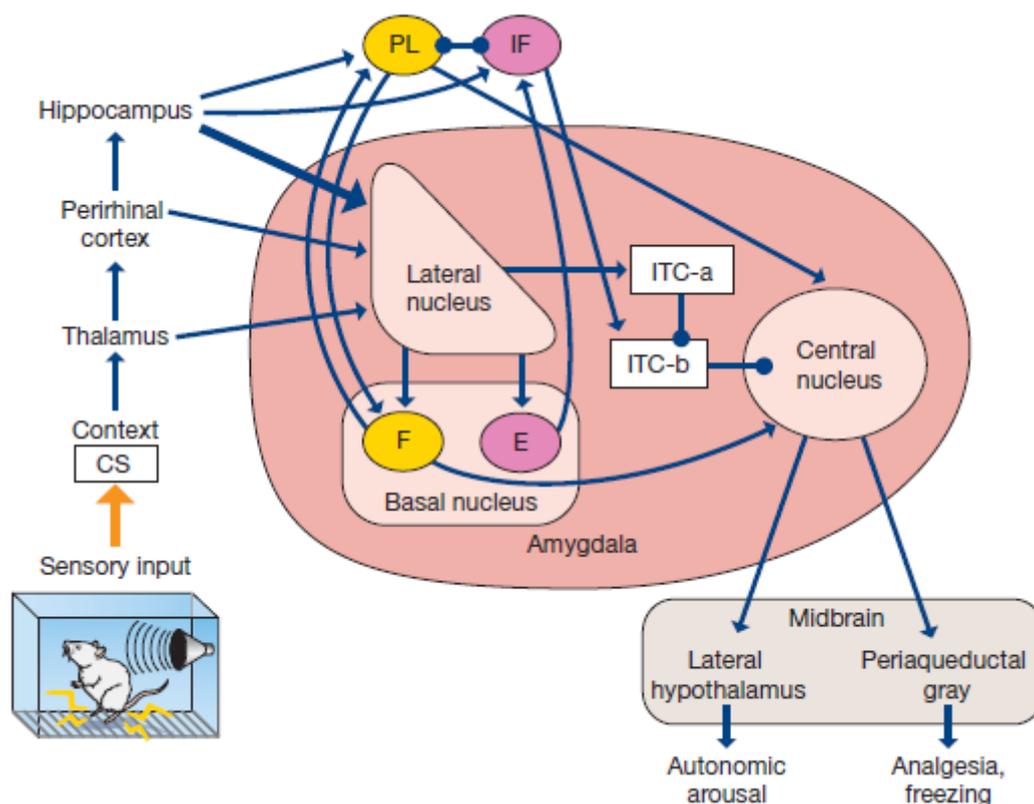
Estudos que usam o condicionamento Pavloviano revelaram que existe uma rede de regiões cerebrais envolvidas no aprendizado e na expressão de respostas de medo. Isso inclui, entre outros, a amígdala, o córtex pré-frontal medial (mPFC) e o hipocampo (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Considerado o principal substrato

neural onde ocorre a associação US-CS, a amígdala (ou complexo amigdalóide) é uma estrutura localizada no lobo temporal. É uma região heterogênea composta por núcleos com anatomia, fisiologia e composição neuronal diferenciadas, que recebem informações de uma série de áreas corticais e subcorticais, e possui extensa conectividade internuclear. Destas, as mais compreendidas são a amígdala basolateral (BLA) e a amígdala central (CeA), que formam as principais estruturas de entrada e saída da amígdala, respectivamente. A BLA consiste principalmente em projeções neuronais glutamatérgicas e interneurônios, e pode ser subdividida em amígdala lateral (LA), amígdala basal (BA) e amígdala basomedial (BMA). Em contrapartida, os neurônios da CeA são principalmente GABAérgicos, sendo essa região subdividida em núcleo lateral (CeL) e núcleo medial (CeM). Uma bainha interconectada de neurônios GABAérgicos, denominadas células intercaladas (ITC), é encontrada entre a BLA e a CeA. Podem ser divididas em duas porções: ITCs mediais (ITCm), responsáveis pela inibição da CeA, e ITCs laterais (ITCl), responsáveis pela inibição da BLA (SUN; GOOCH; SAH, 2020; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

Embora os circuitos envolvidos na formação e expressão da memória de medo condicionado na amígdala estejam bem mais esclarecidos para a memória de medo condicionada ao tom, não parece haver diferenças entre os dois tipos de condicionamento no processamento do US e na expressão do comportamento de medo, apenas no processamento do CS, que quando representado pelo contexto, há maior participação do hipocampo (RUDY, 2014).

As vias aferentes que transmitem as informações sensoriais são bem elucidadas. A via cortical transmite informações do tálamo sensorial para as regiões neocorticais do cérebro, incluindo o córtex perirhinal e o hipocampo, que também se projetam para a LA e fornecem uma representação mais rica e detalhada do contexto. Quando os estímulos convergem na BLA, fenômenos de plasticidade, como potenciação de longa duração, se estabelecem seletivamente nas vias que receberam estímulos, fortalecendo-as (KIM; CHO, 2020). Neurônios da LA projetam-se para a BA, onde neurônios que codificam medo (HERRY et al., 2008) fornecem projeções excitatórias para a CeA e para os neurônios da região pré-límbica (PL) do PFC. A CeA projeta para a substância cinzenta periaquedutal produzindo *freezing* e analgesia, e para o hipotálamo lateral responsável pelas mudanças na resposta autonômica (Figura 1). Portanto, as informações do CS e US convergem na

BLA, formando um traço de memória. A apresentação subsequente do CS ativa circuitos na BLA e suas projeções para aCeA impulsionam os comportamentos defensivos (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; SUN; GOOCH; SAH, 2020).



**Figura 1 - Circuito neural do medo condicionado.** A figura ilustra os componentes básicos do circuito da aquisição do medo condicionado. A BLA recebe informações sensoriais do tálamo sensorial, córtex perirhinal e hipocampo que fornecem informações sobre o CS. A BLA se comunica com a CeA tanto diretamente quanto por meio das ITCs. Neurônios na CeA controlam as estruturas do mesencéfalo para gerar comportamentos defensivos. CS = estímulo condicionado. PL = região pré-límbica do córtex pré-frontal. IF = região infra-límbica do córtex pré-frontal. F = neurônios de medo. E = neurônios de extinção. ITC-a e ITC-b = células intercalares (RUDY, 2014).

No entanto, apesar da importância da memória de medo, sua permanência e evocação por períodos prolongados e em situações não aversivas podem caracterizar distúrbios de ansiedade, tornando-se um atributo mal adaptativo, tal qual ocorre em humanos que apresentam ataques de pânico e transtorno do estresse pós-traumático (PTSD). Conseqüentemente, amenizar o medo aprendido, base desses transtornos, é de grande relevância (MAREN; HOLMES, 2016). Em laboratório, pesquisadores utilizam o método de condicionamento pavloviano para estudar como atenuar essas memórias de medo mal adaptativas. Com a premissa de que a exposição repetida do indivíduo ao CS, na ausência do US fará com que diminua sua capacidade de evocar uma CR. Em vez de apagar a memória CS-US

anterior, uma nova associação é formada entre o CS e a ausência do US, a qual atenua a CR (CHANG et al., 2009). Este fenômeno, contexto-dependente, é denominado de extinção, a base da terapia de exposição utilizada como tratamento dos distúrbios de ansiedade supracitados.

A rede que controla a extinção do medo envolve muita das mesmas áreas cerebrais que são importantes para o condicionamento do medo, incluindo a amígdala, o PFC e o hipocampo. Durante a extinção, o IL do mPFC inibe a CeM pelas ITC inibitórias. *Inputs* que chegam ao IL também fazem sinapse com “neurônios de extinção” dentro do BA, que disparam seletivamente para um CS extinto. Os “neurônios de extinção” então influenciam a atividade dentro da CeA através de várias rotas, possivelmente impulsionando neurônios ITC ou CeL inibidores que limitam a atividade do CeM (CHANG et al., 2009; MAREN; HOLMES, 2016; ORSINI; MAREN, 2012).

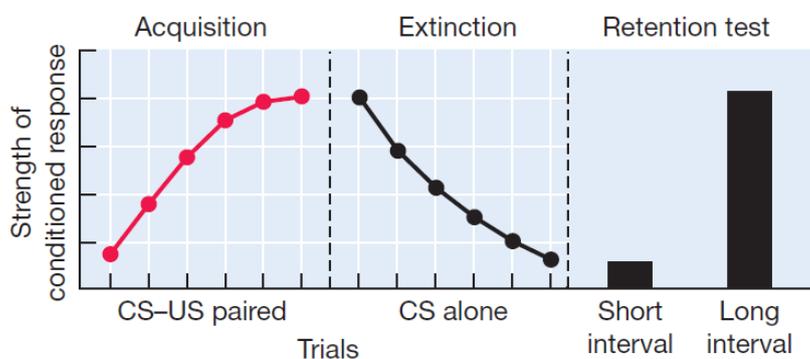
A diminuição das respostas de medo condicionado durante e logo após o treinamento de extinção geralmente não é permanente. Com o passar do tempo após a extinção, o CS recupera sua capacidade de evocar a CR, não sendo necessário o pareamento com o US novamente para tal. Esse fenômeno que ocorre com a passagem do tempo após a extinção é denominado de recuperação espontânea (Figura 2A). O reaparecimento do medo condicionado, previamente extinto, pode ocorrer também pela mudança do contexto da extinção, denominado *renewal effect* (figura 2B), ou ainda apenas pela reapresentação do US no contexto de treinamento, o *reinstatement effect* (figura 2C). Como mencionado, a recuperação espontânea refere-se ao reaparecimento da CR extinta com o passar do tempo após o treinamento de extinção, na ausência de qualquer treinamento adicional. A recuperação espontânea também pode ser explicada pela modulação contextual: em vez de uma mudança nas pistas espaciais, a passagem do tempo cria uma mudança no “contexto temporal”(ORSINI; MAREN, 2012; RUDY, 2014; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

O *renewal effect* refere-se ao reaparecimento da CR extinta quando o animal é testado em um contexto diferente daquele em que o treinamento de extinção ocorreu. O animal é treinado em um contexto diferente de onde ocorre a extinção, e embora o treinamento de extinção elimine a CR, se o animal retornar ao ambiente de treinamento original, o CR se recupera. O contexto em que o CS é apresentado determina qual associação é recuperada (CS-US ou CS-noUS) e, assim, determina

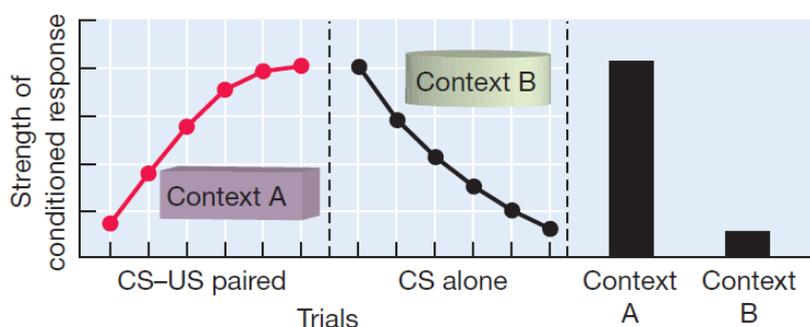
se o medo é expresso ou não. Esse fenômeno indica que a extinção é específica para determinado contexto (ORSINI; MAREN, 2012; RUDY, 2014; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

O *reinstatement effect* refere-se a um reaparecimento da CR à apresentação do CS, após a reexposição ao US, mesmo quando houve a conclusão do treinamento de extinção, não sendo necessário novo pareamento. Esse fenômeno ocorre quando apresentação do CS depois da extinção ocorre no contexto em que o US foi apresentado, sugerindo que o *reinstatement effect* se deve ao condicionamento contextual entre o US e o contexto em que se apresenta. Essas observações sugerem que a extinção é um novo processo de aprendizado, e a redução do medo resulta da inibição, e não do apagamento, da memória original do medo. Ou seja, em vez de um apagamento da memória anterior, uma nova associação é formada entre o CS e a ausência de US durante a extinção, que suprime efetivamente o CR adquirido anteriormente (ORSINI; MAREN, 2012; RUDY, 2014; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

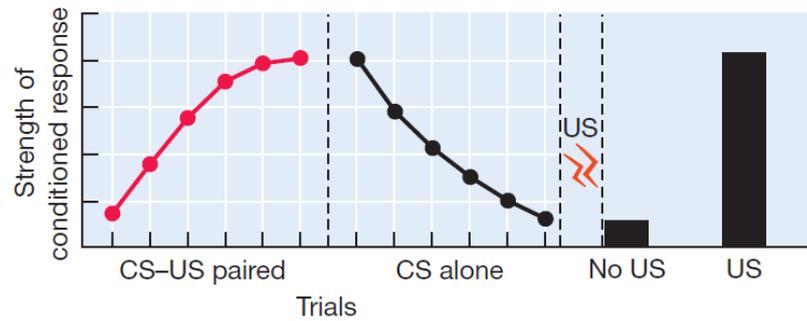
(A) Spontaneous recovery



(B) Renewal effect



(C) Reinstatement effect



**Figura 2 - Fenômenos de recuperação da resposta condicionada após extinção.** (A) A recuperação espontânea das CR ocorre com o passar do tempo após a extinção na ausência de qualquer treinamento adicional. A magnitude da recuperação aumenta com a duração do intervalo entre a extinção e o teste. (B) O *renewaleffect* pode ocorrer quando o animal passa pela extinção em um contexto B diferente ao contexto A que ele foi condicionado. Se testado no contexto A, o animal pode apresentar a resposta condicionada. (C) a reapresentação do US no contexto em que ocorreu o treino pode restabelecer a capacidade do CS de evocar uma resposta condicionada (RUDY, 2014).

## ISOLAMENTO SOCIAL

A conexão social é uma necessidade inata de alguns animais, vital para a sobrevivência. Para manter a socialização, existe um sistema homeostático, evolutivamente conservado, com o fim de alertar o indivíduo para a ausência da conexão social e coordenar mecanismos efetores para restabelecer o contato social. O isolamento social (SI) é uma ameaça a essa homeostasia, pois nessas situações os indivíduos carecem de proteção contra predadores, assistência durante a caça, apoio na criação da prole, oportunidades de brincadeiras sociais e perspectivas de acasalamento (LEE; CHEN; TYE, 2021).

Como espécie social, os humanos também dependem de um ambiente social seguro para sobreviver e prosperar. Déficits na quantidade ou qualidade subjetiva do contato social, exclusão social, discriminação ou sentimento de solidão podem ser interpretados como estressores que induzem esforços para manter o contato social e prevenir as consequências do isolamento (MATTHEWS; TYE, 2019).

O isolamento social afeta diferentes comportamentos e processos cerebrais em roedores, principalmente quando ocorrem na fase de desmame (MATSUMOTO et al., 2019; WALKER et al., 2019). Animais submetidos ao isolamento social apresentam hiperatividade em novos ambientes, diminuição do desempenho em tarefas de aprendizagem e memória (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019), e hiper-

reatividade a situações estressantes que potencializa comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo (MA et al., 2011).

Da mesma forma, em humanos, o isolamento social está correlacionado com déficits na saúde mental (CACIOPPO et al., 2006) e física (CACIOPPO et al., 2011; HAWKLEY et al., 2006), aumento da morbidade e mortalidade por câncer e doenças cardiovasculares (HAWKLEY; CACIOPPO, 2003), gravidade dos sintomas em resposta às viroses (LEROY et al., 2017), respostas inflamatórias (BALTER et al., 2019) e taxas de mortalidade mais altas (HOLT-LUNSTAD; SMITH; LAYTON, 2010; STEPTOE et al., 2013).

Dessa forma, este estudo investigou se o isolamento social pode influenciar a memória de medo, de modo que afete seu destino depois de evocada. Ou seja, se o isolamento social pode facilitar ou prejudicar sua formação, o que leva aos distúrbios emocionais supracitados, ou à falha no processo evolutivo que altera a extinção de uma memória aversiva.

## JUSTIFICATIVA

A memória emocional é um componente cognitivo que influencia o comportamento de humanos e de outros vertebrados. Especificamente, a memória de medo se trata de uma habilidade que nos permite recordar e evitar adversidades futuras, exibindo grande relevância para nossa sobrevivência. No entanto, apesar de sua importância, sua permanência e evocação por períodos prolongados e em situações não aversivas podem caracterizar distúrbios de ansiedade, tornando-se um atributo mal adaptativo, tal qual ocorre em pessoas que apresentam PTSD (GRAHAM; MILAD, 2011);

Acredita-se que a formação de grupos sociais tenha sido uma importante estratégia evolutiva, assim, qualquer fator que altere as interações sociais como o isolamento social, poderá impactar esses indivíduos. De fato, evidências mostram que o isolamento social afeta negativamente tanto humanos quanto roedores de laboratório, causando efeitos deletérios especialmente em funções cognitivas e emocionais, como prejuízo no aprendizado, memória e transtornos afetivos (GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016; VÕIKAR et al., 2004).

Portanto, considerando as consequências debilitantes do isolamento social e da solidão, o apoio social deve ser cada vez mais, uma consideração primária nos cuidados de saúde, prevenção de doenças e recuperação. Assim, estudos como o presente trabalho são relevantes para compreender e frisar a importância que o apoio social tem no ser humano que vive um evento traumático.

## OBJETIVO

Avaliar se o isolamento social afeta a extinção da memória de medo condicionado ao contexto e a memória de medo condicionado ao tom em camundongos machos e fêmeas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar se o isolamento social afeta a consolidação e a extinção da memória de medo, após condicionamento clássico contextual com 3 pareamentos CS-US;
- b) Avaliar se o isolamento social afeta a consolidação e extinção da memória de medo, após condicionamento clássico contextual com 1 pareamento CS-US;
- c) Avaliar se o isolamento social afeta a consolidação e extinção da memória de medo, após condicionamento clássico auditivo com 1 pareamento CS-US;
- d) Avaliar se o isolamento social possui efeito sobre o fenômeno da recuperação espontânea da memória de medo contextual e auditiva;
- e) Verificar o efeito do isolamento social na atividade exploratória e no comportamento tipo ansiedade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

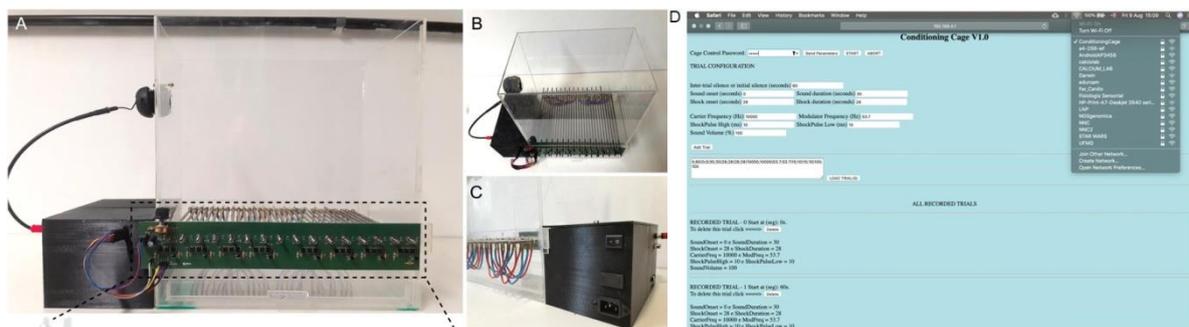
Foram utilizados camundongos machos e fêmeas C57BL/6 com idade entre 8 a 12 semanas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos foram alocados em gaiolas (28x17x12cm) contendo maravalha e tiveram livre acesso à ração e água. As gaiolas foram mantidas em estantes ventiladas localizadas no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica (BICBIO-2). Nesta sala, há controle de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade (40-70%) e ciclo claro-escuro 12/12 horas (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h). Todos os experimentos realizados neste trabalho estão em conformidade com o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, CEUA/UFMG (Protocolo 251/2020).

Os animais socialmente isolados (SI) foram alocados individualmente em gaiolas semelhantes às descritas anteriormente, pelo período de pelo menos 7 dias, e foram submetidos às mesmas condições que os animais agrupados (GH).

## TESTES COMPORTAMENTAIS

### Caixa de condicionamento ao medo

Utilizamos uma caixa de condicionamento fabricada em nosso laboratório (AMARAL-JÚNIOR et al., 2019) (Figura 3), mantida no interior de uma caixa de isolamento acústico (530 x 650 x 500 mm, Insigth). O piso da caixa de condicionamento contém 16 barras cilíndricas de aço inoxidável (250 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro cada) dispostas em paralelo, espaçadas 20 mm entre si. As paredes em acrílico permitem colocação de padrões de preto e branco, para caracterizar diferentes contextos. O som foi gerado a partir de conversor digital-analógico usando ArduinoDue e transmitido via auto-falante acoplado à caixa. Para capturar o comportamento do animal, uma câmera era posicionada sobre a caixa de condicionamento. O comportamento de congelamento (do inglês *freezing* - ausência de movimentos, exceto os respiratórios) foi contabilizado pelo programa X-Plo-Rat® (2005).



**Figura 3 - Caixa de condicionamento.** (A) Visão anterior da caixa. (B) Visão superior da caixa. (C) Visão posterior da caixa. (D) Interface em HTML que controla remotamente a caixa de condicionamento (Adaptada de AMARAL-JÚNIOR et al., 2019).

### Condicionamento ao medo contextual

O protocolo de condicionamento ao medo consistiu de quatro fases (Figura 4): treino, sessão de extinção, teste da extinção e recuperação espontânea. Durante o treino, os animais foram colocados na caixa de condicionamento por 120s (contexto como estímulo condicionado – CS) e logo após receberam um choque nas patas (estímulo incondicionado – US) de 2s de duração e 0.7mA de intensidade. Os animais permaneceram na caixa por mais 60s antes de retornarem à gaiola. Este protocolo foi denominado de 1US. No protocolo denominado 3US, após o primeiro choque, os animais receberam mais 2 choques, com intervalo de 30s entre cada um. Após o último choque, os animais permaneceram na caixa por mais 60s antes de retornarem à gaiola (PEREIRA et al., 2019).

Vinte e quatro horas depois, na sessão de extinção, os animais foram reexpostos ao mesmo contexto por 20 minutos. E 24h após, no teste de extinção, os animais foram novamente expostos ao mesmo contexto, porém por apenas 5 minutos. Já o teste da recuperação espontânea, com mesma duração, foi realizado 21 dias após o teste da extinção.

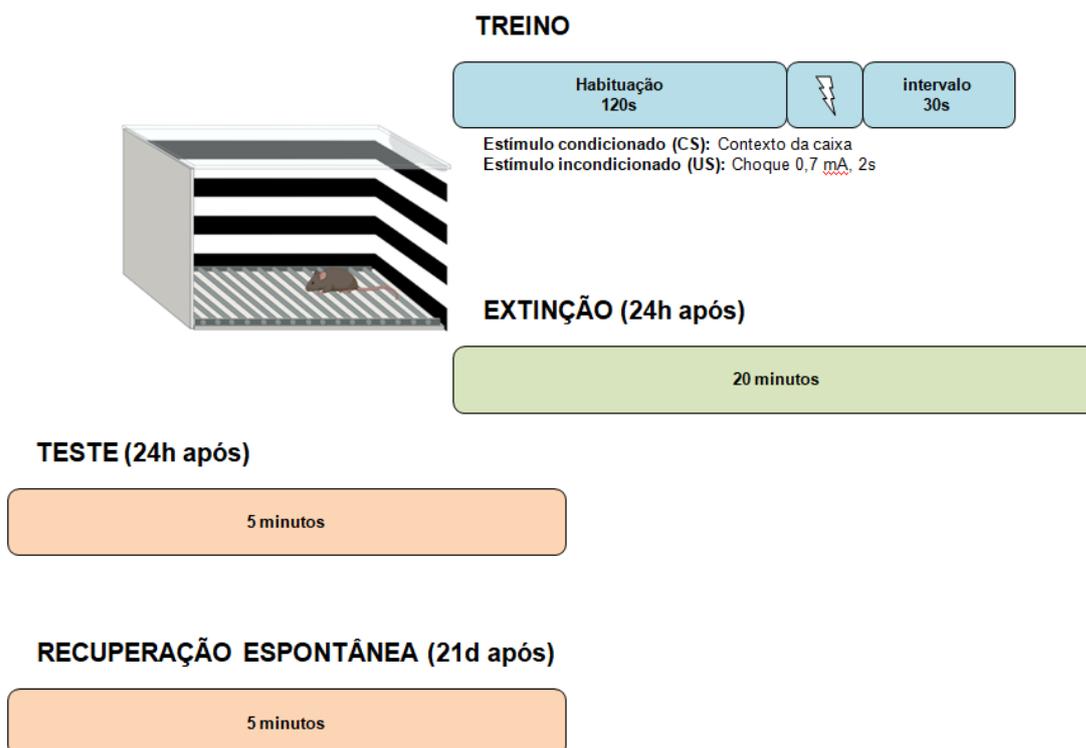


Figura 4 - Imagem ilustrativa do protocolo de condicionamento ao medo contextual.

#### Condicionamento ao medo auditivo

O protocolo de condicionamento ao tom iniciou por uma habituação de 120s (contexto A: paredes transparentes) seguida por 30s de exposição ao tom de 1KHz (estímulo condicionado, CS), sendo que nos últimos 2 segundos o tom foi pareado com um choque de 0.7mA (estímulo incondicionado, US). Após o choque, o animal permaneceu por mais 60s na caixa, antes de ser devolvido à gaiola. Este protocolo foi denominado de 1CS-US. O protocolo denominado 3CS-US, seguiu da mesma maneira, sendo que os animais tiveram um intervalo de 90s entre os choques. Após o 3º choque, os animais permaneceram na caixa por 60s antes de retornarem à gaiola.

Vinte e quatro horas após o condicionamento, os animais foram submetidos à sessão de extinção, a qual ocorreu em um contexto B (paredes listradas em preto e branco). Após 120s de habituação na caixa de condicionamento, iniciou o protocolo de extinção da memória que consistiu na apresentação de 20 tons com duração de 30s cada (CS), com intervalos de 90s entre eles. 24h após a sessão de extinção, os animais passaram pelo teste da extinção, que foi semelhante à sessão de extinção, porém com 5 apresentações do tom. O teste da recuperação

espontânea foi realizado 21 dias após o teste da extinção, seguindo o mesmo protocolo (figura 5).

Os contextos diferiram pela cor (parede transparente ou listrado), padrão da grade (piso da caixa ou grade em arames cruzados) no chão e odor (álcool 70% ou ácido acético 0,01%) (PEREIRA et al., 2019).

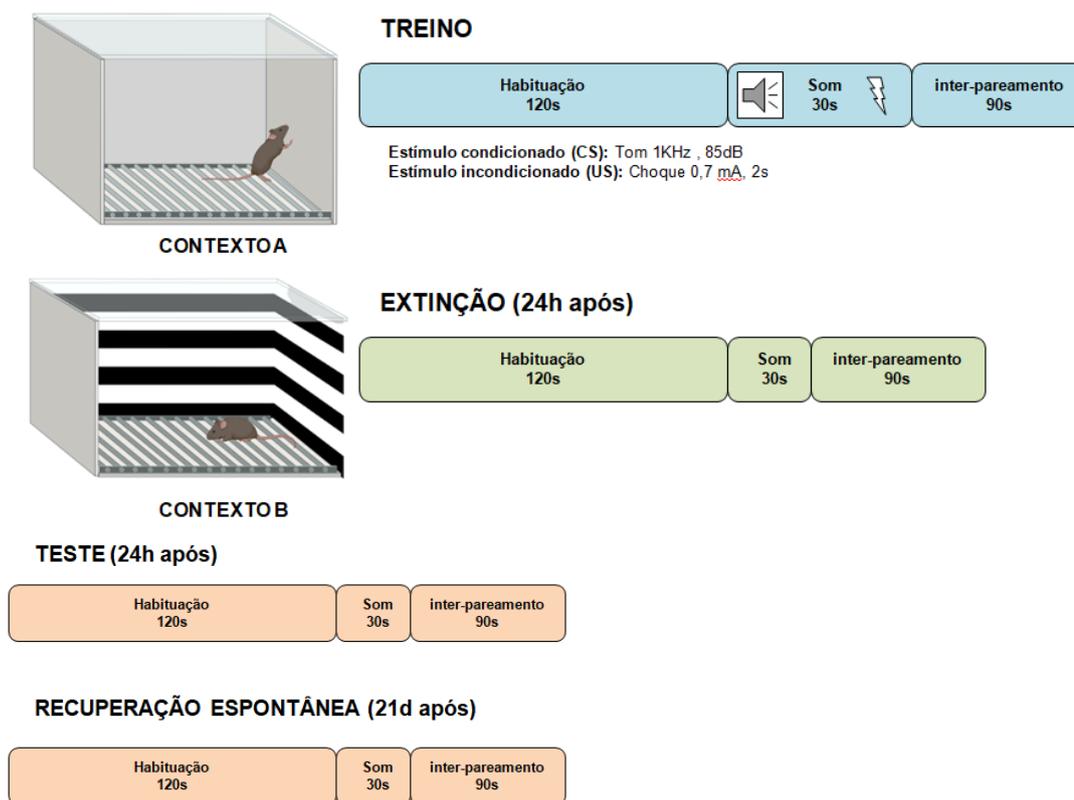
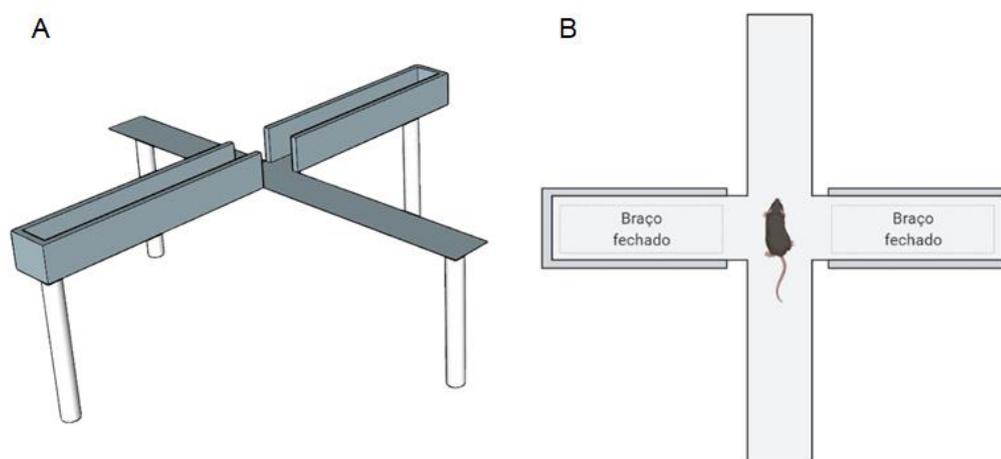


Figura 5 - Imagem ilustrativa do protocolo de condicionamento ao medo auditivo.

### Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz é feito de acrílico, fica elevado a 45 cm do solo e tem dois braços abertos opostos (30 cm comprimento e 5 cm de largura) e dois fechados, também opostos (30cm de comprimento, 5cm de largura e 15cm de altura) (figura 6). Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato, com a cabeça posicionada para um dos braços abertos. O ambiente foi iluminado por luz branca com intensidade entre 22-30 lux. Por 5 minutos, os camundongos puderam explorar livremente o labirinto, sendo que seu comportamento foi gravado por uma câmera de vídeo colocada a 90° do aparato. O labirinto foi higienizado com álcool 70% antes e entre cada animal. O tempo de permanência nos braços abertos,

fechados e no centro do labirinto foi mensurado utilizando o programa X-Plo-RatR (2005). Nesse teste, o conflito do animal se dá pela aversão das áreas abertas em relação ao instinto natural dos roedores em explorar um ambiente novo. A premissa é de que animais com fenótipo do tipo-ansioso ficam menos tempo nos braços abertos do labirinto (HANDLEY; MITHANI, 1984).

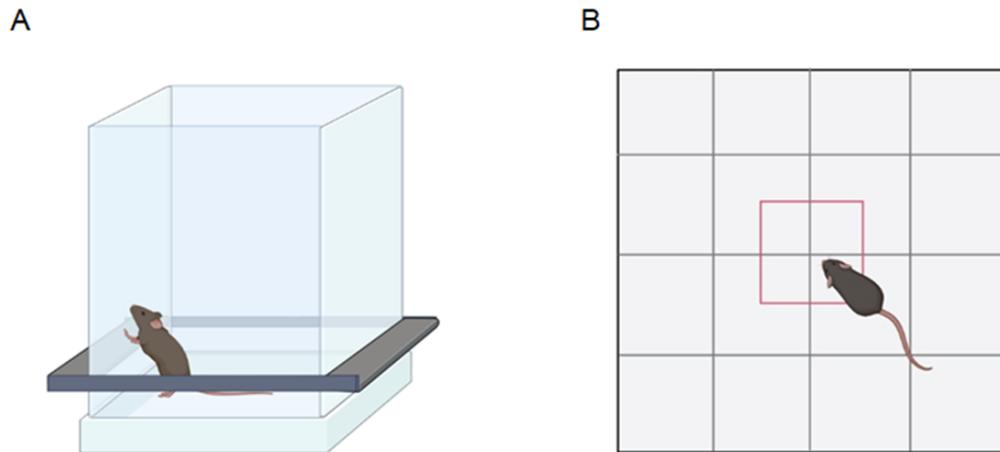


**Figura 6 - Labirinto em cruz elevado.** (A) Imagem representativa do aparato. (B) Vista utilizada na análise do teste, com delimitação das áreas do aparato.

### Campo aberto

Utilizamos um sistema automatizado (Actitrack v2.7.13.) para mensurar a atividade locomotora e exploratória dos animais. O aparato consiste em uma arena de acrílico acoplada a um sistema externo de infravermelho (25 x 25 cm) (figura 7), o qual permite monitorar a distância total (em centímetros) percorrida horizontalmente pelo animal, o tempo de exploração nas divisões feitas na arena (centro e periferia), e sua exploração vertical. O animal foi colocado na periferia da arena, e permaneceu explorando livremente o ambiente por 5 minutos. A arena foi higienizada com álcool 70% antes e entre cada animal. O teste possui como objetivo a avaliação da atividade locomotora dos animais, visto que qualquer alteração na integridade de sua locomoção pode acometer a avaliação real do comportamento de *freezing*, o qual é parâmetro principal avaliado no presente trabalho. Além disso, é possível a avaliação do comportamento tipo-ansioso a partir do tempo de permanência do

animal no centro da arena, com a premissa de que roedores tendem a evitar espaços abertos.

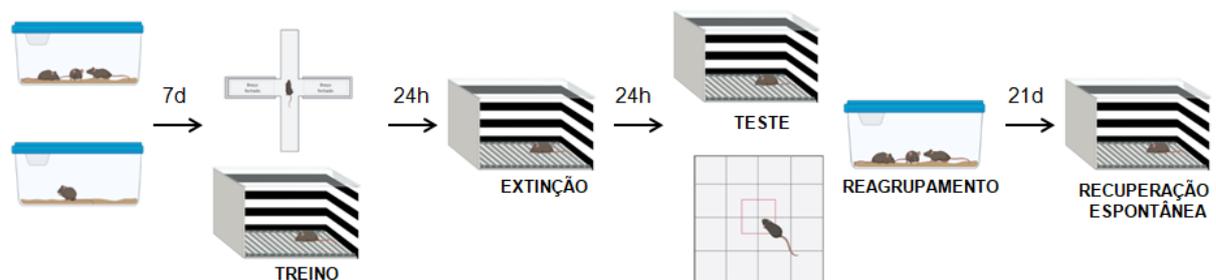


**Figura 7 - Campo aberto.** (A) Imagem representativa da caixa de locomoção. (B) Delimitação das áreas do aparato.

## DESENHO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória contextual forte?

Camundongos machos e fêmeas foram alocados em dois grandes grupos: agrupados (GH) e isolados (SI). No 8º dia pós isolamento social, todos os animais passaram pelo teste do labirinto em cruz elevado. Vinte horas depois se procedeu o condicionamento ao contexto. Logo após a sessão de teste de extinção, foi realizado o teste campo aberto. E imediatamente após os animais isolados foram reagrupados. Vinte e um dias depois, os animais foram testados para recuperação espontânea da memória de extinção (figura 8).



**Figura 8 - Desenho experimental do condicionamento de memória de medo contextual forte.**

Experimento 2: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória contextual fraca?

Outro grupo de animais, machos e fêmeas, foi submetido aos protocolos comportamentais do teste labirinto em cruz elevado, condicionamento ao contexto e teste de locomoção (figura 9). Os animais foram subdivididos em dois grupos: animais que não seriam submetidos ao treino (naïve), e animais que receberiam 1 choque nas patas (1 US).

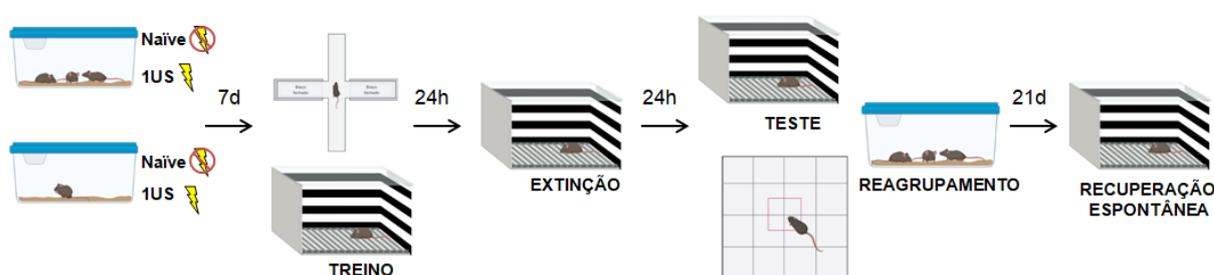
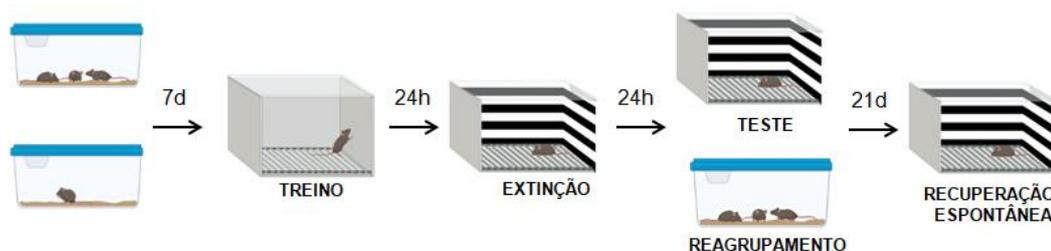


Figura 9 - Desenho experimental do condicionamento de memória de medo contextual fraca.

Experimento 3: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória de medo auditivo forte?

O protocolo experimental foi realizado apenas em machos devidos aos resultados encontrados nos experimentos anteriores.

O isolamento social durou 7 dias, sendo no 8º dia o teste do labirinto em cruz elevado e o treino forte (3US) de condicionamento ao medo por som. Nos dias seguintes ocorreu a sessão de extinção e teste da extinção (figura 10). Após o teste, os animais isolados foram reagrupados. 21 dias após o dia do teste de extinção os animais passaram pelo teste da recuperação espontânea.



**Figura 10 - Desenho experimental do condicionamento de memória de medo auditivo, forte e fraca.**

Experimento 4: Qual o efeito do isolamento social sobre a extinção de memória de medo auditivo fraca?

Outro grupo de animais foi submetido aos mesmos testes do experimento anterior (figura 10). O protocolo utilizado no treino foi de 1 US (treino fraco). Este experimento foi realizado apenas em machos.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM (erro padrão da média). Todos os testes foram executados pelo software GraphPadPrism 8.0.2, utilizando-se nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

Para comparação dos comportamentos de *freezing* durante as sessões de extinção dos experimentos de condicionamento ao medo auditivo e contextual foi utilizado ANOVA de 2 vias, seguido pelo *post hoc* Bonferroni. Para comparação dos comportamentos de *freezing* de minuto a minuto durante os testes da extinção e teste da recuperação espontânea os dados foram comparados por ANOVA de 2 vias, e quando apontou diferença significativa entre os grupos foi utilizado o *post hoc* de Bonferroni. Para comparação das médias dos resultados do teste de extinção e recuperação espontânea utilizou-se o teste-t não-pareado ou ANOVA de uma via, quando houve mais de 2 grupos, seguido pelo *post hoc* Bonferroni.

Nos experimentos de campo aberto, labirinto em cruz elevado e comparação de comportamento entre machos e fêmeas as médias dos grupos foram comparadas por teste-t não-pareado.

## RESULTADOS

### EM MACHOS, O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 3US

A fim de verificar se os animais aprenderam a tarefa de condicionamento, analisou-se os 5 primeiros minutos da sessão de extinção. Como representado na figura 11-A, nos 4 primeiros minutos da sessão os animais apresentaram percentagem de *freezing* entre 30 e 60% (GH:  $36,73 \pm 4,10\%$ ; SI:  $39,12 \pm 3,64$ ), sugerindo sucesso no aprendizado. A ANOVA de 2 vias mostrou efeito do fator “tempo” ( $F_{2,663,45.26}=12,97$ ;  $P<0,0001$ ), porém não identificou diferença significativa entre os grupos ( $F_{1,17}=0,1852$ ;  $P=0,6723$ ), ou interação entre esses fatores ( $F_{4,68}=0,6381$ ;  $P=0,6371$ ).

No decorrer dos minutos seguintes da sessão de extinção, observou-se um decaimento da percentagem de *freezing* de ambos os grupos (figura 11-B). O teste ANOVA de 2 vias mostrou efeito significativo do fator tempo em relação à percentagem de *freezing* dos animais ( $F_{6,261,106.4}=16,95$ ;  $P<0,0001$ ), ou seja, esta diminuiu com o passar do tempo. Entretanto, os dois grupos comportaram-se de maneira similar, não havendo efeito do fator agrupamento ( $F_{1,17}=0,4580$ ;  $P=0,5076$ ), ou interação entre os fatores ( $F_{19,323}=0,6473$ ;  $P=0,8685$ ). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni encontrou diferenças de percentagem de *freezing* dentro do grupo isolado a partir do minuto 8, comparados com o minuto 1, o que também é um indicativo de uma sessão de extinção bem-sucedida.

Para verificar se os animais aprenderam a extinção, e se houve diferença entre os grupos, foi realizado o teste da extinção. Na análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* de cada grupo de animais (figura 11-C), tanto os animais agrupados ( $9,33 \pm 2,40\%$ ) quanto os animais isolados ( $4,92 \pm 1,52\%$ ) apresentaram taxas mais baixas comparadas com a sessão de extinção, sugerindo, novamente, que a sessão de extinção foi bem sucedida para ambos os grupos. Ainda, a comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste (Figura 11-D) mostrou que não houve efeito do fator agrupamento ( $F_{1,17}=2,290$ ;  $P=0,1486$ ) e tempo ( $F_{2,127,36.15}=3,010$ ;  $P=0,0588$ ), ou interação entre os fatores ( $F_{4,68}=0,7381$ ;  $P=0,5693$ ).

Com o intuito de analisar a ocorrência do fenômeno da recuperação espontânea da memória e uma possível interferência do isolamento social nesta, foi realizado novamente um teste 21 dias após o teste de extinção. A partir da análise teste-t não-pareado, percebe-se um aumento da porcentagem de *freezing* de ambos os grupos em relação ao teste da extinção (GH:  $17,92 \pm 3,67\%$ ; SI:  $19,17 \pm 5,04\%$ ) (Figura 11-E). A análise por ANOVA de 2 vias detectou efeito do fator tempo ( $F_{2,559,43.50} = 8,601$ ;  $P = 0,0003$ ), porém os níveis de *freezing* não diferiram entre os grupos ( $F_{1, 17} = 0,04127$ ;  $P = 0,8414$ ), e não houve interação entre os fatores ( $F_{4,68} = 1,539$ ;  $P = 0,2008$ ) (Figura 11-F).

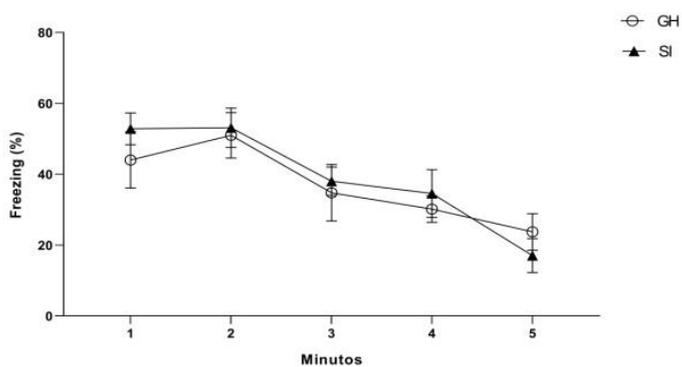
A fim de analisar os dados como um todo, as relações entre eles e a conclusão deste experimento, foram comparados tempos específicos de cada teste: os primeiros 5 minutos e últimos 5 minutos da sessão de extinção, o teste da extinção e o teste da recuperação espontânea (Figura 11-G). Essa análise foi feita por ANOVA de 2 vias cujos fatores foram agrupamento e os tempos específicos citados acima. Como esperado, considerando os dados anteriores, não foi encontrado efeito do fator “agrupamento” ( $F_{1,68} = 0,04054$ ;  $P = 0,8410$ ), todavia, houve efeito do fator “tempo” ( $F_{3,68} = 29,78$ ;  $P < 0,0001$ ).

O teste de comparações múltiplas de Bonferroni, utilizado para verificar quando ocorreram essas diferenças, revelou diferenças estatísticas significativas para a conclusão desse experimento. Ambos os grupos apresentaram porcentagem de *freezing* estatisticamente distintas entre os 5 primeiros minutos da sessão de extinção e os 5 últimos minutos (GH:  $P = 0,0001$ ; SI:  $P < 0,0001$ ). Ainda, não ocorreu essa distinção entre os últimos minutos da sessão de extinção comparados com o teste da extinção (GH:  $P > 0,9999$ ; SI:  $P > 0,9999$ ). Considerando que ao longo da sessão de extinção os animais tendem a diminuir o *freezing*, e também tendem a demonstrar esse aprendizado no teste no dia seguinte, esses dados corroboram para a conclusão de que houve aprendizado do condicionamento e da extinção em ambos os grupos, porém sem diferença entre eles.

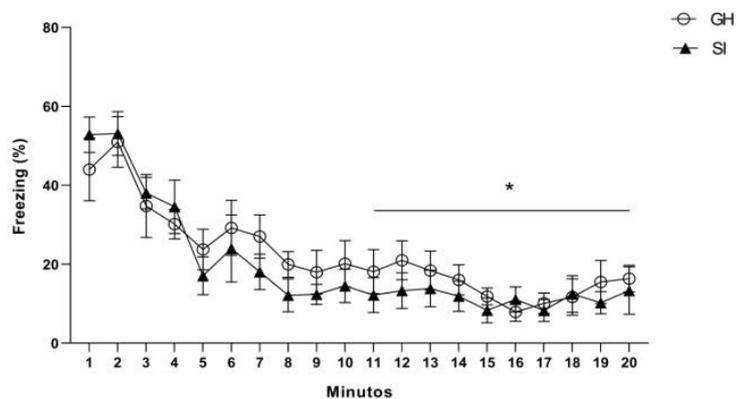
No teste da recuperação espontânea, ambos os grupos de animais tiveram a média de *freezing* maior (GH:  $17,92 \pm 3,67$ ; SI:  $19,17 \pm 5,04$ ) comparado com a média no teste da extinção (GH:  $9,33 \pm 2,40$ ; SI:  $4,92 \pm 1,52$ ), entretanto essa diferença não atingiu significância estatística (GH:  $P > 0,9999$ ; SI:  $P = 0,1909$ ). Esperava-se que com a ocorrência do fenômeno da recuperação espontânea houvesse diferença significativa entre os comportamentos nesses testes. Sendo assim, esses dados

apontam que não houve recuperação espontânea da memória de medo desses animais.

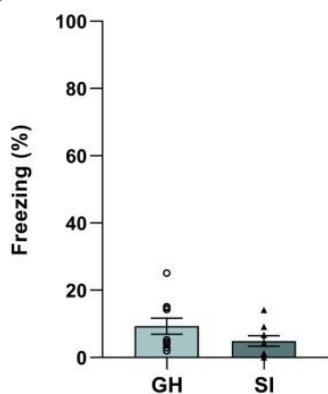
A



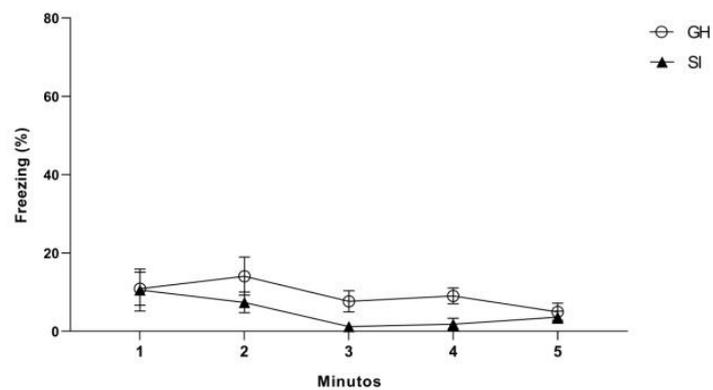
B



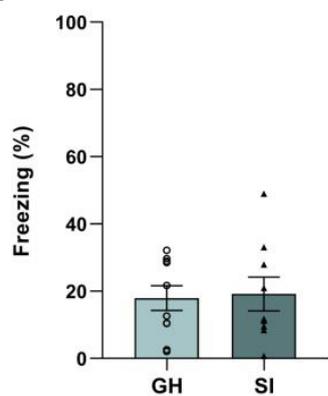
C



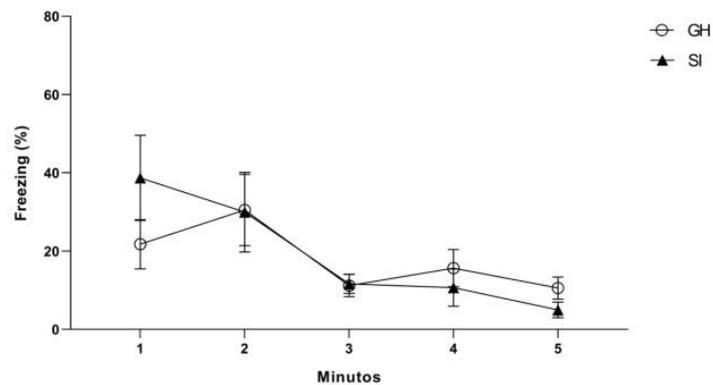
D



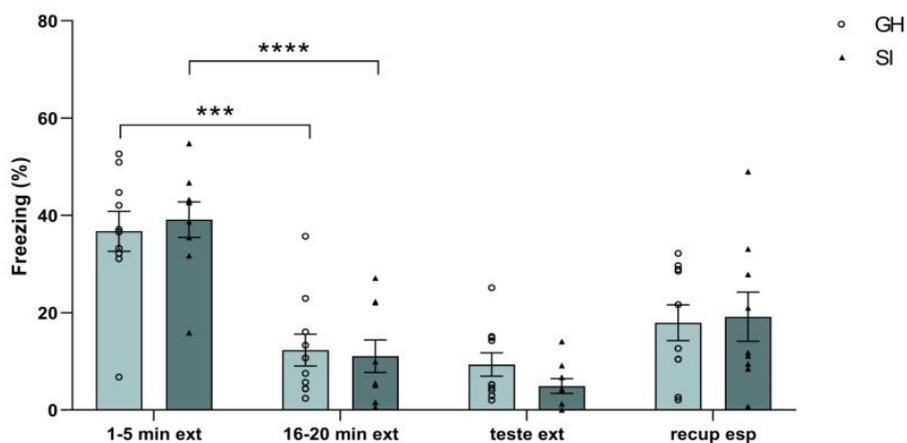
E



F



G



**Figura 11 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em machos, com 3 US.** Analisou-se expressão de *freezing* durante o experimento. (A) Análise durante os 5 primeiros minutos da sessão de extinção. (B) Análise durante toda a sessão de extinção. (C) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da extinção. (D) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste de extinção. (E) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da recuperação espontânea. (F) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste da recuperação espontânea. (G) Comparação geral entre momentos específicos de cada experimento. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Comparações múltiplas de Bonferroni. GH n=10; SI n=9. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## EM FÊMEAS, O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 3US

A fim de posterior comparação dos comportamentos entre os sexos, os mesmo experimentos e análises foram realizados em camundongos fêmeas.

A análise por ANOVA de 2 vias não demonstrou diferença significativa de *freezing* entre os grupos isolado e agrupado ( $F_{1, 18} = 0,7848$ ;  $P = 0,3874$ ) durante os 5 primeiros minutos da sessão de extinção (Figura 12-A). Todavia, ambos os grupos apresentaram nível de *freezing* considerável nesse tempo (GH:  $45,22 \pm 5,49\%$ ; SI:  $37,92 \pm 6,15\%$ ), indicando aprendizado da tarefa de condicionamento.

Para a análise da sessão de extinção, os grupos foram comparados por ANOVA de 2 vias com medidas repetidas cujos fatores foram “agrupamento” e “tempo”. Não foi encontrada interação entre os fatores ( $F_{19, 342} = 0,6130$ ;  $P = 0,8966$ ) ou efeito do fator “agrupamento” ( $F_{1, 18} = 0,7531$ ;  $P = 0,3969$ ), entretanto houve efeito do “tempo” ( $F_{5, 678, 102,2} = 18,73$ ;  $P < 0,0001$ ). Embora ambos os grupos tenham apresentado decaimento do *freezing* ao longo dos 20 minutos, com *freezing* do último minuto reduzido (GH:  $7,70 \pm 3,06$ ; SI:  $8,39 \pm 2,29$ ) comparado ao *freezing* do primeiro minuto (GH:  $42,87 \pm 5,45$ ; SI:  $42,11 \pm 7,95$ ), o teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou que muitas dessas comparações dos tempos não atingiram significância (Figura 12-B).

Com o intuito de averiguar, por fim, o aprendizado da extinção, e a possível distinção comportamental entre os grupos, foi realizado o teste no dia seguinte. Apesar de o grupo isolado ter exibido maior *freezing* durante todo o teste, a análise por teste-t não-pareado mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos ( $P = 0,1922$ ) (Figura 12-C e D). Ainda, ambos os grupos mostraram aumento na percentagem de *freezing* (GH:  $14,69 \pm 4,52$ ; SI:  $23,05 \pm 4,20$ ), comparados com o

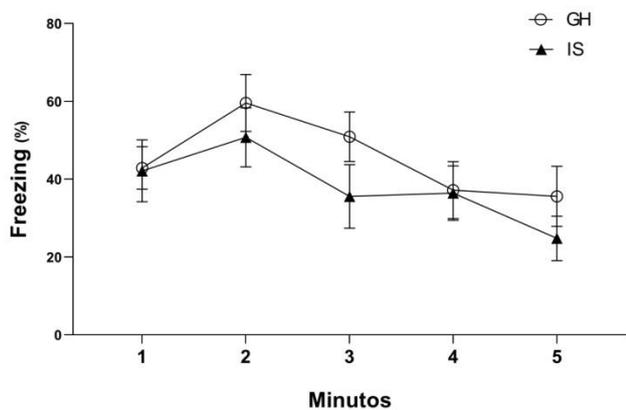
minuto final da sessão de extinção. A comparação por ANOVA de 2 vias de cada minuto do teste não identificou efeito do fator “tempo” ( $F_{2,075, 37,35}=2,548$ ;  $P=0,0899$ ).

No teste da recuperação espontânea observou-se efeito do fator “tempo” ( $F_{3,146,56,63}= 3,953$ ;  $P=0,0114$ ), mas não do “agrupamento” ( $F_{1,18}=0,7368$ ;  $P=0,4020$ ) ou interação entre os fatores ( $F_{4, 72}=0,1500$ ;  $P=0,9624$ ). Porém, o teste de comparações múltiplas de Bonferroni não identificou distinção significativa quando comparado o *freezing* em cada minuto do experimento (Figura 12 E-F).

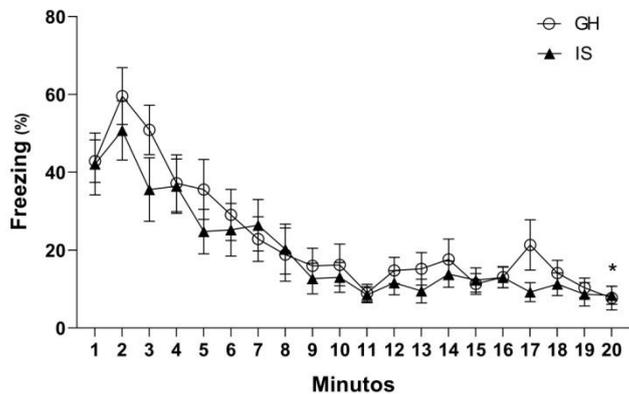
Comparando momentos específicos de cada teste, a fim de levantar uma conclusão desse experimento, observou-se que, de modo geral, o fator “agrupamento” não mostrou efeito nas análises ( $F(1, 72) = 0,1314$ ;  $P=0,7181$ ). Em contrapartida, essa comparação por ANOVA de 2 vias apontou efeito do fator “tempo” ( $F(3, 72) = 14,17$ ;  $P<0,0001$ ). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni identificou diferença estatística entre os 5 primeiros e 5 últimos minutos da sessão de extinção de ambos os grupos (GH:  $P=0,0003$ ; SI:  $P=0,0029$ ) (figura 12-G).

É esperado, como demonstração de aprendizado da extinção, que o nível de *freezing* dos animais durante o teste seja igual ou inferior aos níveis dos últimos minutos da sessão de extinção. Não houve diferença estatística de *freezing* entre esses tempos, para ambos os grupos (GH:  $P>0,9999$ ; SI:  $P>0,9999$ ), porém, como citado anteriormente, observa-se uma elevação considerável no *freezing* dos animais isolados durante o teste (SI:  $23,05\pm 4,20$ ) quando comparado com os últimos minutos da sessão de extinção (SI:  $10,10\pm 1,91$ ). Não foi identificada diferença significativa entre o teste de extinção e o teste de recuperação espontânea de nenhum dos grupos (GH:  $P >0,9999$ ; SI:  $P>0,9999$ ).

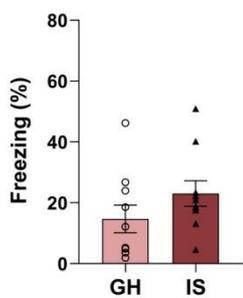
A



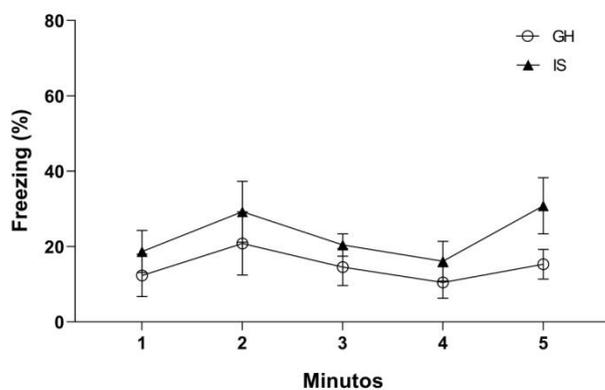
B



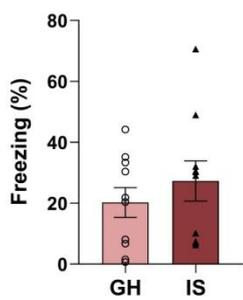
C



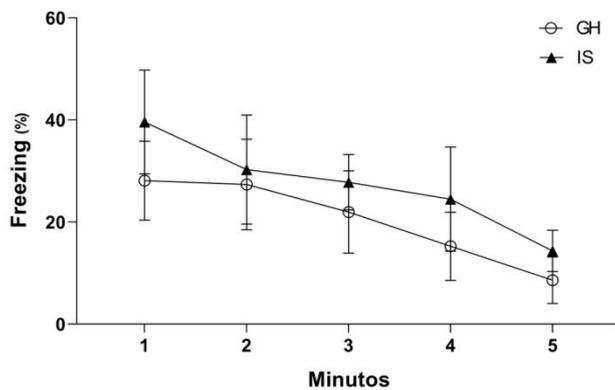
D



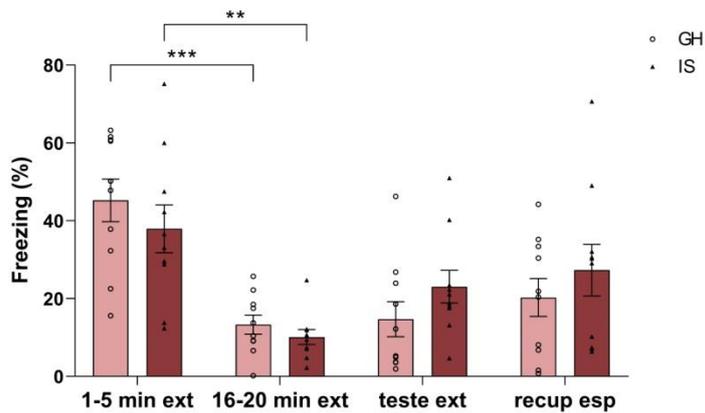
E



F



G



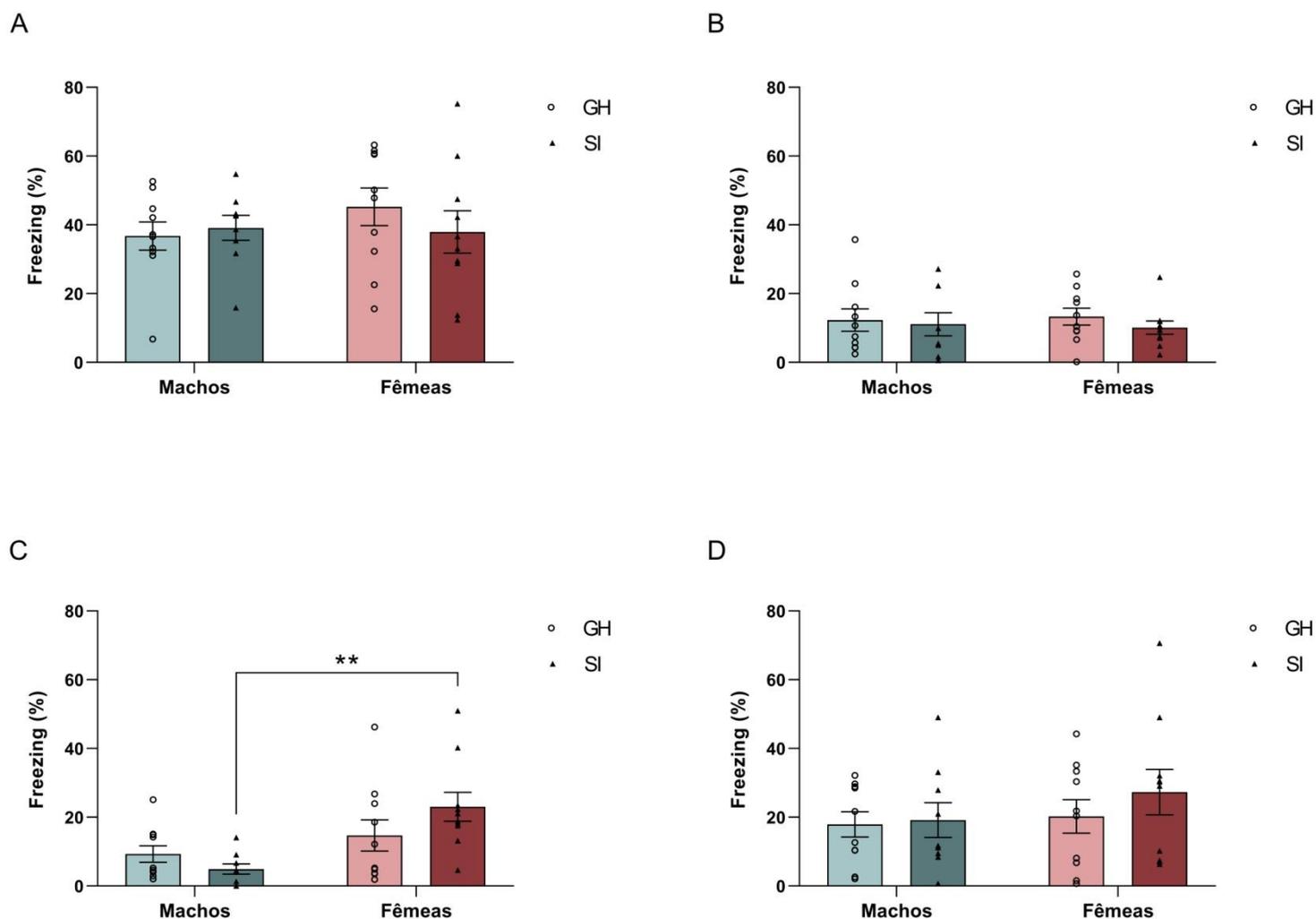
**Figura 12 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em fêmeas, com 3 US.** Analisou-se expressão de *freezing* durante o experimento. (A) Análise durante os 5 primeiros minutos da sessão de extinção. (B) Análise durante toda a sessão de extinção. (C) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da extinção. (D) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste de extinção. (E) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da recuperação espontânea. (F) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste da recuperação espontânea. (G) Comparação geral entre momentos específicos de cada experimento. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Comparações múltiplas de Bonferroni. GH n=10; SI n=10. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## EM COMPARAÇÃO COM OS MACHOS, FÊMEAS ISOLADAS SOCIALMENTE APRESENTAM MEDO ELEVADO NO TESTE DA EXTINÇÃO, APÓS PROTOCOLO DE 3US

Com a finalidade de verificar se existe influência do sexo na extinção da memória de medo de animais isolados socialmente, analisou-se novamente cada etapa dos experimentos citados anteriormente (itens 5.1 e 5.2).

A comparação por ANOVA de 2 vias não demonstrou efeito do fator “sexo” nos 5 primeiros minutos ( $F_{1,35}=0,5276$ ;  $P=0,4724$ ) (figura 13-A) ou 5 últimos minutos da sessão de extinção ( $F_{1,35}=1,830e-005$ ;  $P=0,9966$ ) (figura 13-B), tampouco no teste da recuperação espontânea ( $F_{1,35}=1,021$ ;  $P=0,3192$ ) (figura 13-D). Em contrapartida, houve efeito desse fator no teste da extinção ( $F_{1,35}=11,44$ ;  $P=0,0018$ ) (figura 13-C).

O teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou que esse efeito ocorreu entre o grupo de fêmeas isoladas comparado com o grupo de machos isolados ( $P=0,0052$ ) e sutilmente com machos agrupados ( $P=0,0457$ ). Esses dados corroboram com os resultados mencionados anteriormente (item 5.2) indicando uma possível falha na consolidação da memória de extinção de camundongos fêmeas isoladas.



**Figura 13 - Comparação na expressão de comportamento de *freezing* entre machos e fêmeas durante o experimento de extinção da memória de medo condicionado ao contexto, com 3 US.** (A) Análise durante os primeiros 5 minutos da sessão de extinção. (B) Análise durante os 5 últimos minutos da sessão de extinção. (C) Análise durante o teste de extinção. (D) Análise durante o teste da recuperação espontânea. Dados mostrados como média  $\pm$  SEM (2way-ANOVA; comparações múltiplas de Bonferroni.); \*\*p<0,01.

## EFEITO FACILITATÓRIO DO ISOLAMENTO SOCIAL EM MACHOS CONDICIONADOS COM O PROTOCOLO DE 1US

Durante os 5 primeiros minutos da sessão de extinção, espera-se que o animal que aprendeu a associação CS-US apresente um comportamento de medo maior em relação aos animais que não aprenderam. A partir disso, adicionou-se ao experimento animais naïve, ou seja, que não passariam pelo protocolo de condicionamento, com o intuito de corroborar a consolidação da memória associativa e de extinção dos animais condicionados, levando em conta também a variante de agrupamento.

A ANOVA de 2 vias entre os quatro grupos (GH, SI, naïve-GH e naïve-SI) encontrou efeito do fator “tempo” ( $F_{2,455,71,19}=4,324$ ;  $P=0,0115$ ) e do fator “grupo” ( $F_{3,29}=3,916$ ;  $P=0,0184$ ), mas sem interação entre eles ( $F_{12,116}=1,192$ ;  $P=0,2971$ ). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni identificou diferença significativa apenas entre os animais agrupados e ambos os grupos de animais naïve, durante o primeiro minuto (naïve-GH:  $P=0,0239$ ; naïve-SI:  $P=0,0491$ ) (figura 14-A). Os animais isolados apresentaram *freezing* mais elevado ( $20,86\pm 7,01$ ) comparado com os animais naïve (naïve-GH:  $0,32\pm 0,22$ ; naïve-SI:  $3,25\pm 1,59$ ) nesse mesmo período, porém essa diferença não atingiu significância ( $P=0,1934$ ). Ainda, a análise não demonstrou diferença entre os animais agrupados e isolados que passaram pelo condicionamento ( $P>0,9999$ ).

Assim como na análise anterior, a ANOVA de 2 vias de toda a sessão de extinção também encontrou efeito do fator “tempo” ( $F_{3,010,87,28}=4,418$ ;  $P=0,0061$ ) e do fator “grupo” ( $F_{3,29}=6,300$ ;  $P=0,0020$ ), além de interação entre eles ( $F_{57,551}=1,497$ ;  $P=0,0133$ ). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni mostrou que a diferença entre os grupos ocorreu apenas durante o primeiro minuto, citada anteriormente. Além disso, essa análise não foi capaz de identificar variação do *freezing* no decorrer do tempo, embora exista um decaimento maior, dos animais treinados, durante os 4 primeiros minutos da sessão (figura 14-B).

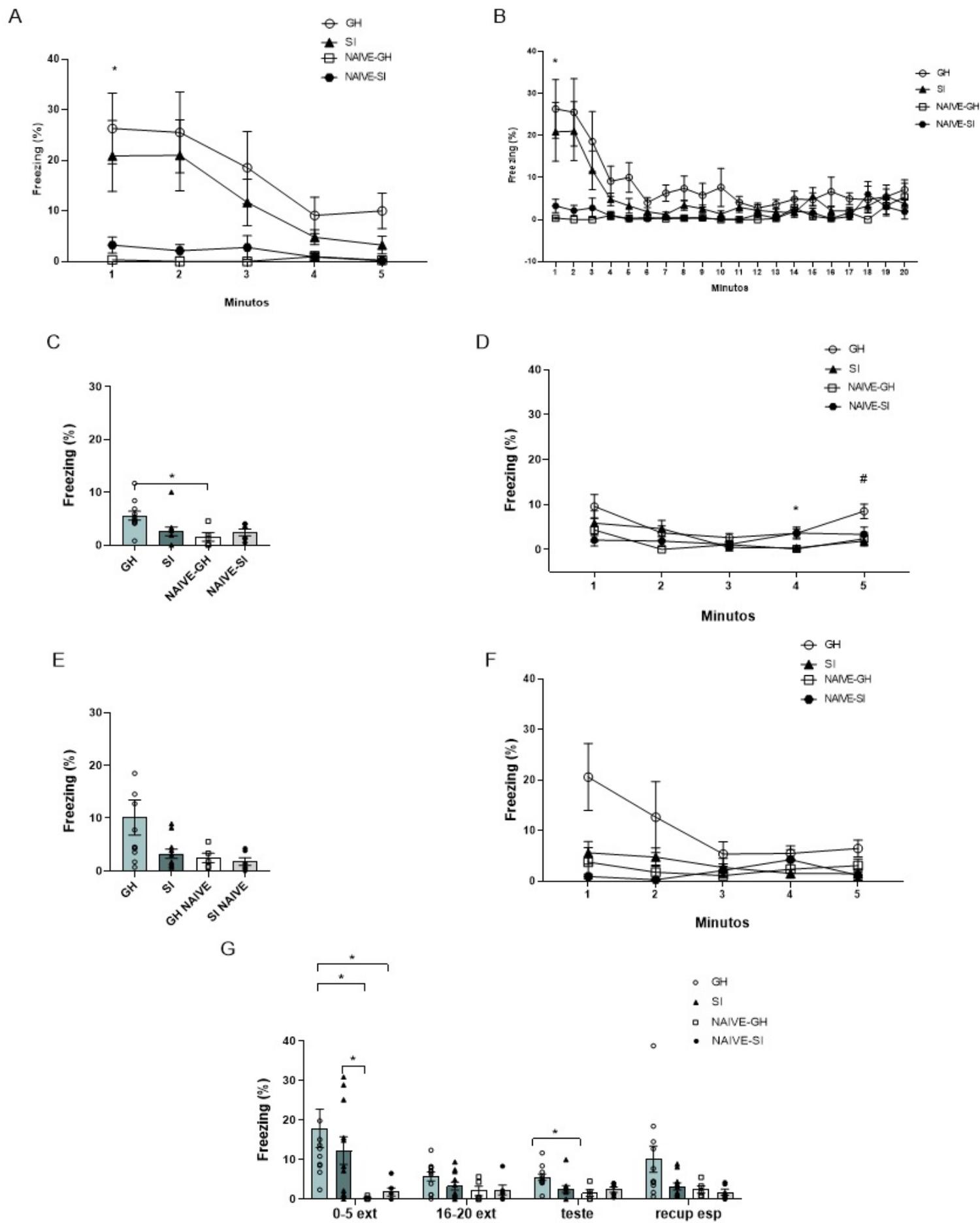
A ANOVA de uma via do teste da extinção verificou que houve diferença com significância dentre os níveis de *freezing* ( $P=0,0114$ ), a qual foi apontada sendo entre os animais agrupados e animais naïve-agrupados (comparações múltiplas de Bonferroni;  $P=0,0340$ ) (Figura 14-C). Por outro lado, percebe-se similaridade entre

os valores dos animais isolados ( $2,61 \pm 0,84$ ) comparados com animais naïve-isolados ( $2,40 \pm 0,64$ ) ( $P > 0,9999$ ).

Em adição, a análise de minuto a minuto do referido teste também detectou efeito do fator “grupo” (ANOVA de 2 vias;  $F_{3,29}=4,404$ ;  $P=0,0114$ ) e “tempo” ( $F_{2,357,68.35}=3,986$ ;  $P=0,0177$ ), mas sem interação entre eles ( $F_{12,116}=1,319$ ;  $P=0,2172$ ). Esses efeitos foram identificados entre os animais agrupados comparados com animais naïve-agrupados durante o 4º minuto ( $P=0,0350$ ), e entre os animais agrupados e isolados durante o último minuto ( $P=0,0198$ ) (figura 14-D).

A ANOVA de uma via do teste da recuperação espontânea apontou diferença significativa dos níveis de *freezing* entre os grupos ( $P=0,0462$ ), porém não foi revelada nas comparações múltiplas de Bonferroni (figura 14-E). Juntamente, a ANOVA de 2 vias da análise de minuto a minuto também mostrou efeito do fator “grupo” ( $F_{3,29}=3,009$ ;  $P=0,0462$ ), sem resultados significativos nas comparações múltiplas de Bonferroni (figura 14-F). Ainda, não houve efeito do fator “tempo” nessa análise ( $F_{1,775,51.46}=2,098$ ;  $P=0,1382$ ).

A comparação geral dos testes (figura 14-G) por ANOVA de 2 vias mostrou efeito do fator “tempo” ( $F_{1,687,48.91}=4,239$ ;  $P=0,0256$ ), “grupo” ( $F_{3,29}=5,187$ ;  $P=0,0054$ ) e interação entre eles ( $F_{9,87}=2,330$ ;  $P=0,0211$ ). Identificou novamente diferença entre os animais agrupados e ambos os grupos naïve (naïve-GH:  $P=0,0278$ ; naïve-SI:  $P=0,0478$ ), além de uma diferença entre os animais isolados e animais naïve-agrupados ( $P=0,0390$ ), a qual não foi verificada anteriormente nas análises da sessão de extinção. Também apontou uma diferença entre grupos no teste da extinção, já mencionada. Em contrapartida, a análise não identificou diferença significativa nos níveis de *freezing* entre os diferentes experimentos.



**Figura 14 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em machos, com 1 US.** Foram incluídos animais naïve no experimento. Analisou-se expressão de *freezing* durante o experimento. (A) Análise durante os 5 primeiros minutos da sessão de extinção. (B) Análise durante toda a sessão de extinção. (C) Análise da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste de extinção. (D) Comparação em cada minuto do teste de extinção. (E) Análise da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da recuperação espontânea. (F) Comparação em cada minuto do teste da recuperação espontânea. (G) Comparação geral entre momentos específicos de cada experimento. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM (2way-ANOVA; Comparações múltiplas de Bonferroni). GH n=11; SI n=11; GH-naïve n=5; SI-naïve n=6. \*  $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  diferença entre GH e SI.

## EM FÊMEAS, O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 1US

Foram realizados os mesmos experimentos e análises com camundongos fêmeas, seguindo os mesmos esquemas de grupo do item 5.4.

Foi verificado efeito do fator “tempo” (ANOVA de 2 vias;  $F_{2,434,60.85} = 6,139$ ;  $P = 0,0021$ ) e “grupo” (ANOVA de 2 vias;  $F_{3,25} = 4,153$ ;  $P = 0,0162$ ) durante os 5 primeiros minutos da sessão de extinção, porém sem interação entre eles (ANOVA de 2 vias;  $F_{12,100} = 1,242$ ;  $P = 0,2654$ ). Constatou-se esses efeitos nos 3 primeiros minutos entre *ofreezing* dos animais agrupados comparado com os animais naïve-agrupado (comparações múltiplas de Bonferroni; minuto 1:  $P = 0,0124$ ; minuto 2:  $P = 0,0495$ ; minuto 3:). Além disso, no terceiro minuto também houve diferença significativa entre os animais isolados e animais naïve-isolados (). Ademais, não foi detectada diferença entre os animais agrupados e isolados em nenhum momento (figura 15-A).

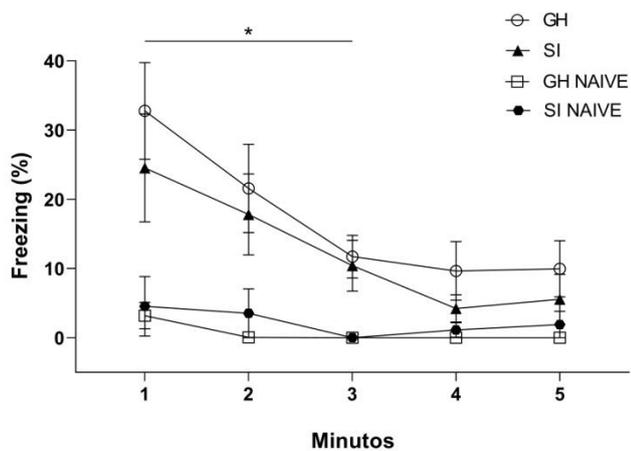
A análise de toda a sessão de extinção também mostrou efeito do fator “tempo” (ANOVA de 2 vias  $F_{4,361,109.0} = 4,963$ ;  $P = 0,0007$ ) e “grupo” ( $F_{3,25} = 3,585$ ;  $P = 0,0278$ ), com interação entre eles ( $F_{57,475} = 1,630$ ;  $P = 0,0037$ ). O teste de *posthoc* de Bonferroni revelou as mesmas diferenças observadas acima. Embora os animais isolados tenham apresentado valores de *freezing* mais elevados que os animais naïve-isolados durante os 3 primeiros minutos, essa diferença também não atingiu significância em nenhum momento (figura 15-B).

A ANOVA de 2 vias referente ao teste de extinção não apresentou efeito de nenhum fator sobre os resultados (“grupo”:  $F_{3,25} = 1,156$ ;  $P = 0,3460$ ; “tempo”: ( $F_{2,879,71.98} = 0,6726$ ;  $P = 0,5657$ ), ou seja, não ocorreu diferença com significância entre os grupos (figura 15-C e D). O mesmo aconteceu na análise dos resultados do

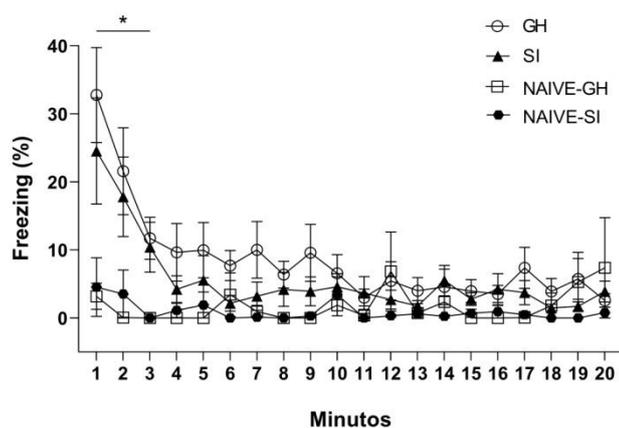
teste da recuperação espontânea, não havendo efeito do fator “tempo” ( $F_{3,071,76.78}=1,440$ ;  $P=0,2371$ ) ou “grupo” ( $F_{3,25}=1,899$ ;  $P=0,1555$ ) (figura 15-E e F).

Além das diferenças nos 5 primeiros minutos da sessão de extinção mencionadas acima, a comparação geral dos experimentos (ANOVA de 2 vias) apontou efeito do fator “tempo” ( $F_{1,811,45.28}=3,983$ ;  $P=0,0290$ ) e “grupo” ( $F_{3,25}=8,249$ ;  $P=0,0006$ ), mas sem interação entre eles ( $F_{9,75}=1,807$ ;  $P=0,0808$ ). O *posthoc* identificou essa diferença significativa entre testes dos animais agrupados. Esses animais tiveram níveis de *freezing* significativamente diferentes entre os 5 primeiros e 5 últimos minutos da sessão de extinção ( $P= 0,0468$ ), e entre os 5 primeiros minutos da extinção e o teste de extinção ( $P= 0,0343$ ).

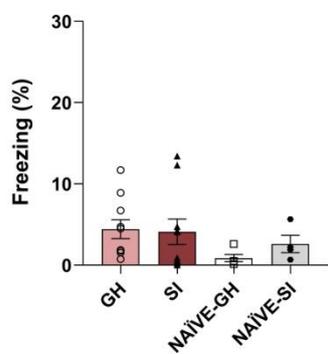
A



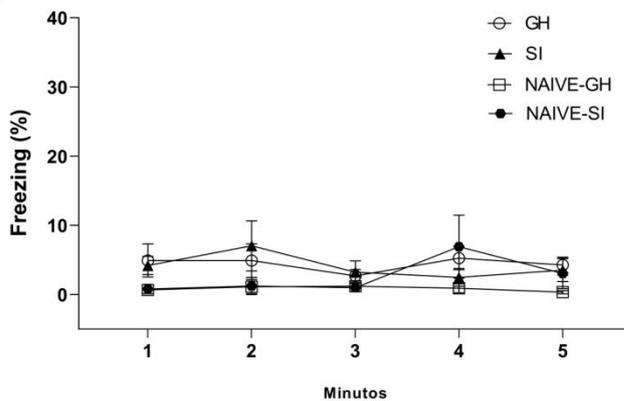
B



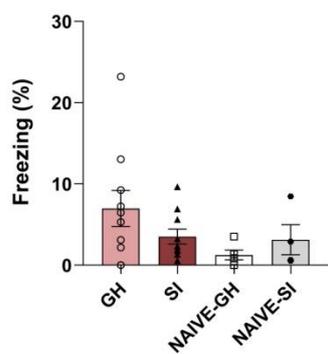
C



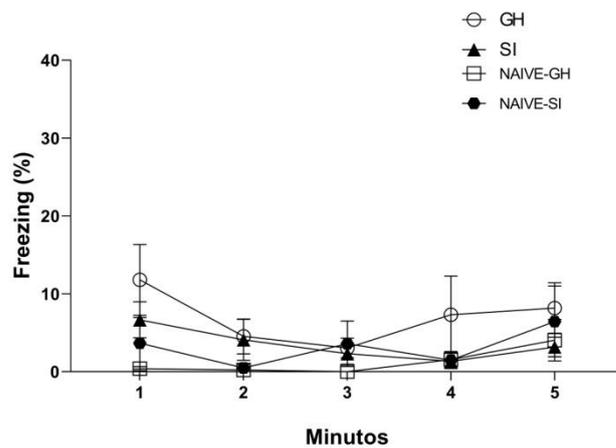
D



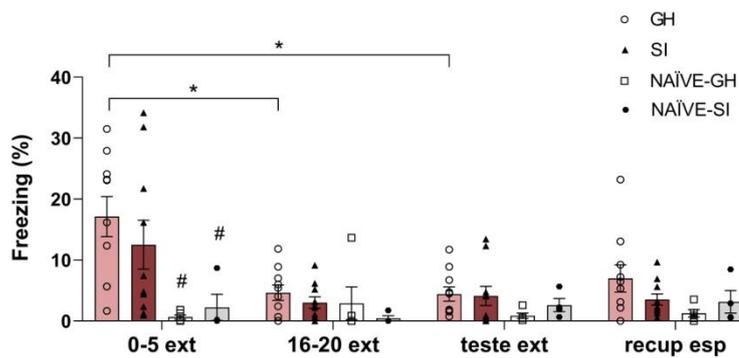
E



F



G

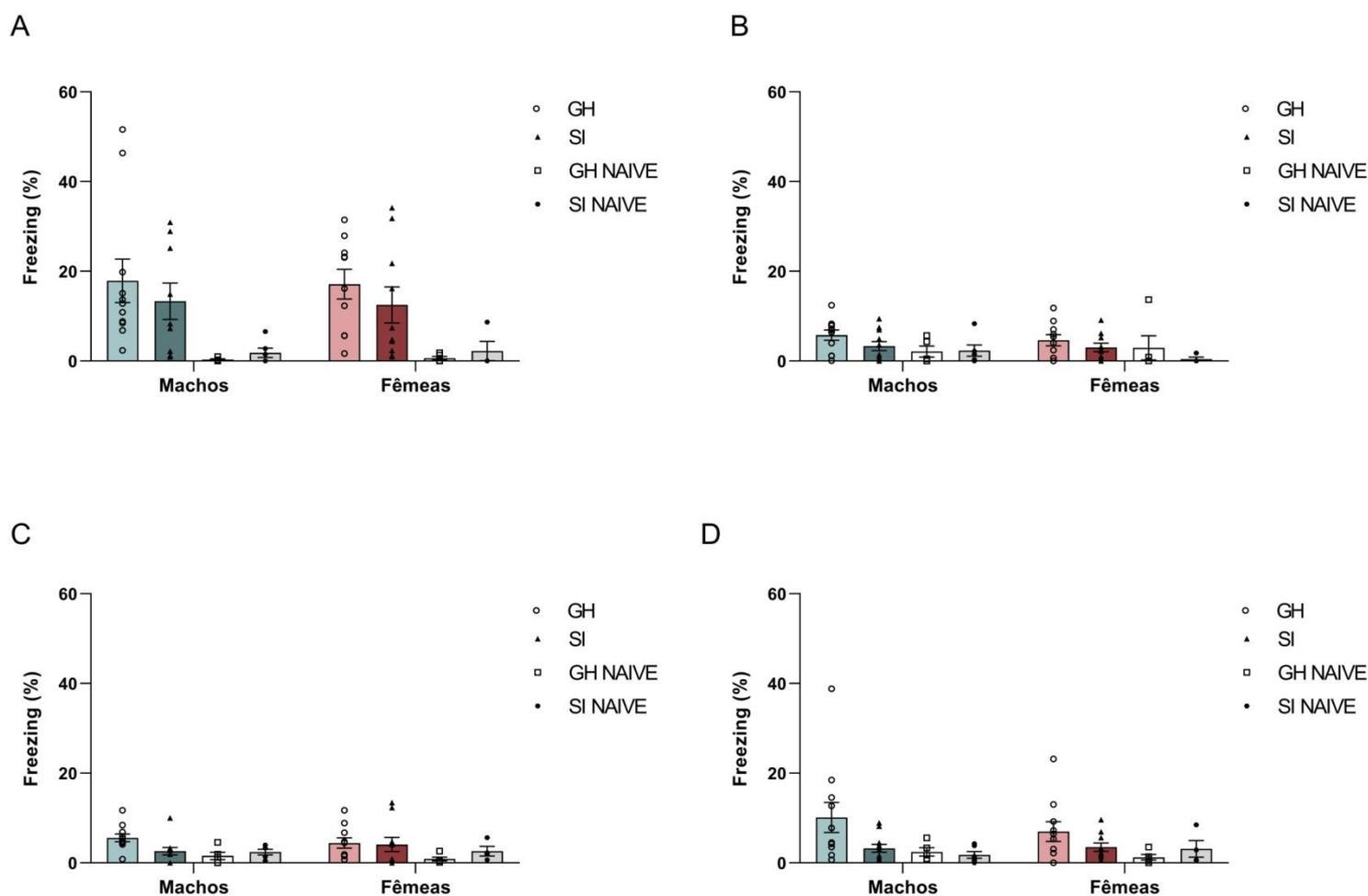


**Figura 15 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, em fêmeas, com 1 US.** Foram incluídos animais naïve no experimento. Analisou-se expressão de *freezing* durante o experimento. (A) Análise durante os 5 primeiros minutos da sessão de extinção. (B) Análise durante toda a sessão de extinção. (C) Análise da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da extinção. (D) Comparação em cada minuto do teste de extinção. (E) Análise da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da recuperação espontânea. (F) Comparação em cada minuto do teste da recuperação espontânea. (G) Comparação geral entre momentos específicos de cada experimento. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM (2way-ANOVA; Comparações múltiplas de Bonferroni). GH n=10; SI n=10; GH-naïve n=5; SI-naïve n=4. \*  $p < 0,05$ .

## O SEXO DO ANIMAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO, PELO PROTOCOLO DE 1US

Foram comparados os resultados de camundongos machos com camundongos fêmeas de cada etapa do experimento de protocolo 1US: primeiros 5 minutos e últimos 5 minutos da sessão de extinção, teste da extinção e teste da recuperação espontânea (figura 16). A ANOVA de 2 vias de cada resultado não detectou efeito do fator “sexo” em nenhuma análise (0-5 min:  $F_{1,52}=0,004655$ ;  $P=0,9459$ ; 16-20 min:  $F_{1,54}=0,4196$ ;  $P=0,5199$ ; teste:  $F_{1,54}=0,003019$ ;  $P=0,9564$ ; recuperação espontânea:  $F_{1,54}=0,1740$ ;  $P=0,6782$ ).

A mesma comparação apontou efeito do fator “grupo” em todas as etapas analisadas (0-5 min:  $F_{3,52}=7,808$ ;  $P=0,0002$ ; 16-20 min:  $F_{3,54}=2,959$ ;  $P=0,0403$ ; teste:  $F_{3,54}=3,635$ ;  $P=0,0184$ ; recuperação espontânea  $F_{3,54}=4,494$ ;  $P=0,0069$ ), sendo identificado no *post hoc* diferenças já mencionados previamente (item 5.4).



**Figura 16 - Comparação na expressão de comportamento de *freezing* entre machos e fêmeas durante o experimento de extinção da memória de medo condicionado ao contexto, com 1 US.** (A) Análise durante os primeiros 5 minutos da sessão de extinção. (B) Análise durante os 5 últimos minutos da sessão de extinção. (C) Análise durante o teste de extinção. (D) Análise durante o teste da recuperação espontânea. Dados mostrados como média  $\pm$  SEM (2way-ANOVA; comparações múltiplas de Bonferroni).

## O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO TOM, PELO PROTOCOLO DE 3US-CS

A fim de verificar o efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao tom, foi utilizado o protocolo com 3 pareamentos CS-US, nomeado como protocolo forte. Em decorrência dos resultados anteriores de comparação entre machos e fêmeas, o presente experimento foi realizado apenas em camundongos machos.

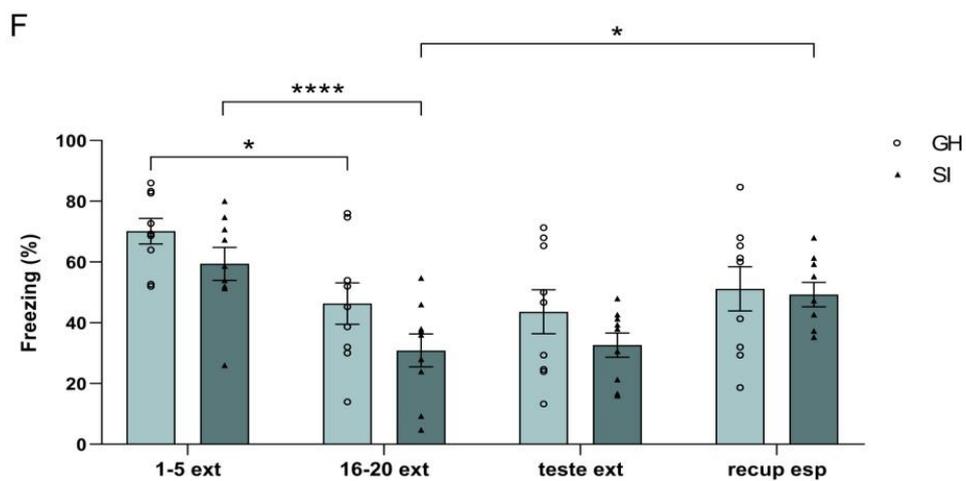
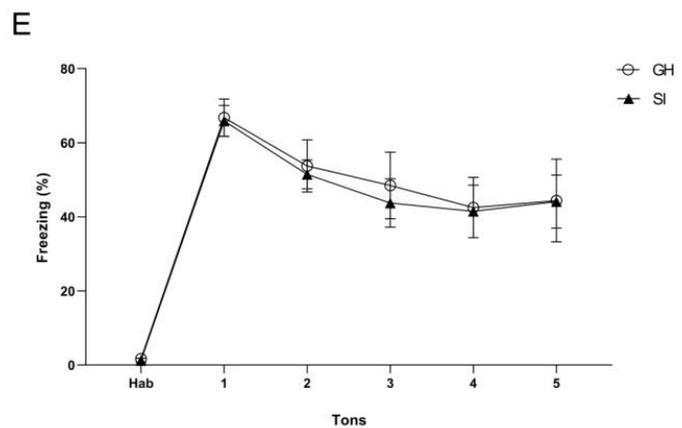
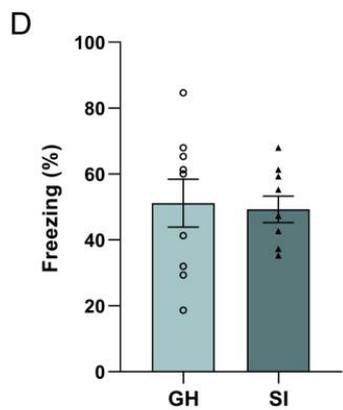
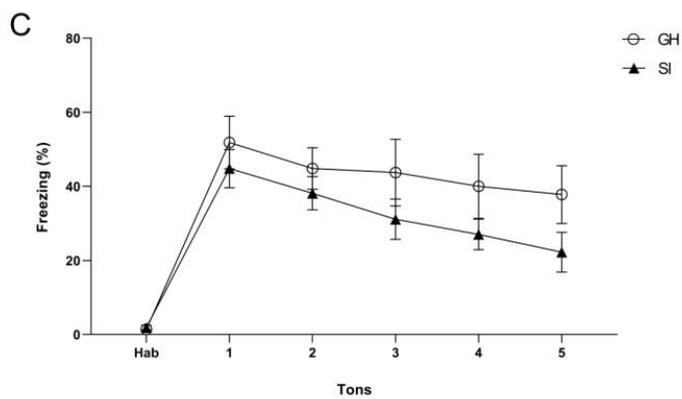
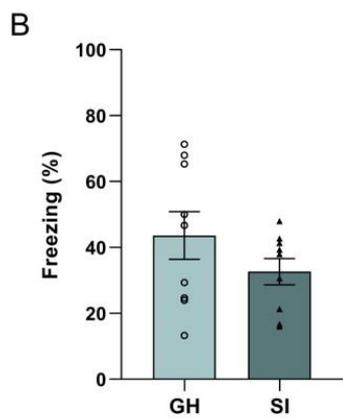
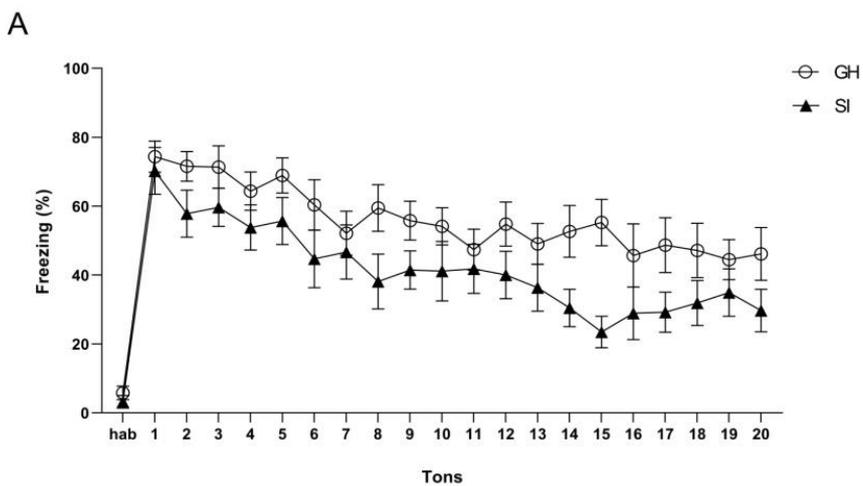
A análise da sessão de extinção não apontou efeito do fator “grupo” (ANOVA de 2 vias;  $F_{1,16}=3,668$ ;  $P=0,0735$ ), porém ocorreu efeito do fator “tempo” ( $F_{7,978,127.6}=23,07$ ). Esse efeito foi reconhecido no *post hoc* como diferenças significativas entre o momento de habituação e os tons de 1-15 dos animais agrupados, e entre os tons de 1-5 dos animais isolados (figura 17-A). Esse resultado indica que ambos os grupos aprenderam a tarefa de condicionamento.

O teste-t não-pareado do teste da extinção não encontrou diferença significativa entre os grupos ( $P=0,2025$ ) (figura 17-B). O mesmo ocorreu na ANOVA de 2 vias de cada momento do teste da extinção (fator “grupo”:  $F_{1,16}=1,696$ ;  $P=0,2113$ ), mas houve efeito de “tempo” ( $F_{3,060,48.95}=40,16$ ;  $P<0,0001$ ), o qual novamente foi identificado no *post hoc* como sendo a diferença significativa entre o nível de *freezing* durante as apresentações dos tons e no momento de habituação (figura 17-C).

Assim como no teste da extinção, o teste da recuperação espontânea não indicou diferença significativa entre os grupos ( $P=0,8240$ ) (figura 17-D). Na análise de cada momento foi verificado efeito do fator “tempo” ( $F_{2,702,43.24}=40,25$ ;  $P<0,0001$ ), mas novamente sem efeito significativo do fator “grupo” ( $F_{1,16}=0,05425$ ;  $P=0,8188$ ). As diferenças apontadas no *post hoc* também foram entre os níveis de *freezing* durante a habituação e durante as apresentações dos tons (figura 17-E).

A análise de comparações entre os testes desse experimento (ANOVA de 2 vias) não demonstrou efeito do fator “grupo” ( $F(1, 16) = 1,971$ ;  $P=0,1794$ ), assim como nas análises prévias. Todavia houve efeito do fator “tempo” ( $F(2,113, 33,80) = 28,26$ ;  $P<0,0001$ ), o qual foi identificado no *post hoc* de Bonferroni (figura 17-F). Verificou-se diferença significativa nos níveis de *freezing* entre os 5 primeiros tons e 5 últimos tons da sessão de extinção de ambos os grupos (GH:  $P= 0,0138$ ; SI:  $P <0,0001$ ), fato que também indica sucesso na extinção. Além disso, observa-se, nos dois grupos, que o *freezing* durante o teste da extinção mantém média similar aos 5 últimos tons da sessão da extinção, não apresentando diferença significativa (GH:  $P>0,9999$ ; SI:  $P >0,9999$ ), corroborando para a conclusão de extinção bem sucedida.

Ainda, o *post hoc* também mostrou diferença significativa dentro do grupo isolado entre os últimos 5 tons da extinção e o teste da recuperação espontânea ( $P=0,0205$ ), fato que aponta possível ocorrência desse fenômeno nesses animais.



**Figura 17 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao tom, em machos, com 3 US-CS.** Analisou-se expressão de *freezing* durante o experimento. (A) Análise durante toda a sessão de extinção. (B) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da extinção. (C) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste de extinção. (D) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da recuperação espontânea. (E) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste da recuperação espontânea. (F) Comparação geral entre momentos específicos de cada experimento. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Comparações múltiplas de Bonferroni. GH n=9; SI n=9. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO AFETOU A EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO TOM, PELO PROTOCOLO 1 US-CS

Assim como no protocolo forte, o isolamento social não interferiu significativamente no protocolo fraco da extinção da memória de medo condicionado ao tom (ANOVA de 2 vias; fator “grupo”:  $F_{1,13}=0,2542$ ;  $P=0,6226$ ).

A análise apresentou efeito do “tempo” durante a sessão de extinção ( $F_{6,433,83.63}=14,64$ ;  $P < 0,0001$ ), o qual foi identificado no *post hoc* de Bonferroni como sendo as diferenças entre os níveis de *freezing* durante a habituação comparado com, no mínimo, os 3 primeiros tons (figura 18-A).

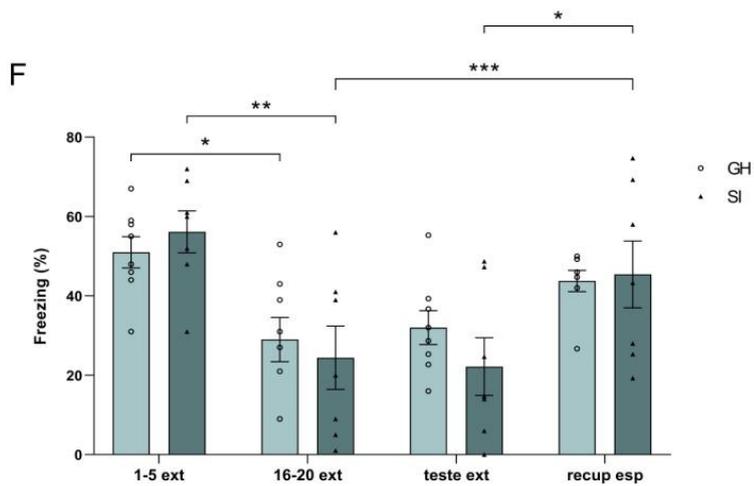
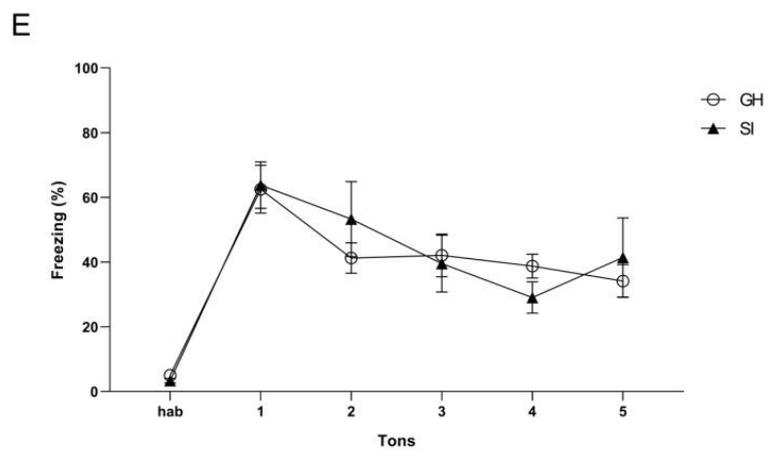
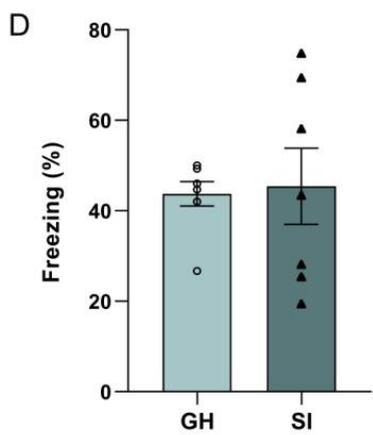
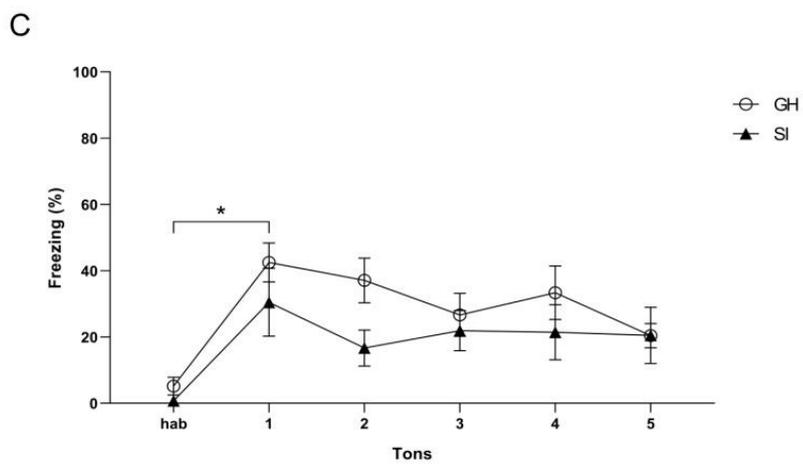
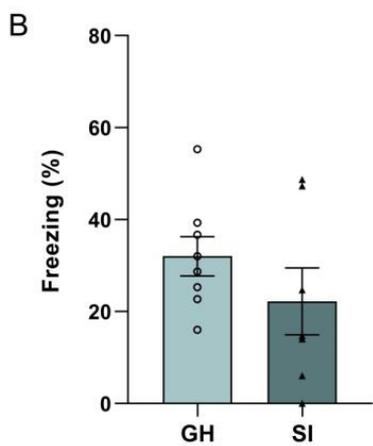
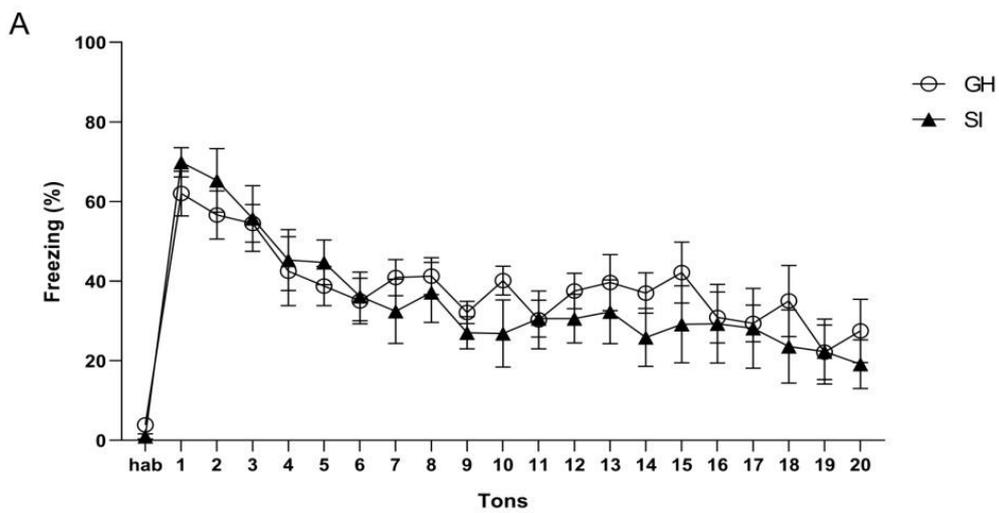
O isolamento social também não afetou o teste da extinção (teste-t;  $P=0,2513$ ) (figura 18-B), portanto a ANOVA de 2 vias não achou efeito significativo do fator “grupo” ( $F_{1,13}=1,786$ ;  $P=0,2043$ ) na análise de *freezing* durante cada apresentação de tom. O efeito do fator “tempo” ( $F_{3,557,46.25}=10,37$ ;  $P < 0,0001$ ) foi revelado apenas no *freezing* dos animais agrupados, durante a habituação e primeiro tom (comparações múltiplas de Bonferroni;  $P=0,0105$ ) (figura 18-C).

No teste de recuperação espontânea também não houve diferença de níveis de *freezing* entre os grupos ( $P=0,8451$ ) (figura 18-D). A ANOVA de 2 vias dos resultados tom por tom também mostra que não houve efeito de “grupo” ( $F_{1,13}=0,02561$ ;  $P=0,8753$ ), ocorrendo efeito do fator “tempo” ( $F_{3,972,51.64}=28,83$ ;  $P < 0,0001$ ) na comparação de cada apresentação do tom com o momento de habituação (figura 18-E).

A comparação dos níveis de *freezing* entre os testes corrobora com o fato do isolamento social não ter afetado a extinção da memória de medo condicionado ao tom, nesse protocolo (ANOVA de 2 vias; fator “grupo”:  $F(1, 13) = 0,07798$ ;  $P=0,7844$ ). Essa comparação indicou que houve diferença significativa de comportamento dos animais entre os diferentes testes (fator “tempo”:  $F(2,468, 32,08) = 24,79$ ;  $P < 0,0001$ ). A análise apontou que tanto os animais agrupados ( $P=$

0,0400) quanto os animais isolados ( $P= 0,0079$ ) apresentaram decaimento significativo de *freezing* durante a sessão de extinção (5 primeiros tons comparados com 5 últimos tons), sem significância entre os últimos 5 tons e o teste da extinção (GH:  $P>0,9999$  SI:  $P>0,9999$ ), indicando sucesso na extinção da memória de medo de ambos os grupos (figura 18-F).

Além disso, os níveis de *freezing* dos animais isolados durante os últimos 5 minutos da extinção e teste da extinção comparados com o teste da recuperação espontânea foram estatisticamente diferentes ( $P=0,0004$  e  $P=0,0309$ , respectivamente), constatando que nesse grupo a memória de medo condicionada ao tom foi recuperada.



**Figura 18 - Efeito do isolamento social na extinção da memória de medo condicionado ao tom, em machos, com 1 US-CS.** Analisou-se expressão de *freezing* durante o experimento. (A) Análise durante toda a sessão de extinção. (B) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da extinção. (C) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste de extinção. (D) Análise teste-t não-pareado da somatória de percentagem de *freezing* durante o teste da recuperação espontânea. (E) Comparação por ANOVA de 2 vias em cada minuto do teste da recuperação espontânea. (F) Comparação geral entre momentos específicos de cada experimento. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Comparações múltiplas de Bonferroni. GH n=8; SI n=7. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## O ISOLAMENTO SOCIAL NÃO PROVOCOU COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO NOS ANIMAIS

O labirinto em cruz elevado é amplamente usado como um teste comportamental para medir o fenótipo tipo-ansioso em roedores. A partir da premissa de que animais com esse comportamento evitam áreas abertas, o tempo que o camundongo fica nos braços abertos, comparado com o tempo nos braços fechados, é usado como medida do nível de ansiedade daquele indivíduo.

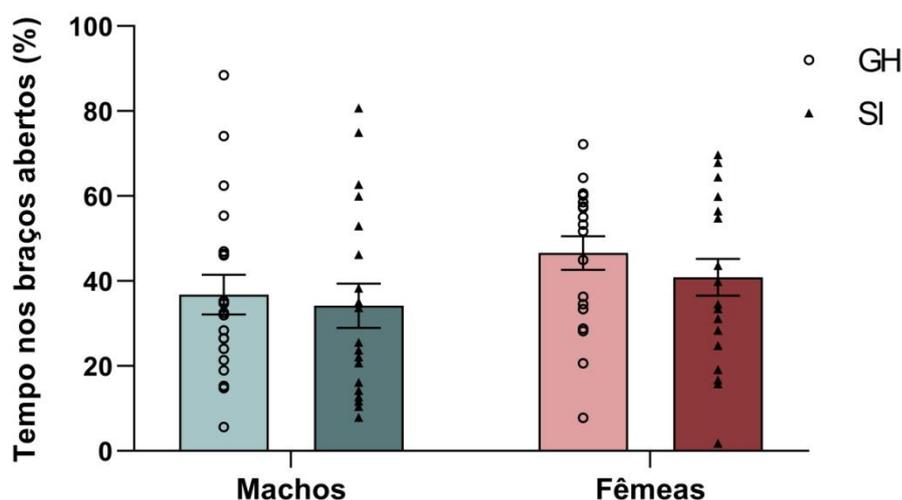
Não foi observada diferença comportamental entre os grupos de camundongos machos em relação à porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (teste-t não-pareado;  $P=0,7125$ ). Na análise geral do experimento também não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos (teste t não-pareado; braços fechados:  $P= 0,2377$ ; centro:  $P= 0,3041$ ) (Figura 19). Ainda, quando comparado a porcentagem nos braços abertos com braços fechados, não é indicada diferença significativa (*post hoc* de Bonferroni; GH:  $P > 0,9999$ ; SI:  $P= 0,9276$ ).

As mesmas análises foram feitas para o teste com camundongos fêmeas, cujo resultado não apontou efeito do isolamento social (teste-t não-pareado;  $P=0,3369$ ). Quando avaliada a permanência nos braços fechados, a porcentagem dos animais isolados foi relativamente maior ( $104,40 \pm 9,88$ ) do que dos animais agrupados ( $80,95 \pm 7,54$ ), mas sem atingir significância estatística (teste-t não pareado;  $P=0,0695$ ), assim como no centro (teste-t não-pareado;  $P=0,5080$ ).

Na análise geral, a ANOVA de 2 vias apontou efeito de “área” do labirinto ( $F_{2,111}=17,22$ ;  $P < 0,0001$ ), sendo esse efeito identificado dentro do grupo de animais isolados, como maior porcentagem de permanência nos braços abertos comparado com braços fechados (*post hoc* de Bonferroni;  $P=0,0001$ ).

Além disso, compararam-se os resultados entre os sexos, também não identificando diferença significativa (ANOVA de 2 vias; braços abertos:  $F_{1,74}=3,251$ ;  $P=0,0754$ ; braços fechados:  $F_{1,74}=3,121$ ;  $P=0,0814$ ; centro:  $F_{1,74}=1,149$ ;  $P=0,2873$ ).

Esses resultados indicam que o isolamento social não induziu fenótipo tipo-ansioso nos animais, e não houve diferença de comportamento entre os sexos.



**Figura 19 - Teste do labirinto em cruz elevado em machos e fêmeas.** Análise comparativa entre a porcentagem do tempo de permanência de machos e fêmeas nos braços abertos do labirinto. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SEM (2-way ANOVA; comparações múltiplas de Bonferroni). Machos-GH  $n=20$ ; machos-SI  $n=19$ ; fêmeas-GH  $n=19$ ; fêmeas-SI  $n=20$ .

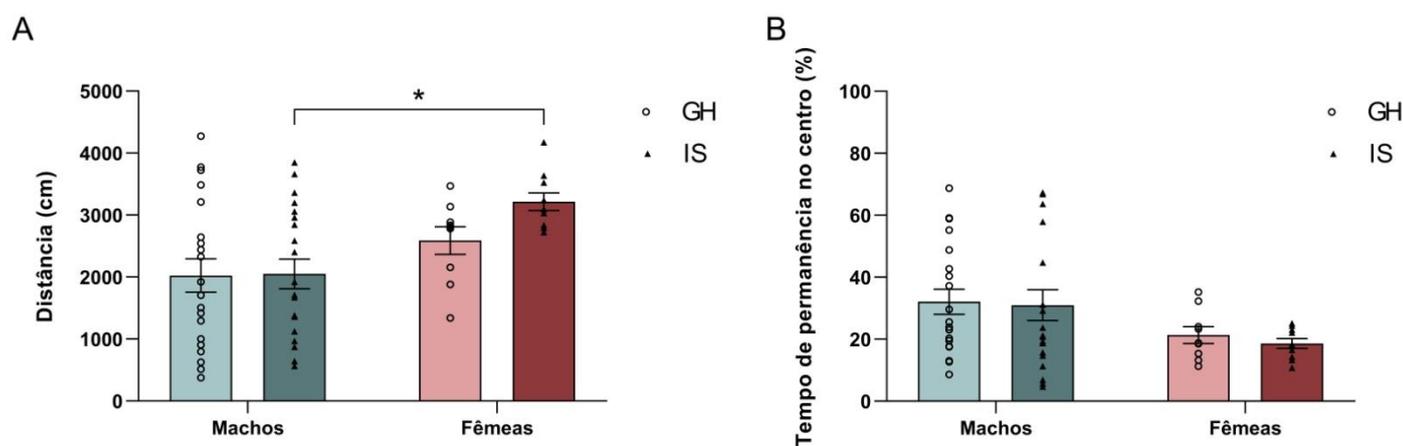
## O ISOLAMENTO SOCIAL AUMENTA A ATIVIDADE EXPLORATÓRIA DE FÊMEAS

Ao suspeitarmos de possível maior locomoção das fêmeas em relação aos machos, decidiu-se realizar o teste de campo aberto para averiguar tal situação. Todos os animais que passaram pelos experimentos de condicionamento ao medo contextual foram submetidos ao teste de locomoção. Entretanto, devido a um problema técnico no computador onde obtém os dados desse experimento, os resultados das fêmeas que passaram pelo protocolo forte não puderam ser analisados.

A análise do teste dos machos não indicou diferença significativa entre os animais agrupados e isolados (teste-t não-pareado;  $P=0,9423$ ), porém foi achado diferença entre os grupos de fêmeas (teste-t não-pareado;  $P=0,0270$ ). Quando comparado todos os dados de machos e fêmeas, verifica-se efeito do fator “sexo” (ANOVA de 2 vias;  $F_{1,55}=9,614$ ;  $P=0,0030$ ), sem efeito do fator “grupo” ( $F_{1,55}=1,370$ ;  $P=0,2468$ ). Percebe-se maior distância média percorrida pelas fêmeas (GH:

2587,87±222,08; SI: 3213,24±142,28; machos GH: 2024,43±268,93; machos SI: 2050,70±240,12), sendo essa diferença significativa entre machos isolados e fêmeas isoladas (*post hoc* de Bonferroni;  $P=0,0238$ ) (figura 20-A).

Ao analisar o comportamento do tipo-ansioso desses animais, a partir do tempo de permanência no centro, a ANOVA de 2-vias mostrou efeito do fator “sexo” ( $F_{1,55}=5,848$ ;  $P=0,0189$ ), porém sem efeito do fator “grupo” ( $F_{1,55}=0,1585$ ;  $P=0,6921$ ) (Figura 20-B). A comparação múltipla de Bonferroni não identificou a variação.



**Figura 20 - Análise da atividade locomotora no teste de campo aberto.** (A) Comparação entre a distância percorrida por machos e fêmeas. (B) Comparação, entre machos e fêmeas, da porcentagem de tempo de permanência no centro da arena. Os dados são mostrados como média ± SEM (2-way ANOVA; comparações múltiplas de Bonferroni). Machos-GH n=20; machos-SI n=20; fêmeas-GH n=9; fêmeas-SI n=10. \*  $p<0,05$ ; comparação entre sexos.

## DISCUSSÃO

O isolamento social vem ganhando protagonismo em estudos recentes, em decorrência da pandemia nos últimos dois anos, porém já era um tópico estudado mesmo antes, devido a servir como modelo de estresse em roedores (FARBSTEIN et al., 2021). Trabalhos realizados por nosso grupo já haviam demonstrado efeitos do isolamento social sobre a memória social (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUSMÃO et al., 2012), assim como Huang *et al.* (2011) e Wang *et al.* (2018) mostraram prejuízos em outros tipos de memória na associação com o isolamento social. Logo, o presente estudo investigou, tanto em camundongos machos quanto em fêmeas, o efeito do isolamento social agudo sobre a extinção da memória de medo contextual e auditiva, assim como a consequência no fenômeno da recuperação espontânea dessas memórias.

### AUSÊNCIA DE EFEITO DO ISOLAMENTO SOCIAL NOS EXPERIMENTOS DE MEDO CONTEXTUAL, EM MACHOS E FÊMEAS

Fatores comuns de estilo de vida, como isolamento social, podem alterar a capacidade de um indivíduo de extinguir o medo, devido ao aparecimento de transtornos de ansiedade e estresse (DRUMMOND et al., 2021). Além disso, Ferreira *et al.* (2019), Hornstein *et al.* (2018) e Mikami *et al.* (2020) mostram a importância da socialização em roedores e como sua privação pode ter efeitos deletérios sob o medo condicionado nesses animais. Baseando nisso, esperava-se que os animais isolados que passaram pelo protocolo de 3US apresentassem prejuízo na extinção do medo aprendido, porém esse desfecho não foi alcançado.

Especulou-se então que tal diferença pode não ter sido notada devido ao fato de os animais levarem 3 choques. Assim, considerou-se a realização de um protocolo de apenas 1 choque, esperando ser possível ver maior diferença de *freezing* entre os grupos. Além disso, adicionaram-se animais naïve no experimento para garantir que o comportamento de *freezing* detectado seria um comportamento de medo gerado pelo aprendizado da tarefa e não algum inerente ao animal. Tal fato foi corroborado pelos resultados obtidos no teste de campo aberto, cuja atividade locomotora e exploratória se apresentou dentro do esperado. Novamente obteve-se

o resultado de que não houve diferença estatística entre os níveis de *freezing* de animais isolados e agrupados. Ademais, a média de *freezing* dos animais isolados de ambos os protocolos se apresentou mais baixa que a média dos animais agrupados, com exceção do resultado que será discutido no item 6.2. A partir desses resultados contrários ao esperado, levantam-se hipóteses de possíveis explicações para o encontrado.

Animais sociais como camundongos e ratos preferem companhias a viverem sozinhos (BALCOMBE, 2006). Em um ambiente de laboratório, eles mostram preferência por regiões previamente associadas ao contato social (PANKSEPP; LAHVIS, 2007), demonstram comportamentos cooperativos com companheiros de gaiola (BARTAL; DECETY; MASON, 2011; BEN-AMI BARTAL et al., 2014; SATO, 2015), e se empenham para obter contato social, o que mostra como o isolamento pode afetar tais animais. Um modelo emergente da neurociência social postula que existem mecanismos neurofisiológicos evolutivamente conservados responsáveis pelo modo de autopreservação frente à falta de conexões sociais (CACIOPPO; CACIOPPO, 2019; CACIOPPO; CACIOPPO; BOOMSMA, 2014). Este modelo propõe que este estado do animal lê o isolamento como uma situação aversiva, promovendo, então, adaptações às vulnerabilidades de estar só, motivando a reconexão (CACIOPPO; CACIOPPO; BOOMSMA, 2014). Além disso, para muitas espécies sociais, as interações entre coespecíficos possuem uma natureza recompensadora, aumentando o valor da socialização, sendo importante força motriz para a busca pelo contato social quando isolados (MATTHEWS; TYE, 2019).

Presume-se, portanto, que devido ao isolamento social ao qual os animais foram submetidos, a busca pela recompensa da socialização teve maior valor do que a ameaça do choque (BRAVO-RIVERA; SOTRES-BAYON, 2020). Em termos de mecanismos neurofisiológicos, sabe-se que a atividade de IL é crucial para a extinção do medo e inibição posterior das respostas de medo. Assim, a capacidade do IL de inibir o medo pôde permitir que os sinais relacionados à recompensa surgissem sem entrar em conflito com os sinais de medo, permitindo que o comportamento de busca pela recompensa ocorra (BURGOS-ROBLES et al., 2017).

A sinalização de opioides desempenha papéis bem documentados na regulação da dor e analgesia, além do processamento de recompensa, vínculo social, e também tem sido implicado no comportamento social induzido pelo isolamento (LE MERRER et al., 2009; MACHIN; DUNBAR, 2011). Redução na

sensibilidade à dor foi relatada em camundongos machos e ratos juvenis exibindo limiares de dor térmica e mecânica mais altos após 2 a 7 dias de isolamento social (D'AMATO; PAVONE, 2012; FERDOUSI; FINN, 2018; KONECKA; SROCZYNSKA, 1990; NARANJO; FUENTES, 1985).

Há evidências de que, além do sistema opioide por si, sua interação com o sistema dopaminérgico aponta para um potencial mecanismo através do qual o isolamento agudo reduz a percepção da dor. A ativação quimiogênica dos neurônios dopaminérgicos da substância cinzenta periaquedutal ventro-lateral (vlPAG)/DRN pode promover antinocicepção, enquanto a lesão desses neurônios suprime propriedades antinociceptivas e recompensadoras de opioides exógenos (FLORES et al., 2004; MEYER et al., 2009). Portanto, a ativação de neurônios dopaminérgicos DRN (núcleo dorsal da rafe) não apenas aumenta a preferência social (MATTHEWS et al., 2016), mas também promove antinocicepção (LI et al., 2016).

Supõe-se, então, que os animais isolados exibirem maior tolerância à dor tenha prejudicado a associação entre o US e o CS, não sendo tão impactante para esses animais quanto foi para os animais agrupados, assim, sempre se apresentando com menor média de *freezing*.

## DIFERENÇA ENTRE SEXOS NO TESTE DE EXTINÇÃO

A atenuação do *freezing* durante a sessão de extinção é um indicativo de aprendizado dessa memória, porém apenas no teste realizado 24h após que se consegue admitir tal fato. Assim, é esperado que o nível de *freezing* dos animais durante o teste seja igual ou inferior aos níveis dos últimos minutos da sessão de extinção. Apesar de não haver diferença estatística no *freezing* entre esses experimentos na análise das fêmeas (item 5.2), percebe-se um aumento durante o teste, principalmente dos animais isolados. Além disso, houve diferença estatística quando comparado com o teste de machos (item 5.3). Desse modo, supõe-se que tenha ocorrido um prejuízo no processo de consolidação da memória de extinção, visto que houve diminuição do *freezing* durante a sessão de extinção e estima-se que essas fêmeas aprenderam a tarefa de condicionamento, como demonstrado no item 5.2.

De fato, processos de medo mostraram ser fortemente regulados por hormônios sexuais (BANGASSER; VALENTINO, 2014). Entretanto, diferentes

resultados são relatados ao comparar extinção do medo em machos e fêmeas, com alguns estudos encontrando prejuízos para as fêmeas e outros não (FENTON et al., 2014; GRUENE et al., 2015; MAENG; MILAD, 2015; VOULO; PARSONS, 2017). Um cenário mais consistente surge quando a influência do ciclo estral é considerada: fêmeas submetidas à sessão de extinção durante o proestro (alto  $17\beta$ -estradiol (E2)/alta progesterona (P4)) exibem evocação da memória de extinção semelhante aos machos. Em contraste, fêmeas que passam pela sessão de extinção durante o metaestro (baixo E2/baixo P4) apresentam prejuízo na evocação da memória de extinção em comparação com fêmeas durante o proestro ou machos (GRUENE et al., 2015; LEBRÓN-MILAD et al., 2013; REY; LIPPS; SHANSKY, 2014). Desse modo, como não foi verificado o ciclo estral das fêmeas, não se pode excluir a possibilidade de que o efeito do ciclo tenha contribuído para a interpretação dos presentes resultados.

Foi mostrado que o isolamento aumentou a CR durante o teste da memória de medo, mas não houve efeito na sessão de extinção ou na evocação da memória de extinção (MATSUDA; TOHYAMA; MIZUTANI, 2018). No entanto, nesse trabalho foi usado o protocolo de 5 sessões de extinção, contrapondo com o presente trabalho cujo protocolo foi de apenas uma sessão. Logo, acredita-se que as fêmeas terem passado por apenas uma sessão de extinção pode não ter sido suficiente para igualar aos níveis de *freezing* dos machos, porém não tendo efeito sobre a efetividade da extinção entre os grupos de fêmeas.

## AUSÊNCIA DE EFEITO DO ISOLAMENTO SOCIAL NOS EXPERIMENTOS DE MEDO AUDITIVO

Os altos níveis de *freezing* nos primeiros minutos da sessão de extinção de ambos os protocolos de condicionamento ao tom indicam que um efeito teto pode ter ocorrido, mascarando possíveis diferenças entre os grupos analisados. O termo “efeito teto” é usado para descrever como os sujeitos em um estudo apresentam alto grau de realização do conceito medido, mostrando pontuações que estão próximas ou no limite superior (KEOUGH, 2014). Tal efeito pode indicar que o conceito medido não é desafiador o suficiente para os sujeitos submetidos ao estudo, levando à falta de variância dos resultados. Ou seja, os protocolos de condicionamento ao tom

podem não ter sido suficiente para discriminar de forma significativa os resultados entre os grupos de animais, visto que os valores de *freezing* resultantes de 1US-CS foram semelhantes aos de 3US-CS.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que machos e fêmeas extinguiram a memória de medo condicionado ao contexto, entretanto as fêmeas isoladas tiveram uma pior extinção em comparação com os machos isolados. O efeito do IS sobre a extinção dessa memória se manifesta, mesmo que brandamente, apenas nas fêmeas.

Apesar de não termos observado diferença entre os grupos, no geral, os animais machos isolados mostraram níveis menores de *freezing*, o que pode indicar uma extinção facilitada ou um aprendizado prejudicado.

Os animais socialmente isolados que passaram pelo protocolo de condicionado ao medo auditivo apresentaram recuperação espontânea da memória de medo.

Reconhece como limitação do estudo a irrealização do experimento de extinção da memória de medo condicionado ao tom em fêmeas, e a avaliação do ciclo estral das fêmeas utilizadas nos experimentos feitos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. Social isolation impairs the persistence of social recognition memory by disturbing the glutamatergic tonus and the olfactory bulb-dorsal hippocampus coupling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- AMARAL-JÚNIOR, P. A. et al. A Custom Microcontrolled and Wireless-Operated Chamber for Auditory Fear Conditioning. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. November, p. 1–13, 2019.
- BALCOMBE, J. P. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. 2006.
- BALTER, L. J. T. et al. Loneliness in healthy young adults predicts inflammatory responsiveness to a mild immune challenge in vivo. **Brain Behavior and Immunity**, v. 82, n. August, p. 298–301, 2019.
- BANGASSER, D. A.; VALENTINO, R. J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 303–319, 2014.
- BARTAL, I. B.; DECETY, J.; MASON, P. Empathy and Pro-Social Behavior in Rats. **Science**, v. 334, n. 6061, p. 1427–1430, 9 dez. 2011.
- BEN-AMI BARTAL, I. et al. Pro-social behavior in rats is modulated by social experience. **eLife**, v. 3, p. 1–16, 14 jan. 2014.
- BRAVO-RIVERA, C.; SOTRES-BAYON, F. From Isolated Emotional Memories to Their Competition During Conflict. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, n. March, p. 1–7, 12 mar. 2020.
- BURGOS-ROBLES, A. et al. Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 824–835, 2017.
- CACIOPPO, J. T. et al. Loneliness as a specific risk factor for depressive symptoms: Cross-sectional and longitudinal analyses. **Psychology and Aging**, v. 21, n. 1, p. 140–151, mar. 2006.
- CACIOPPO, J. T. et al. Social isolation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1231, n. 1, p. 17–22, 2011.
- CACIOPPO, J. T.; CACIOPPO, S. The growing problem of loneliness. v. 391, n. 10119, p. 2018–2019, 2019.
- CACIOPPO, J. T.; CACIOPPO, S.; BOOMSMA, D. I. Evolutionary mechanisms for

- loneliness. **Cognition and Emotion**, v. 28, n. 1, p. 3–21, 2 jan. 2014.
- CHANG, C. H. et al. Fear extinction in rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, n. SUPPL. 47, 2009.
- D'AMATO, F. R.; PAVONE, F. Modulation of nociception by social factors in rodents: Contribution of the opioid system. **Psychopharmacology**, v. 224, n. 1, p. 189–200, 2012.
- DRUMMOND, K. D. et al. Hippocampal neurogenesis mediates sex-specific effects of social isolation and exercise on fear extinction in adolescence. **Neurobiology of Stress**, v. 15, p. 100367, 2021.
- DUDAI, Y. **Memory from A to Z: Keywords, Concepts and Beyond**. [s.l: s.n.]. v. 12
- FARBSTEIN, D. et al. Social isolation in mice: behavior, immunity, and tumor growth. **Stress**, v. 24, n. 2, p. 229–238, 2021.
- FENTON, G. E. et al. Persistent prelimbic cortex activity contributes to enhanced learned fear expression in females. **Learning and Memory**, v. 21, n. 2, p. 55–60, 2014.
- FERDOUSI, M.; FINN, D. P. **Stress-induced modulation of pain: Role of the endogenous opioid system**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 239
- FERREIRA, F. F. et al. Social support favors extinction and impairs acquisition of both short- and long-term contextual fear conditioning memory. **Neuroscience Letters**, v. 712, n. August, p. 134505, 2019.
- FLORES, J. A. et al. Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: Critical role for D1 (not D 2) dopamine receptors. **Pain**, v. 110, n. 1–2, p. 205–214, 2004.
- GRAHAM, B. M.; MILAD, M. R. The Study of Fear Extinction: Implications for Anxiety Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 168, n. 12, p. 1255–1265, dez. 2011.
- GRUENE, T. M. et al. Sex-specific neuroanatomical correlates of fear expression in prefrontal-amygdala circuits. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 3, p. 186–193, 2015.
- GUARNIERI, L. O. et al. Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, 2020.
- GUSMÃO, I. D. et al. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 440–446, 2012.

- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, 1984.
- HAWKLEY, L. C. et al. Loneliness is a unique predictor of age-related differences in systolic blood pressure. **Psychology and Aging**, v. 21, n. 1, p. 152–164, mar. 2006.
- HAWKLEY, L. C.; CACIOPPO, J. T. Loneliness and pathways to disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 98–105, fev. 2003.
- HERRY, C. et al. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 600–606, 2008.
- HOLT-LUNSTAD, J.; SMITH, T. B.; LAYTON, J. B. Social Relationships and Mortality Risk: A Meta-analytic Review. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 7, p. e1000316, 27 jul. 2010.
- HORNSTEIN, E. A. et al. A Unique Safety Signal: Social-Support Figures Enhance Rather Than Protect From Fear Extinction. **Clinical Psychological Science**, v. 6, n. 3, p. 407–415, 2018.
- HUANG, H. J. et al. Long-term social isolation exacerbates the impairment of spatial working memory in APP/PS1 transgenic mice. **Brain Research**, v. 1371, p. 150–160, 2011.
- IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.
- IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.
- KEOUGH, N. **Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014.
- KIM, W. BIN; CHO, J. Encoding of contextual fear memory in hippocampal–amygdala circuit. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1382, 13 dez. 2020.
- KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 188–202, jan. 2006.
- KONECKA, A. M.; SROCZYNSKA, I. Stressors and pain sensitivity in CFW mice. Role of opioid peptides. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 245–252, 1990.
- LE MERRER, J. et al. Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 4, p. 1379–1412, 2009.

- LEBRÓN-MILAD, K. et al. Sex differences and estrous cycle in female rats interact with the effects of fluoxetine treatment on fear extinction. **Behavioural Brain Research**, v. 253, n. 1, p. 217–222, set. 2013.
- LEDOUX, J. E.; PINE, D. S. Using Neuroscience to Help Understand Fear and Anxiety: A Two-System Framework. **American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 11, p. 1083–1093, nov. 2016.
- LEE, C. R.; CHEN, A.; TYE, K. M. The neural circuitry of social homeostasis: Consequences of acute versus chronic social isolation. **Cell**, v. 184, n. 6, p. 1500–1516, mar. 2021.
- LEROY, A. S. et al. Loneliness predicts self-reported cold symptoms after a viral challenge. **Health Psychology**, v. 36, n. 5, p. 512–520, maio 2017.
- LI, C. et al. Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 8, p. 2122–2132, 2016.
- MA, X. et al. Social Isolation-Induced Aggression Potentiates Anxiety and Depressive-Like Behavior in Male Mice Subjected to Unpredictable Chronic Mild Stress. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20955, 17 jun. 2011.
- MACHIN, A. J.; DUNBAR, R. I. M. The brain opioid theory of social attachment: A review of the evidence. **Behaviour**, v. 148, n. 9–10, p. 985–1025, 2011.
- MAENG, L. Y.; MILAD, M. R. Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. **Hormones and Behavior**, v. 76, p. 106–117, 2015.
- MAREN, S.; HOLMES, A. Stress and fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 58–79, 2016.
- MATSUDA, S.; TOHYAMA, S.; MIZUTANI, A. Sex differences in the effects of adult short-term isolation rearing on contextual fear memory and extinction. **Neuroscience Letters**, v. 687, n. May, p. 119–123, 2018.
- MATSUMOTO, K. et al. Post-weaning social isolation of mice: A putative animal model of developmental disorders. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 141, n. 3, p. 111–118, 2019.
- MATTHEWS, G. A. et al. Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 617–631, 2016.
- MATTHEWS, G. A.; TYE, K. M. Neural mechanisms of social homeostasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1457, n. 1, p. 5–25, 15 dez. 2019.

- MEYER, P. J. et al. Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 3, p. 531–540, 2009.
- MIKAMI, K. et al. Social buffering enhances extinction of conditioned fear responses by reducing corticosterone levels in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 118, n. July 2019, p. 104654, 2020.
- NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 17 ago. 2000.
- NARANJO, J. R.; FUENTES, J. A. Association between hypoalgesia and hypertension in rats after short-term isolation. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 2, p. 167–171, fev. 1985.
- ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1773–1802, ago. 2012.
- PANKSEPP, J. B.; LAHVIS, G. P. Social reward among juvenile mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 7, p. 661–671, out. 2007.
- PEREIRA, L. M. et al. Hippocampus and Prefrontal Cortex Modulation of Contextual Fear Memory Is Dissociated by Inhibiting De Novo Transcription During Late Consolidation. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 8, p. 5507–5519, 9 ago. 2019.
- QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 56–72, 2008.
- REY, C. D.; LIPPS, J.; SHANSKY, R. M. Dopamine D1 receptor activation rescues extinction impairments in low-estrogen female rats and induces cortical layer-specific activation changes in prefrontal-amygdala circuits. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1282–1289, 2014.
- ROEDIGER III, H. L.; DUDAI, Y.; FITZPATRICK, S. M. **Science Of Memory: Concepts**. New York, NY: Oxford University Press, Inc., 2007.
- RUDY, J. W. **The neurobiology of learning and memory**. 2. ed. [s.l.] Sinauer Associates, Inc., 2014.
- SATO, N. Rats demonstrate helping behavior toward a soaked conspecific. **Animal Cognition**, 2015.
- SMITH, D. M.; BULKIN, D. A. The form and function of hippocampal context representations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 40, p. 52–61, 2014.
- STEPTOE, A. et al. Social isolation, loneliness, and all-cause mortality in older men

and women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 15, p. 5797–5801, 9 abr. 2013.

SUN, Y.; GOOCH, H.; SAH, P. Fear conditioning and the basolateral amygdala. **F1000Research**, v. 9, p. 53, 28 jan. 2020.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015.

VÕIKAR, V. et al. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, n. 4, p. 240–252, 8 nov. 2004.

VOULO, M. E.; PARSONS, R. G. Response-specific sex difference in the retention of fear extinction. **Learning and Memory**, v. 24, n. 6, p. 245–251, 2017.

WALKER, D. M. et al. Long-term behavioral effects of post-weaning social isolation in males and females. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, n. April, p. 1–20, 2019.

WANG, L. et al. Enriched physical environment attenuates spatial and social memory impairments of aged socially isolated mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 12, p. 1114–1127, 2018.