



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Marina Aparecida Magnini Portes

**O envolvimento do receptor adenosinérgico A_{2A} na consolidação e generalização
de uma memória de medo condicionado ao contexto em ratos**

Florianópolis
2020

Marina Aparecida Magnini Portes

O envolvimento do receptor adenosinérgico A_{2A} na consolidação e generalização de uma memória de medo condicionado ao contexto em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger

Florianópolis
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Portes, Marina Aparecida Magnini

O envolvimento do receptor adenosinérgico A2A na consolidação e generalização de uma memória de medo condicionado ao contexto em ratos / Marina Aparecida Magnini Portes ; orientador, Rui Daniel Schroder Prediger, 2020.

146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Memórias aversivas. 3. Generalização do medo. 4. Adenosina. 5. Receptores adenosinérgica. I. Prediger, Rui Daniel Schroder. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Marina Aparecida Magnini Portes

O envolvimento do receptor adenosinérgico A_{2A} na consolidação e generalização de uma memória de medo condicionado ao contexto em ratos

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Lisiane de Oliveira Porciúncula, Dra
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Antônio de Pádua Carobrez, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Roger Walz, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão **original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmacologia pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Rui Daniel S. Prediger, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho às pessoas mais especiais da minha vida, que sempre acreditaram em mim e estiveram do meu lado ao longo destes últimos anos: meus pais Marisa e Sebastião, meu irmão Adilio, minha tia Vilma, meu avô Agelupho (*In Memoriam*) e minha grande amiga Fernanda Marin. Vocês fizeram o possível e o impossível para auxiliar no meu crescimento pessoal e profissional, permitindo que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por seus esforços constantes que possibilitaram o avanço da minha formação acadêmica. Espero retribuir sua dedicação e amor incondicional sendo para vocês motivo de orgulho e alegria.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Prediger, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela disposição em me acompanhar e orientar ao longo da realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, agradeço não apenas pelos ensinamentos e discussões que contribuíram para o planejamento e execução de experimentos mas, principalmente, pela amizade durante estes anos de convívio. Obrigada por toda a paciência e disponibilidade, que tornaram a rotina laboratorial mais produtiva e agradável.

Ao Dr. Felipe Vanz e à Prof. Dra. Franciane Bobinski, pela amizade e auxílio nos experimentos envolvendo cirurgia estereotáxica e ensaio de imunoabsorção enzimática, respectivamente.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cunha, pela orientação durante a realização do Doutorado Sanduíche na Universidade de Coimbra (Portugal), período de grande crescimento científico e pessoal.

A todos os integrantes do grupo de investigação do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra, em especial àqueles que contribuíram diretamente para a execução de experimentos: Patrícia, Henrique e Anna.

À Lisiane Souza e à Anna Pliássova, pela parceria e amizade que se iniciou durante os 6 meses em Coimbra mas que levarei por toda a vida. Jamais se deixem abalar. Vocês são incríveis e merecem muita felicidade e sucesso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela contribuição para a minha formação acadêmica e científica.

Aos servidores do Departamento de Farmacologia e do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB), por todo o auxílio técnico e pela cordialidade.

À Fernanda Marin, pela amizade e carinho ao longo do último ano. Sua bondade, humildade e alegria me ensinaram a agradecer mais e contemplar a vida com outros olhos.

À doutoranda Ana Jesse, por ser uma amiga tão maravilhosa e divertida, sempre tão resiliente e disposta a ajudar. Conte sempre comigo.

Aos amigos externos ao Departamento, que sempre me apoiaram e me proporcionaram momentos de muita felicidade.

À minha grande amiga Fernanda Marin, por seu companheirismo, sua alegria, sua doçura e sua bondade. Obrigada por ter me oferecido abraços nos momentos mais difíceis, ajudando a me reerguer. Você é uma pessoa iluminada, e eu te amo muito.

Aos membros da banca avaliadora, que se disponibilizaram para contribuir no aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao CNPq e à CAPES e à FCT pelo apoio financeiro, essencial para a realização deste trabalho.

*“O esquecimento, frequentemente, é uma graça. Muito mais difícil que lembrar é esquecer!
Fala-se de “boa memória”. Não se fala de “bom esquecimento”, como se esquecimento fosse
apenas memória fraca. Não é não.
Esquecimento é perdão, o alisamento do passado, igual ao que as ondas do mar fazem com a
areia da praia durante a noite.”*

(Rubem Alves em “O Amor que acende a lua”, 2012)

RESUMO

O armazenamento de memórias aversivas associativas é um processo neurobiológico importante, pois favorece a adaptação e a sobrevivência de um indivíduo em ambientes complexos e dinâmicos. Memórias relacionadas a eventos estressantes e potencialmente prejudiciais são armazenadas de maneira mais intensa e duradoura para que uma vez confrontado com uma ameaça em potencial, o indivíduo selecione uma resposta defensiva apropriada com base em suas experiências anteriores. Entretanto, quando tais respostas também se manifestam frente a outros estímulos não ameaçadores e não relacionados à memória original (fenômeno denominado de expressão generalizada da resposta de medo), podem conduzir o indivíduo à re-experiência do medo frente a situações seguras, a um estado de hipervigilância constante e à manifestação de respostas fisiológicas exageradas, interferindo de maneira significativa com sua qualidade de vida. A pesquisa utilizando modelos animais tem permitido investigar os circuitos cerebrais, alterações de plasticidade sináptica, neurotransmissão e vias neuromodulatórias envolvidos no processamento de memórias aversivas associativas e na expressão generalizada da resposta de medo. Nas últimas décadas, embora o sistema adenosinérgico tenha emergido como uma via neuromodulatória envolvida no processamento das emoções e armazenamento de memórias aversivas, na regulação da transmissão sináptica e da comunicação celular, a contribuição do receptor adenosinérgico A_{2A} ($A_{2A}R$) para a consolidação de uma memória aversiva de maior intensidade e para a expressão generalizada de respostas de medo permanecem pouco explorados e foram o alvo de estudo deste trabalho. Para tanto, Ratos Wistar foram submetidos a protocolos de condicionamento aversivo ao contexto, e avaliou-se o efeito da modulação farmacológica do $A_{2A}R$ durante a consolidação desta memória aversiva sobre parâmetros comportamentais, neuroquímicos e funcionais relacionados à posterior expressão generalizada de respostas de medo. Dentre os principais achados deste trabalho, foi possível observar que a administração sistêmica de SCH 58261 (antagonista seletivo do $A_{2A}R$) durante a consolidação da memória aversiva resulta, nos dias subsequentes, no aumento sustentado da resposta de medo nos contextos pareado e novo, sugerindo que tal manipulação farmacológica favorece o armazenamento da memória aversiva associativa e induz um aumento da expressão generalizada de resposta de medo. De maneira oposta, a administração sistêmica de CGS 21680 (agonista seletivo do $A_{2A}R$) reduz o tempo de congelamento nos contextos pareado e novo, ou seja, prejudica a consolidação da memória aversiva e reduz a expressão generalizada da resposta de medo. Ainda, através da obtenção de registros eletrofisiológicos extracelulares, foi observado que o antagonismo sistêmico do $A_{2A}R$ durante a consolidação da memória aversiva prejudica a liberação de neurotransmissores em fatias de amígdala lateral, mas não em fatias das porções dorsal ou ventral do hipocampo. Adicionalmente, em fatias de hipocampo dorsal, o protocolo de condicionamento *per se* induz um prejuízo na potenciação de longa duração (LTP), sendo esse efeito revertido pelo antagonismo sistêmico do $A_{2A}R$. Por fim, o antagonismo seletivo do $A_{2A}R$ no hipocampo dorsal durante a consolidação da memória aversiva também induz o aumento sustentado do tempo de congelamento nos contextos pareado e novo nos dias subsequentes, ou seja, é suficiente para favorecer o armazenamento da memória aversiva condicionada ao contexto e induzir um aumento da expressão generalizada de resposta de medo. Em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho demonstram que o $A_{2A}R$ desempenha um papel importante na consolidação de uma memória aversiva associativa, influenciando na especificidade e magnitude das respostas comportamentais manifestadas frente a posterior evocação destas informações.

Palavras-chave: memórias aversivas associativas; expressão generalizada da resposta de medo; neuromodulação; receptor adenosinérgico A_{2A} .

ABSTRACT

The storage of associative aversive memories is an important neurobiological process, allowing the adaptation and survival of an individual in complex and dynamic environments. Memories related to stressful and potentially damaging events are stored in a more intense and lasting way for once faced with a potential threat, the individual selects a defensive response based on his previous experiences. However, when these responses are also manifested in the presence of other non-threatening stimuli and unrelated to the original memory (a phenomenon namely generalized expression of fear response), the individuals can re-experience fear even in safe situations, living in a state of constant hypervigilance and exhibiting exacerbated physiological responses, significantly impairing their quality of life. Preclinical research has allowed investigating brain circuits, changes in synaptic plasticity, neurotransmission and neuromodulatory pathways which are performed in the processing of associated aversive memories and in the generalized expression of the fear response. In recent decades, although the adenosinergic system has emerged as a neuromodulatory pathway involved in processing emotions and storage of aversive memories, recording synaptic transmission and cellular communication, the contribution from the A_{2A} adenosinergic receptor (A_{2A}R) to aversive memories of greater intensity and for generalized expression of fear responses remain little explored, and were investigated in this work. For this, adult male Wistar rats were subjected to contextual fear conditioning protocols and the effects of A_{2A}R pharmacological modulation on behavioral, neurochemical and functional behaviors related to generalized expression of fear responses were recorded. Among the main results of this work, it was observed that the systemic administration of SCH 58261 (selective A_{2A}R antagonist) during the aversive memory consolidation resulted, in the subsequent days, in a sustained increase of fear response in paired and new contexts, suggesting that such pharmacological manipulation potentiated memory storage and increased the generalized expression of fear response. Conversely, systemic administration of CGS 21680 (selective A_{2A}R agonist) reduced freezing behavior in both paired and new context, that is, impaired aversive memory consolidation and reduced generalized expression of fear response. Likewise, it was observed through extracellular electrophysiological recordings that A_{2A}R systemic antagonism during aversive memory consolidation impairs the release of neurotransmitters in lateral amygdala slices, but not in dorsal or ventral hippocampus slices. Additionally, in slices of dorsal hippocampus, the conditioning protocol impaired the induction of long-term potentiation (LTP), being this effect reversed by the systemic antagonism of A_{2A}R. Finally, the selective A_{2A}R antagonism in the dorsal hippocampus during consolidation increased fear response in both paired and new context, i.e., it is enough to support the storage of the context-conditioned aversive memory and increases generalized expression of fear response. Together, the data obtained in the present study demonstrate that A_{2A}R plays an important role in the consolidation of an aversive associative memory, impacting the specificity and magnitude of the behavioral responses manifested in the subsequent evocation of this information.

Keywords: aversive associative memories; generalized expression of fear response; neuromodulation; A_{2A} adenosinergic receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da adenosina.	19
Figura 2 – Representação das principais vias de síntese e degradação da adenosina.	22
Figura 3 – Vias de sinalização intracelular recrutadas pela ativação do A _{2A} R	23
Figura 4 – Etapas de formação das memórias de longa duração.	27
Figura 5 – Organização anatômica e funcional do hipocampo.	34
Figura 6 – Representação esquemática do posicionamento do eletrodo de estímulo e da micropipeta de registro.	58
Figura 7 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) durante a consolidação da memória aversiva induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.	68
Figura 8 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) potencializa a consolidação da memória aversiva no protocolo de intensidade fraca de condicionamento de medo ao contexto.	69
Figura 9 – O aumento da expressão generalizada da resposta de medo induzido pela administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) durante a consolidação da memória aversiva no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto independe da ordem de exposição aos contextos.	71
Figura 10 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) em fases tardias da consolidação da memória aversiva (3 ou 6 horas) induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.	73
Figura 11 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) não potencializa a consolidação da memória aversiva ou induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de choque imediato.	74
Figura 12 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) não aumenta a resistência da memória aversiva à extinção no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.	77
Figura 13 – A administração sistêmica de CGS 21680 (0,1 ou 0,2 mg/kg) durante a consolidação da memória aversiva diminui a resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.	79

Figura 14 – A administração sistêmica de CGS 21680 (0,2 mg/kg) não prejudica a consolidação da memória aversiva e diminui a expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade forte de condicionamento de medo ao contexto.....	81
Figura 15 – A intensidade da sessão de condicionamento no protocolo de condicionamento de medo ao contexto e/ou a administração sistêmica de SCH 5826,1 (0,1 mg/kg) ou CGS 21680 (0,2 mg/kg) não alteram os níveis de BDNF no córtex pré-frontal ou hipocampo durante a consolidação da memória aversiva.....	83
Figura 16 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto de intensidade intermediária não altera o conteúdo de A _{2A} R em sinapses glutamatérgicas ou GABAérgicas durante a consolidação da memória aversiva.....	85
Figura 17 – Imagens representativas da comarcação de A _{2A} R com sinaptofisina, vGLUT ou vGAT em sinaptossomas de hipocampo dorsal, hipocampo ventral ou córtex pré-frontal de amostras obtidas durante a consolidação da memória aversiva em um protocolo de condicionamento de medo ao contexto de intensidade intermediária.....	86
Figura 18 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto e/ou o antagonismo sistêmico do A _{2A} R induzem uma facilitação de pulso pareado em fatias de hipocampo dorsal e ventral, enquanto o antagonismo sistêmico do A _{2A} R prejudica a facilitação de pulso pareado em fatias de amígdala lateral.....	89
Figura 19 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto induz um prejuízo na potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo dorsal, que é revertido pelo antagonismo sistêmico do A _{2A} R durante a consolidação da memória aversiva.....	91
Figura 20 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto e/ou o antagonismo sistêmico do A _{2A} R durante a consolidação da memória aversiva não mantém a potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo ventral.....	93
Figura 21 – O antagonismo sistêmico do A _{2A} R durante a consolidação da memória aversiva altera a magnitude da potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo ventral.	95
Figura 22 – A administração de SCH 58261 no hipocampo dorsal potencializa a consolidação da memória aversiva e induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto, mas não sustenta esses efeitos ao longo do tempo.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos que demonstram a influência da modulação do $A_{2A}R$ em testes para avaliação de diferentes tipos de memórias.	41
Tabela 2 – Anticorpos utilizados na imunocitoquímica.	56

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

μl: microlitros

μm: micrometros

A₁R = receptores adenosinérgicos A₁

A_{2A}R: receptor adenosinérgico do subtipo A_{2A}

AC: adenilil ciclase

ADP: adenosina difosfato

AMPA: ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

Arc: proteína associada ao citoesqueleto regulada por ativação (do inglês, *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*)

ATP: adenosina trifosfato

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*)

BSA: soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)

CaMKII: enzima quinase II dependente de cálcio-calmodulina

CE: córtex entorrinal

CGS 21680: 3-[4-[2-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etilcarbonil)-3,4-dihidroxi-oxolan-2-il]purina-2-il]amino]etil]fenil] propanoico, agonista seletivo do A_{2A}R

cm: centímetros

CPA: N6-ciclopentiladenosina, agonista seletivo dos A₁R

CPFm: córtex pré-frontal medial

CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc

CS: projeções colaterais de Schaffer

DMSO: dimetilsulfóxido

DPCPX: 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina, antagonista seletivo dos A₁R

DSM: Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (do inglês, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)

EDTA: ácido etileno-diamino-tetra-acético (do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ENT1 e ENT2: transportadores bidirecionais de nucleosídeos

FM: fibras musgosas

FRET: transferência de energia de ressonância por fluorescência (do inglês, *fluorescence resonance energy transfer*)

G: Gauge

GD: giro denteado

Hz: Hertz

i.p.: via intraperitoneal

KCl: cloreto de potássio

kg: quilogramas

L-PIA: N6-(L- fenilisopropil) adenosina, análogo da adenosina

LTD: depressão de longa duração (do inglês, *long-term depression*)

LTP: potencialização de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*)

mA: miliampere

mg: miligramas

ml: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

ms: milissegundos

mTORC1: complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês, *mechanistic target of rapamycin complex 1*)

NaCl: cloreto de sódio

ng: nanogramas

NMDA: N-metil D-aspartato

°C: graus Celsius

PBS: tampão fosfato (do inglês, *phosphate-buffered saline*)

PEPS: potenciais excitatórios pós-sinápticos

pg: picogramas

PKA: proteína quinase A

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PPR: razão entre pulsos pareados (do inglês, *paired-pulse ratio*)

s.c.: via subcutânea

S: subículo

SCH 58261: 2-(2-Furanil)-7-(2-feniletil)-7H-pirazol[4,3-e]-[1,2,4]-triazol-[1,5-c]=pirimidina-5-amina, antagonista seletivo do A_{2A}R

SNC: sistema nervoso central

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático

TrkB: receptor de tropomiosina quinase B (do inglês, *tropomyosin receptor kinase B*)

USP: sistema ubiquitina-proteossoma

VGCCs: canais de cálcio dependentes de voltagem (do inglês, *voltage-gated calcium channel*)

VP: via perforante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O SISTEMA ADENOSINÉRGICO	19
1.1.1 O receptor A_{2A}	22
1.1.2 O receptor A_{2A} no sistema nervoso central	24
1.2 MEMÓRIA	25
1.2.1 A formação e manutenção das memórias	25
1.2.2 As bases moleculares da consolidação das memórias	27
1.2.3 Os substratos neurais para o processamento de memórias	30
1.2.4 A influência das emoções sobre as memórias	31
1.2.5 A consolidação das memórias aversivas	31
1.2.6 A generalização do medo	35
1.2.7 Os transtornos psiquiátricos relacionados às memórias aversivas	37
1.2.8 As ferramentas experimentais para estudo de memórias aversivas e generalização do medo	38
1.3 A INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO ADENOSINÉRGICA EM PROCESSOS DE APRENDIZADO E MEMÓRIA	40
1.3.1 O receptor A_{2A} e as memórias aversivas	46
2 OBJETIVOS	48
2.1 OBJETIVO GERAL	48
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 ANIMAIS	49
3.2 DROGAS	49
3.3 PROCEDIMENTOS PARA INJEÇÃO INTRAHIPOCAMPAL DE DROGAS.....	50
3.3.1 Cirurgia estereotáxica e implantação de cânulas-guia	50
3.3.2 Injeção intrahipocampal	50
3.3.3 Análise histológica	52
3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO.....	52
3.5 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO LIGADO À ENZIMA (ELISA)	54
3.6 PREPARAÇÃO DE SINAPTOSSOMAS E IMUNOCITOQUÍMICA	54
3.7 ELETROFISIOLOGIA EXTRACELULAR	56
3.7.1 Preparação das fatias de hipocampo	56

3.7.2 Obtenção de registros eletrofisiológicos extracelulares no hipocampo e na amígdala lateral.....	57
3.7.2.1 <i>Estimulação por pulsos pareados.....</i>	58
3.7.2.2 <i>Potenciação de longa duração.....</i>	59
3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
3.8.1 Experimento 1 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e a expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária.....	59
3.8.2 Experimento 2 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade fraca.....	60
3.8.3 Experimento 3 – Efeito da ordem de exposição aos contextos após a sessão de condicionamento sobre as resposta de medo condicionado e expressão generalizada de medo induzidas pelo antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva em um protocolo de intensidade intermediária.....	60
3.8.4 Experimento 4 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante fases tardias da consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária.....	60
3.8.5 Experimento 5 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária de choque imediato.....	61
3.8.6 Experimento 6 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva na posterior extinção dessa memória em um protocolo de intensidade intermediária.....	61
3.8.7 Experimento 7 – Efeito do agonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária.....	62
3.8.8 Experimento 8 – Efeito do agonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade forte.....	62
3.8.9 Experimento 9 – Efeito da modulação farmacológica sistêmica do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva e/ou da modulação da intensidade do protocolo de condicionamento de medo ao contexto sobre o conteúdo de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo.....	62
3.8.10 Experimento 10 – Efeito do protocolo de condicionamento de intensidade intermediária sobre a distribuição do A_{2A}R em sinapses glutamatérgicas ou GABAérgicas do córtex pré-frontal, hipocampo dorsal e hipocampo ventral durante a consolidação da memória aversiva.....	63

3.8.11 Experimento 11 – Efeito do antagonismo sistêmico do A _{2A} R e/ou do protocolo de condicionamento de intensidade intermediária na estimulação de pulso pareado em fatias das porções dorsal ou ventral do hipocampo, ou na porção lateral da amígdala.....	64
3.8.12 Experimento 12 – Efeito do antagonismo sistêmico do A _{2A} R e/ou do protocolo de condicionamento de intensidade intermediária na estimulação de alta frequência em fatias das porções dorsal ou ventral do hipocampo, ou na porção lateral da amígdala.....	64
3.8.13 Experimento 13 – Efeito do antagonismo do A _{2A} R no hipocampo dorsal durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária.....	65
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	66
4 RESULTADOS.....	67
4.1 EXPERIMENTO 1 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA.....	67
4.2 EXPERIMENTO 2 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R POTENCIALIZA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE FRACA.....	69
4.3 EXPERIMENTO 3 – A ORDEM DE EXPOSIÇÃO AOS CONTEXTOS APÓS A SESSÃO DE CONDICIONAMENTO NÃO INTERFERE NO AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO INDUZIDO PELO ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA.....	70
4.4 EXPERIMENTO 4 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R DURANTE FASES MAIS TARDIAS DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA TAMBÉM PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA.....	71
4.5 EXPERIMENTO 5 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA NÃO INDUZ SENSIBILIZAÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS.....	74
4.6 EXPERIMENTO 6 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA NÃO RESULTA EM POSTERIOR RESISTÊNCIA À EXTINÇÃO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA.....	75
4.7 EXPERIMENTO 7 – O AGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA PROMOVE DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA.....	78

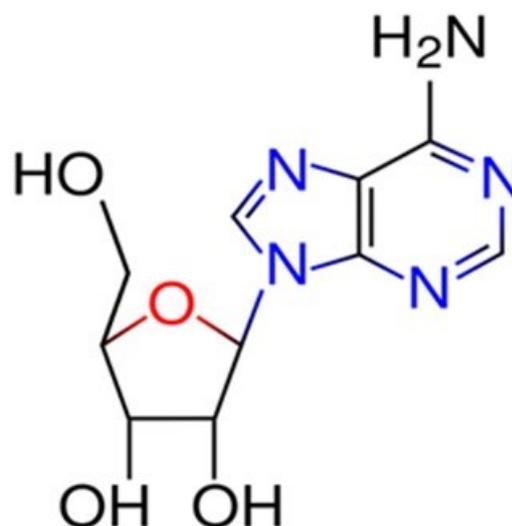
4.8 EXPERIMENTO 8 – O AGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA PROMOVE DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DE MEDO NOS CONTEXTOS PAREADO E NÃO PAREADO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE FORTE.....	80
4.9 EXPERIMENTO 9 – A MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA SISTÊMICA DO A _{2A} R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E/OU A INTENSIDADE DO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO NÃO ALTERAM OS NÍVEIS DE BDNF NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E NO HIPOCAMPO	82
4.10 EXPERIMENTO 10 – O PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA NÃO ALTERA A DISTRIBUIÇÃO DO A _{2A} R EM SINAPSES GLUTAMATÉRGICAS OU GABAÉRGICAS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, HIPOCAMPO DORSAL E HIPOCAMPO VENTRAL DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA	84
4.11 EXPERIMENTO 11 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R E/OU O PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA NÃO ALTERAM A FACILITAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO DE PULSO PAREADO NAS PORÇÕES DORSAL OU VENTRAL DO HIPOCAMPO, MAS O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R PREJUDICA ESSE MECANISMO NA AMÍGDALA LATERAL	87
4.12 EXPERIMENTO 12 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A _{2A} R REVERTE O PREJUÍZO DA POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO INDUZIDO PELO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA NO HIPOCAMPO DORSAL.....	90
4.13 EXPERIMENTO 13 – O ANTAGONISMO DO A _{2A} R NO HIPOCAMPO DORSAL POTENCIALIZA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA, MAS NÃO SUSTENTA ESSES EFEITOS AO LONGO DO TEMPO	96
5 DISCUSSÃO	99
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
7 REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA ADENOSINÉRGICO

A adenosina é um nucleosídeo endógeno formado pela união de uma adenina e uma ribose. É uma base nitrogenada classificada quimicamente como uma purina, devido a presença de um anel pirimidínico fundido a um anel imidazólico (Figura 1). A adenosina está presente constitutivamente em todos as células e tecidos do corpo humano, sendo uma molécula central na modulação do metabolismo energético celular, síntese de ácidos nucleicos e metabolismo de aminoácidos, além de ser um metabólito intermediário importante para a síntese de adenosina monofosfato cíclico (o AMPc), um importante sinalizador intracelular que participa como amplificador de sinal em diversas vias de sinalização intracelulares, sobretudo àquelas que recrutam a ativação das subunidades de receptores acoplados a proteína G (WEI; LI; CHEN, 2011). Atualmente, o papel da adenosina como neuromodulador também já está bem estabelecido. Apesar de não ser armazenada e liberada a partir de vesículas como neurotransmissores convencionais, a adenosina atua como um importante neuromodulador ao regular a liberação de outros neurotransmissores, como o glutamato (FERREIRA et al., 2015) e a dopamina (GARÇÃO et al., 2013), e a excitabilidade pós-sináptica em diversas estruturas cerebrais (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009).

Figura 1 – Estrutura química da adenosina.



Legenda: Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-caffeine-and-adenosine_fig1_327720336, 2020.

O papel das purinas (como a adenosina) como moléculas de sinalização extracelular foi experimentalmente comprovado pela primeira vez por Alan Drury e Szent-Györgyi von Nagyra-Polt em 1929 (DRURY; SZENT-GYÖRGYI, 1929). Neste trabalho, eles demonstraram que extratos brutos de macerados de vários tecidos diferentes (como músculo cardíaco, cérebro, rim e baço) de bovinos e ovinos, quando injetados por via intravenosa em animais anestesiados (cobaias, coelhos, gatos e cães), provocavam redução da frequência cardíaca. Além disso, produziam também dilatação de vasos sanguíneos coronários que resultava hipotensão severa e diminuição da pressão arterial. O componente ativo desses extratos foi identificado como sendo a adenosina. Drury e Szent-Györgyi também descobriram que a adenosina poderia normalizar a taquiarritmia supraventricular, e atualmente existem formulações comerciais para tal aplicação clínica.

Ao longo das três décadas seguintes, os efeitos cardiovasculares e de contração de musculatura lisa exercidos pela adenosina foram extensivamente estudados. Entretanto, foi apenas em 1965 que De Gubareff e Sleator postularam a existência de receptores para adenosina (DE GUBAREFF; SLEATOR, 1965). Eles demonstraram que a cafeína era capaz de reverter as ações da adenosina no músculo atrial (como por exemplo a diminuição da frequência cardíaca e da concentração de cálcio), sugerindo que esses dois compostos estruturalmente semelhantes agiriam no mesmo local ou sítio receptor para exercerem seus efeitos. Até o início dos anos 1970 vários cientistas demonstraram quase que simultaneamente a presença de adenosina no cérebro de mamíferos e sua capacidade de elevar os níveis de cAMP, sugerindo um efeito regulatório sobre a enzima adenilil ciclase (AC), que havia sido recentemente descoberta (SHIMIZU; DALY; CREVELING, 1969). Sattin e Rall demonstraram no seu trabalho publicado em 1970, utilizando fatias de cérebro de porquinhos-da-índia, que esse aumento de AMPc era dependente da concentração de adenosina, e que era antagonizado pela teofilina e pela cafeína, também de maneira concentração-dependente (SATTIN; RALL, 1970).

Foi observado que a adenosina tinha a capacidade tanto de estimular quanto de inibir a atividade da AC, dependendo da concentração empregada. Utilizando uma série de análogos da adenosina, Londos e Wolff demonstraram em 1977 que dependendo da modificação estrutural da molécula em relação à adenosina, era observada uma estimulação ou inibição da AC em plaquetas e membranas de células hepáticas (LONDOS; WOLFF, 1977). Eles sugeriram, então, a presença de dois sítios de ligação para a adenosina nessa enzima: um sítio “R” estimulatório (que era dependente de modificações no núcleo purínico da molécula) e um sítio “P” inibitório (dependente de modificações na ribose dessa molécula). Esses sítios foram identificados nos anos seguintes como sendo, na verdade, receptores distintos presentes na

porção externa da membrana celular, denominados de receptores A_1 e A_2 , sendo o receptor A_1 (responsivo a menores concentrações de adenosina) capaz de inibir e o A_2 de estimular a AC (VAN CALKER; MÜLLER; HAMPRECHT, 1979). A partir da década de 1980, através de ensaios de ligação e de clonagem molecular, foi demonstrada a existência de dois subtipos do receptor A_2 , A_{2A} e A_{2B} (BRUNS; DALY; SNYDER, 1980), além da existência de receptores A_3 (ZHOU et al., 1992).

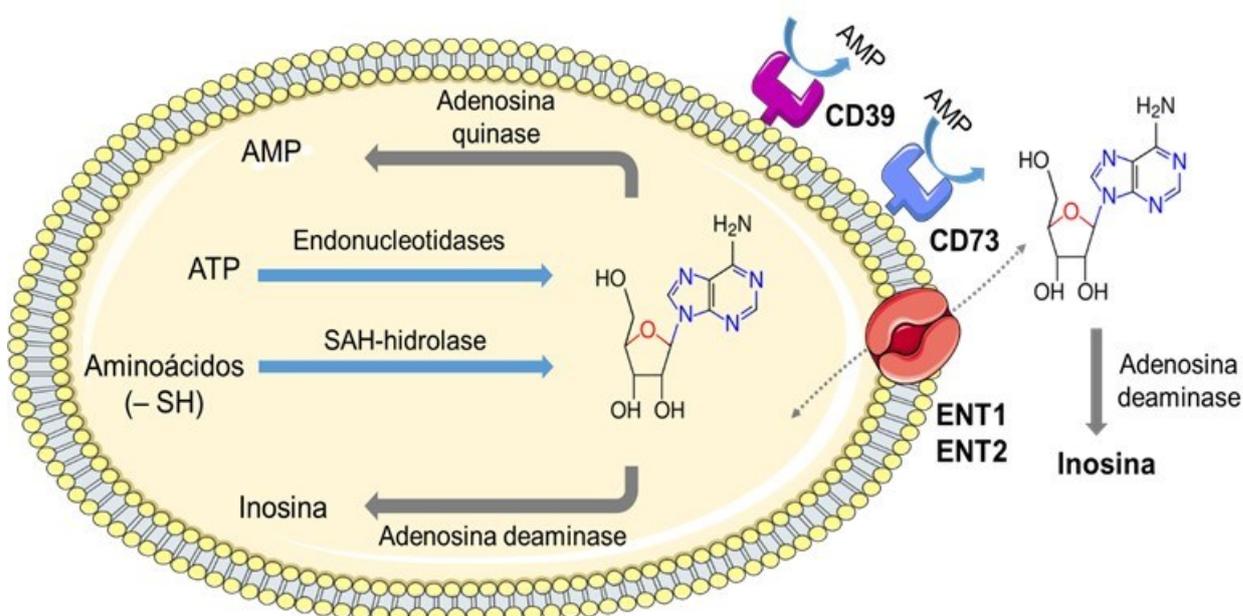
Atualmente, sabe-se que todos os receptores adenosinérgicos são compostos por uma única cadeia polipeptídica com 7 domínios hidrofóbicos transmembranares que interagem com proteínas G. A ligação da adenosina ou de agonistas exógenos a estes receptores estabiliza sua mudança conformacional, facilitando sua interação com as subunidades da proteína G a qual estão acoplados e promovendo a ativação ou inibição de vias efetoras intracelulares. Os receptores A_1 e A_3 são acoplados a proteínas G inibitórias, levando à inibição da atividade da enzima AC e diminuição da concentração AMPc. Por outro lado, os receptores A_{2A} e A_{2B} estão acoplados a proteínas G estimulatórias, que culminam na ativação da AC e aumento da síntese de AMPc (JACOBSON; GAO, 2006).

A concentração extracelular de adenosina influencia a ativação desses quatro subtipos de receptores, que possuem afinidade de ligação distinta. Fisiologicamente, a adenosina está presente tanto no meio intra quanto extracelular, em concentrações baixas (na faixa de alguns poucos nanomolares), sendo que seus níveis aumentam durante condições que envolvem aumento da demanda metabólica e/ou falta de oxigênio como, por exemplo, epilepsia, isquemia, dor, inflamação e câncer. Os receptores A_1 e A_{2A} são ativados mais facilmente (ou seja, perante menores concentrações de adenosina) que os A_3 e A_{2B} (FREDHOLM et al., 2001). A adenosina ativa os receptores A_1 , A_{2A} e A_3 com valores de EC_{50} (concentração que induz metade do efeito máximo) entre 10 nM a 1 μ M. Já para a ativação do receptor A_{2B} , são necessárias concentrações de adenosina acima de 10 μ M, muito acima dos valores fisiológicos dessa purina (que permanece abaixo de 1 μ M) (ELTZSCHIG, 2009). Assim, a ativação de receptores A_1 , A_{2A} e A_3 pode ocorrer em condições fisiológicas, ao passo que a ativação do receptor A_{2B} ocorreria apenas em condições muito restritas.

A concentração de adenosina nos diferentes compartimentos biológicos é determinada por sua síntese, transporte transmembrana e degradação (CUNHA, 2001). A síntese de adenosina ocorre tanto no meio extra quanto intracelular (Figura 2). No meio intracelular, a adenosina é formada predominantemente a partir de adenosina trifosfato (ATP) e difosfato (ADP) sob ação de enzimas endonucleotidases (ou 5-nucleotidases). Outra fonte intracelular de adenosina é a hidrólise de S-adenosil-L-homocisteína, um intermediário na síntese do

aminoácido cisteína (LATINI; PEDATA, 2001). A degradação intracelular de adenosina ocorre através da ação das enzimas adenosina quinase e adenosina deaminase. Já no meio extracelular, a adenosina pode ser sintetizada partir do ATP (co-secretado com neurotransmissores ou liberado como neuro ou gliotransmissor), sob ação das enzimas ecto-nucleotidases CD39 e CD73 que se encontram ancoradas na superfície da membrana celular, e metabolizada pela enzima adenosina deaminase. Ainda, existem transportadores bidirecionais de nucleosídeos que permitem tanto a liberação de adenosina para o meio extracelular, assim como a sua captação para o interior das células (ELTZSCHIG, 2009).

Figura 2 – Representação das principais vias de síntese e degradação da adenosina.



Legenda: No meio intracelular, a adenosina pode ser sintetizada por enzimas endonucleotidases a partir de adenosina trifosfato (ATP) e difosfato (ADP), bem como a partir de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) através da enzima SAH-hidrolase. As enzimas adenosina quinase e adenosina deaminase são responsáveis pela degradação intracelular da adenosina. No meio extracelular, a adenosina pode ser sintetizada partir do ATP sob ação das enzimas ecto-nucleotidases CD39 e CD73 que se encontram ancoradas na superfície da membrana celular. A metabolização extracelular de adenosina é mediada pela enzima adenosina deaminase. Ainda, transportadores bidirecionais de nucleosídeos (ENT1 e ENT2) permitem tanto a liberação de adenosina para o meio extracelular, como a sua captação para o interior das células. Fonte: adaptado de www.smart.servier.com (2020).

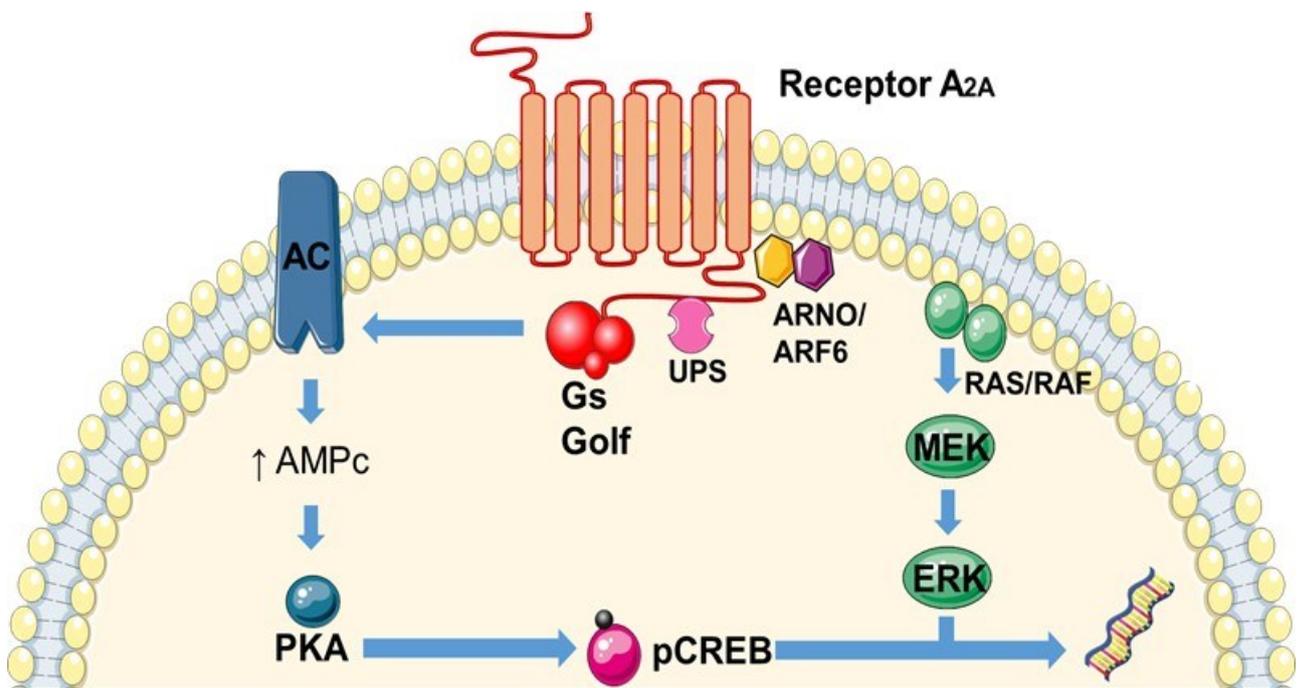
1.1.1 O receptor A_{2A}

O receptor A_{2A} (A_{2A}R) foi clonado pela primeira vez em 1990 em glândulas tireoide de cachorros (MAENHAUT et al., 1990) e, 2 anos depois, no cérebro de ratos e humanos (CHERN et al., 1992; FURLONG et al., 1992). O primeiro camundongo nocaute para o gene ADORA2A, que codifica o A_{2A}R, foi gerado em 1997 (LEDENT et al., 1997). Já nos últimos

anos, através da utilização da técnica de cristalografia, foi determinada a estrutura e disposição do $A_{2A}R$ nas membranas celulares, bem como os sítios de ligação para a adenosina e o ZM241385, um antagonista desse receptor (JAAKOLA et al., 2008; LEBON et al., 2011).

Aprofundando mais detalhadamente sobre as vias de sinalização envolvidas com a ativação do $A_{2A}R$ (Figura 3), como já citado, ele interage diretamente com proteínas G estimulatórias, do tipo Gs em tecidos periféricos e Golf no sistema nervoso central (SNC), estimulando a via AC-AMPC-PKA, recrutando fatores de transcrição como o CREB (DE LERA RUIZ; LIM; ZHENG, 2014). Além disso, o $A_{2A}R$ contém uma longa porção C-terminal (mais de 120 resíduos de aminoácidos) que interage com diversas outras proteínas (chamadas de “acessórias”) de maneira independente da proteína G, tais como alfa-actina, ARNO, USP4 que, por sua vez, acarretam no recrutamento de outras vias de sinalização, como das MAP quinases (ZEZULA; FREISSMUTH, 2008).

Figura 3 – Vias de sinalização intracelular recrutadas pela ativação do $A_{2A}R$.



Legenda: AC= Adenilil ciclase; CREB= Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc; PKA= Proteína quinase A; UPS= Sistema ubiquitina-proteossoma. Fonte: adaptado de www.smart.servier.com, 2020.

Quanto à sua distribuição e funções biológicas no organismo de mamíferos, o $A_{2A}R$ é expresso em maior quantidade no baço, no timo, no leucócitos e plaquetas, e em neurônios no estriado e bulbo olfatório no SNC, onde estão envolvidos principalmente com o controle da síntese e liberação de citocinas e neurotransmissores, e modulam diversos processos biológicos, como a dor e inflamação, agregação plaquetária, locomoção, motivação e recompensa, entre

outros (DE LERA RUIZ; LIM; ZHENG, 2014). Ainda, o A_{2A}R é expresso em menor quantidade (mas nem por isso são menos importantes) nos vasos sanguíneos (onde promovem vasodilatação), no coração (onde diminuem a contração cardíaca), nos pulmões (controlando a síntese e liberação de citocinas relacionadas com processos inflamatórios) e em outras regiões do SNC, como hipocampo e córtex pré-frontal, onde tem sido relacionado com o controle da liberação de neurotransmissores, motivação e recompensa, com uma ação pró-convulsivamente, e processos de aprendizado e memória (DE LERA RUIZ; LIM; ZHENG, 2014).

1.1.2 O receptor A_{2A}R no sistema nervoso central

O A_{2A}R pode estar localizado em diferentes populações celulares no SNC (como neurônios, astrócitos, micróglia e células endoteliais), assim como em diferentes regiões subcelulares. Rebola e colaboradores demonstraram em 2005, através de ensaios de ligação e de comarcação por técnicas de *western blot* e imunohistoquímica que o A_{2A}R tem uma distribuição subcelular e subsináptica distinta no estriado e no hipocampo (REBOLA et al., 2005). Eles demonstraram que, enquanto no estriado o A_{2A}R está localizando principalmente no corpo celular ou dendritos com localização extra-sináptica, visto que apenas uma pequena quantidade do receptor encontra-se em regiões com marcação para proteínas sinápticas, no hipocampo ele está localizado preferencialmente em regiões sinápticas de terminais nervosos.

Além da distribuição subcelular e subsináptica distinta do A_{2A}R no estriado e no hipocampo, outra questão importante é a sua dinâmica de ativação. Enquanto o receptor adenosinérgico do subtipo A₁ é ativado preferencialmente pela adenosina sintetizada por ectonucleotidases a partir do ATP liberado como gliotransmissor sob estimulação de baixa frequência, a ativação endógena do A_{2A}R ocorre preferencialmente pela adenosina formada por ectonucleotidases a partir do ATP secretado por neurônios frente estimulação de alta frequência (CUNHA, 2008). A ativação do A_{2A}R, por sua vez, aumenta a atividade dos transportadores de nucleosídeos, promovendo um aumento na recaptação de adenosina e limitando sua disponibilidade para ativar os receptores inibitórios A₁ (PINTO-DUARTE et al., 2005). Dessa maneira, a ativação do A_{2A}R facilita a transmissão sináptica tanto diretamente através do recrutamento de proteínas G estimulatórias, quanto indiretamente via diminuição da ativação do receptor A₁ (CUNHA, 2008).

A complexidade da distribuição e da ativação do A_{2A}R, bem como sua capacidade de facilitar a transmissão sináptica e a comunicação celular, os tornam um alvo de estudo

interessante para a modulação de funções biológicas relacionados ao SNC, tais como processos de aprendizado e memória.

1.2 MEMÓRIA

O aprendizado reflete a capacidade de um indivíduo adquirir informações referentes a uma nova experiência. A retenção e posterior acesso dessas informações, por sua vez, caracteriza a formação das memórias. Com isso, cada indivíduo possui um conjunto de memórias único de acordo com as experiências com as quais se deparou ao longo de sua vida, que moldam sua percepção sobre o mundo, sua personalidade e seu comportamento frente às mais diversas situações (DUDAI, 2004).

1.2.1 A formação e manutenção das memórias

Durante o final do século XIX foi publicado pelos psicólogos alemães Müller e Pilzecker um dos primeiros trabalhos de grande impacto para o estudo das memórias, na tradução para o português “Contribuições Experimentais para a Teoria da Lembrança” (MÜLLER; PILZECKER, 1900). Os achados experimentais desse trabalho demonstraram que as memórias não são formadas instantaneamente após a aquisição de novas informações, mas sim que necessitam de uma janela temporal durante a qual são gradualmente estabilizadas, sendo susceptíveis à ação de interferentes durante este período. O termo consolidação da memória (do latim *consolidare*, “tornar concreto”) foi, então, introduzido na literatura científica para se referir a essa janela temporal.

Posteriormente aos achados de Müller e Pilzecker sobre a consolidação das memórias, iniciou-se então a busca por quais alterações ocorrem durante essa janela temporal e que permitem o armazenamento duradouro de informações. Um dos pesquisadores mais importantes na área foi Santiago Ramón y Cajal, médico e histologista espanhol, considerado até hoje o pai da Neurociência moderna. Através de técnicas de marcação de estruturas neuronais, Ramón y Cajal sugeriu que a memória poderia decorrer de modificações estruturais das conexões sinápticas, como a formação de espinhas dendríticas (YUSTE, 2015). Quase meio século mais tarde, no livro “A Organização do Comportamento”, o neurocientista canadense Donald Hebb, baseado nos achados de Ramón y Cajal, sugeriu que “Quando um neurônio despolariza outro de maneira repetida e persistente, algum processo de crescimento ou alteração metabólica acontece e aumenta a eficiência em ativar esse conjunto de células”, ou seja, que o

aprendizado fortalece as conexões sinápticas entre os neurônios e, assim, facilita a formação de representações neuronais.

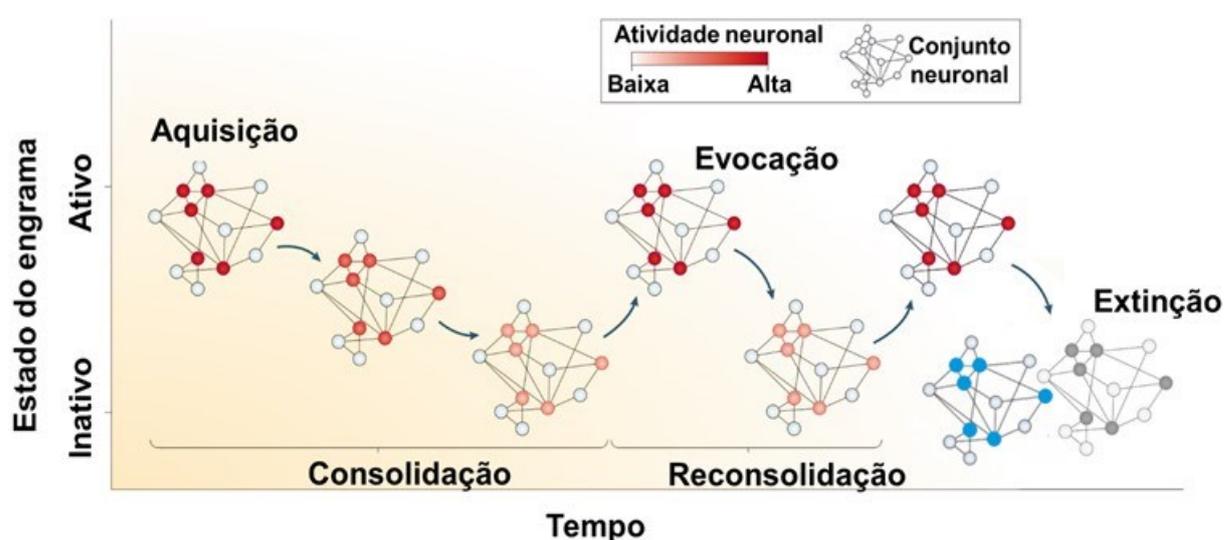
Um dos trabalhos mais relevantes que sustentou a teoria de Hebb foi o dos pesquisadores noruegueses Terje Lømo e Tim Bliss em 1973 (BLISS; LØMO, 1973). Nesse trabalho, eles demonstraram que a estimulação repetida de fibras nervosas de vias hipocâmpais de coelhos anestesiados promovia um aumento dos potenciais excitatórios nos neurônios pós-sinápticos que persistia por algumas horas, ou seja, ocorria um aumento sustentado na eficiência sináptica em decorrência da aplicação de impulsos sucessivos. A esse fenômeno eletrofisiológico foi cunhado o termo potencialização de longa duração (do inglês, *long term potentiation* – LTP). Desde o trabalho de Bliss e Lømo, vem sendo proposto que a LTP é o mecanismo celular básico que permite o estabelecimento das alterações sinápticas necessárias para o armazenamento de memórias, através do recrutamento de diversas vias intracelulares e que, além do hipocampo, a ocorrência da LTP após a apresentação de um estímulo também já foi observada no córtex pré-frontal medial e a amígdala (SWEATT, 2016).

Por muito tempo acreditou-se que a consolidação de uma memória se estendia por algumas horas após a aquisição de novas informações (enquanto ocorrem alterações funcionais como a LTP) e que, após esse período, a memória se tornaria estável e já não seria mais susceptível a interferentes. Entretanto, trabalhos publicados na década de 1960 (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; SCHNEIDER; SHERMAN, 1968) demonstraram que uma memória evocada (lembrada) um dia após a aquisição (ou seja, após a janela de consolidação já ter se encerrado) era perdida ou prejudicada se algum agente que conhecidamente interferia com a consolidação da memória (como a eletroconvulsoterapia) era introduzido. Diversos trabalhos utilizando outras tarefas e agentes amnésicos reforçavam esses achados da década de 1960, mas somente após a publicação independente dos trabalhos de Susan Sara e Karim Nader, Schafe e Ledoux no ano de 2000 (NADER et al., 2000; SARA, 2000) passou a ser aceito na literatura científica que uma memória previamente consolidada pode se tornar novamente lábil após sua evocação e necessitar de um período de re-estabilização ou reconsolidação.

No entanto, nem todas as memórias de um indivíduo persistem e são lembradas e reconsolidadas ao longo do tempo. Embora quando pensamos em esquecimento muitas vezes remetemos a quadros de declínio cognitivo, o esquecimento tem uma importância fisiológica muito grande pois propiciaria a remoção de informações irrelevantes e desnecessárias, visto que muitas memórias formadas ao longo de nossas vidas apresentam pouca relevância do ponto de vista adaptativo. Uma memória é esquecida quando a população celular responsável pelo seu armazenamento – o engrama – é perdido (o que ocorre em doenças neurodegenerativas,

como a doença de Alzheimer) ou está temporariamente inacessível. O último caso caracteriza a extinção da memória, que ocorre quando uma nova memória muito semelhante com a original é formada e se sobrepõem a ela, não sendo possível lembrar as informações referentes ao evento original (Figura 4). Tanto a extinção quanto a reconsolidação da memória têm sido estudadas com estratégias para intervenção terapêutica em memórias que apresentam um impacto negativo sobre a qualidade de vida de um indivíduo, como as memórias de caráter emocional aversivo (KINDT; VAN EMMERIK, 2016; SMITH et al., 2017).

Figura 4 – Etapas de formação das memórias de longa duração.



Legenda: Após a aquisição de uma informação, a memória se encontra lábil e sensível a interferentes, sendo necessária a sua consolidação para estabilizar o traço de memória (o engrama, representado em vermelho) e permitir a sua evocação posterior. Quando evocada ou lembrada, a memória é reativada e pode ser desestabilizada, sendo necessária uma nova etapa de estabilização, a reconsolidação para mantê-la em sua forma estável. Durante a reconsolidação, a memória poderá permanecer inalterada, bem como informações poderão ser adicionadas ou retiradas. Após evocada e desestabilizada, uma memória também poderá ser extinta, ou seja, a exposição frequente ou longa a um estímulo condicionado na ausência do reforço ou estímulo incondicionado promove reduções nas respostas condicionadas devido a formação de uma nova memória, de valência oposta (representada em azul), que se sobrepõem à memória original (representada em cinza). Fonte: adaptado de JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015.

1.2.2 As bases moleculares da consolidação das memórias

A teoria de Hebb é aceita até hoje e conhecida como plasticidade sináptica Hebbiana, sendo caracterizada pela capacidade de remodelação sináptica mediante estimulação sináptica e pela geração de respostas de maior magnitude nos neurônios pós-sinápticos (JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015; NICOLL, 2017). Os mecanismos envolvidos na indução e manutenção desses processos durante a LTP têm sido extensivamente investigados, e

atualmente já é bem estabelecida a importância da transmissão glutamatérgica e recrutamento dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico) e NMDA (N-metil D-aspartato) (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 2006).

Enquanto os receptores AMPA são prontamente ativados após a ligação com o glutamato e tornam-se permeáveis ao influxo de sódio, a ativação dos receptores NMDA é dependente de voltagem, uma vez que o bloqueio físico com íons magnésio é removido apenas mediante despolarização da membrana. Portanto, os receptores NMDA conduzem pouca corrente em potenciais de membrana em repouso. Além disso, os receptores NMDA são altamente permeáveis a íons cálcio (WATKINS; JANE, 2006). A entrada de cálcio através do receptor NMDA ativa a enzima quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII), necessária e suficiente para a LTP, sobretudo através da ligação com a proteína estrutura actina, alargamento das espinhas dendríticas e acúmulo de receptores AMPA na sinapse (LISMAN; YASUDA; RAGHAVACHARI, 2012), os quais sustentam a potenciação duradoura na eficiência sináptica.

A manutenção da LTP após a sua indução é dependente de síntese proteica (KRUG; LOSSNER; OTT, 1984; ABRAHAM; WILLIAMS, 2008). O influxo de cálcio através dos receptores NMDA e ativação da CaMKII promove o recrutamento de vias intracelulares e fatores de transcrição, como o CREB (do inglês, *cAMP-responsive element binding protein*) e o mTORC1 (do inglês, *mechanistic target of rapamycin complex 1*). Também, é observado um aumento dos componentes da maquinaria translacional (ribossomos) e de RNA mensageiro nas espinhas dendríticas (SOSSIN; LACAILLE, 2010).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*) também tem que mostrado como um modulador importante da fase tardia de manutenção da LTP nas sinapses glutamatérgicas, onde é armazenado em vesículas e liberado após despolarização em resposta a estímulos, tanto na pré- quanto na pós-sinapse (PANJA; BRAMHAM, 2014). A ativação do receptor TrkB (do inglês, *Tropomyosin receptor kinase B*) pelo BDNF promove um alargamento das espinhas dendríticas dependente de síntese proteica. Isso ocorre através do recrutamento de mTORC1 (TAKEI et al., 2004; TANAKA et al., 2008) e síntese de Arc (do inglês, *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), uma proteína de função estrutural envolvida na polimerização da actina, e necessária para a manutenção da LTP (KORB; FINKBEINER, 2011).

Embora evidente que a manutenção da LTP seja dependente de alterações em regiões pós-sinápticas, o componente pré-sináptico também desempenha um papel importante. A

ativação de receptores pré-sinápticos (tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos) propicia a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCCs, do inglês, *voltage-gated calcium channel*), e aumenta a mobilização de vesículas e a probabilidade de liberação de neurotransmissor (CATTERALL; FEW, 2008). A ativação desses receptores, por sua vez, é mediada tanto através da síntese local de neuromoduladores, quanto via sinalização retrógrada ou gliotransmissão (MONDAY; YOUNTS; CASTILLO, 2018). Também, já foi demonstrado que o BDNF diminui a motilidade das mitocôndrias e favorece o seu acoplamento pré-sináptico, aumentando a oferta do ATP necessário para funcionamento da maquinaria enzimática local (SU et al., 2014). Além de enzimas envolvidas diretamente na liberação de neurotransmissores, enzimas responsáveis pela degradação proteica ou componentes do proteossoma e do lisossoma também têm papéis críticos na plasticidade sináptica (MONDAY; YOUNTS; CASTILLO, 2018).

Adicionalmente, a via de transdução de sinal mediada pelo óxido nítrico apresenta papel importante na comunicação sináptica durante eventos plásticos envolvidos na formação de memórias. No cérebro, o óxido nítrico é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase neuronal mediante aumento do cálcio intracelular e atua como um sinalizador retrógrado, ativando a enzima guanilil ciclase e resultando no aumento dos níveis de GMPc no terminal pré-sináptico, cujo envolvimento na formação de memórias vem sendo demonstrado (OVEREEM et al., 2010; GIESE; MIZUNO, 2013).

Por fim, além da LTP, a depressão de longa duração (do inglês, *long term depression* – LTD) também é um fenômeno eletrofisiológico dependente importante para a remodelação sináptica e armazenamento de memórias, e que compartilha características comuns com a LTP, tais como a dependência de estimulação neuronal, recrutamento de receptores glutamatérgicos NMDA, ativação de cascatas de sinalização intracelular dependentes de cálcio e síntese proteica. Entretanto, enquanto a LTP favorece a despolarização sustentada de neurônios pós-sinápticos, a LTD promove o efeito oposto. Na LTD, após estimulação sináptica de baixa frequência e influxo de cálcio através de receptores glutamatérgicos de NMDA ocorre a ativação de fosfatases dependentes de cálcio (como a calcineurina) que, por sua vez, removem a inibição da proteína fosfatase-1 (PP1) e resultam na desfosforilação e internalização de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, reduzindo a força da transmissão sináptica.

Assim, embora ambos os processos de LTP e LTD sejam necessários para a homeostasia da comunicação celular dependente da transmissão glutamatérgica, e influenciem o armazenamento das memórias, o padrão temporal em que ocorrem ainda é pouco compreendido (NABAVI et al., 2014).

1.2.3 Os substratos neurais para o processamento de memórias

O termo “engrama” foi introduzido na literatura científica relacionada a processos de aprendizado e memória mais de 100 anos atrás, e refere-se ao substrato físico de armazenamento dessas informações (JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015). No início do século XIX, o médico alemão Franz Joseph Gall propôs a teoria (conhecida como “frenologia”) de que o córtex cerebral não é homogêneo e contém centros distintos que controlam as funções mentais específicas. Posteriormente, entre as décadas de 1920 a 1950, o psicólogo Karl Lashley baseou-se nessa teoria para mapear as áreas corticais responsáveis pela discriminação visual e pelo aprendizado e armazenamento das memórias em ratos (LASHLEY, 1950). Entretanto, Lashley concluiu que não havia apenas uma única área responsável por tal função, mas sim, que a capacidade de adquirir e armazenar memórias estava distribuído dentro das áreas corticais em todo o córtex e que qualquer uma dessas áreas poderia suportar o engrama. Ainda, com base na observação de que o tamanho da área cortical removida, e não sua localização, influenciava os efeitos observados e a gravidade da perda de memória, ele concluiu que essas regiões agiam juntas para sustentar o engrama (EICHENBAUM, 2016).

Após os estudos de Karl Lashley, o caso clínico do “paciente H.M.” na década de 1950 esclareceu alguns aspectos importantes em relação às estruturas encefálicas responsáveis pelo armazenamento e recuperação de diferentes tipos de memória (SQUIRE; DEDE, 2015). O paciente H.M. era o americano Henry Molaison, que em 1953 submeteu-se a um procedimento experimental visando a atenuação da epilepsia grave que apresentava desde que sofreu um acidente de bicicleta durante sua infância. Durante esse procedimento foram retiradas estruturas cerebrais localizadas no lobo temporal, onde se acreditava estar o foco epiléptico. Entretanto, embora as crises epiléticas tenham cessado, Henry passou a apresentar amnésia severa, esquecendo-se de eventos diários logo após seu acontecimento, sem apresentar quaisquer perdas cognitivas de memórias antigas, bem como nenhum prejuízo em suas capacidades perceptiva e motora. A neuropsicóloga canadense Brenda Milner (que conduzia suas pesquisas sob orientação de Donald Hebb) e os neurocirurgiões Wilder Penfield e William Scoville (que realizaram o procedimento experimental nesse paciente) dedicaram-se em estudar esse caso clínico. Eles concluíram que as estruturas removidas do lobo temporal do paciente H.M., como o complexo hipocampal e a amígdala, eram críticas para o armazenamento de uma nova memória, e que os aspectos temporais e funcionais das memórias são controlados por circuitos neuronais distintos, existindo diferentes tipos de memória.

Didaticamente, as memórias passaram a ser classificadas de acordo com o tempo durante as quais são mantidas, e quanto à sua função. As memórias de longo prazo são classificadas e divididas em duas categorias principais, de acordo com a sua função: memórias “declarativas” (explícitas) e memórias “não declarativas” (implícitas ou procedurais). As primeiras são aquelas responsáveis pela lembrança consciente sobre fatos e acontecimentos, e que dependem principalmente do hipocampo para a sua manutenção. Já as memórias não declarativas refletem a capacidade de armazenar e utilizar de maneira inconsciente uma habilidade que foi aprendida (como andar de bicicleta), e são processadas principalmente no estriado e no cerebelo (SQUIRE; DEDE, 2015). Por outro lado, enquanto uma memória de longo prazo é consolidada, uma memória de curto prazo pode ser formada em paralelo para permitir o acesso imediato dessas informações, caso necessário. Também, uma quantidade limitada de informações pode ser mantida apenas durante o tempo em que são requeridas para desempenhar uma tarefa, independente da formação de uma memória de longa duração. São as “memórias de trabalho”, atribuídas a regiões do córtex pré-frontal (SQUIRE; DEDE, 2015).

1.2.4 A influência das emoções sobre as memórias

Mas afinal, por que algumas memórias são facilmente esquecidas no decorrer do tempo enquanto outras (de momentos felizes e prazerosos, ou de momentos ruins e/ou de perigo) são lembradas ao longo de toda a vida? Diversos trabalhos demonstram que a emoção (interpretação e reação a um dado estímulo, que produz experiências subjetivos inerentes a cada ser) é capaz de afetar o processamento das memórias, permitindo que as experiências mais relevantes sejam armazenadas de maneira intensa e duradoura. Embora os circuitos e mecanismos neurais envolvidos no processamento dessas memórias ainda não estejam totalmente estabelecidos, atualmente já se sabe que são necessárias interações complexas, que envolvem alterações moleculares (bioquímicas e elétricas, através dos mecanismos citados anteriormente) em/entre várias estruturas cerebrais, como amígdala, tálamo, áreas corticais, hipocampo, estriado e cerebelo, refletindo a participação dinâmica do cérebro no processamento destas informações (EICHENBAUM, 2016; TYNG et al., 2017).

1.2.5 A consolidação das memórias aversivas

As memórias aversivas são formadas de maneira mais intensa sobretudo pela modulação de vias hormonais (adrenalina e glicocorticoides) e de neurotransmissores

(noradrenalina) desencadeadas pela exposição a eventos estressantes e/ou potencialmente danosos. A formação dessas memórias é extremamente importante do ponto de vista adaptativo, pois conferem ao indivíduo um repertório comportamental próprio, capaz de guiar o seu comportamento frente a situações futuras que representem ou não perigo iminente, evitando a exposição desnecessária a situações de risco no futuro (MCGAUGH, 2013).

Inicialmente, a percepção e processamento de estímulos sensoriais oriundos do ambiente externo são modulados pelos córtices frontal e parietal, bem como por núcleos talâmicos, e a detecção do caráter emocional dessas informações (apetitivo ou aversivo) é adquirida em grande parte como uma memória não declarativa. O córtex sensorial e o tálamo enviam projeções principalmente para a amígdala, o hipocampo, o córtex pré-frontal e o estriado (LEDOUX, 2014; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

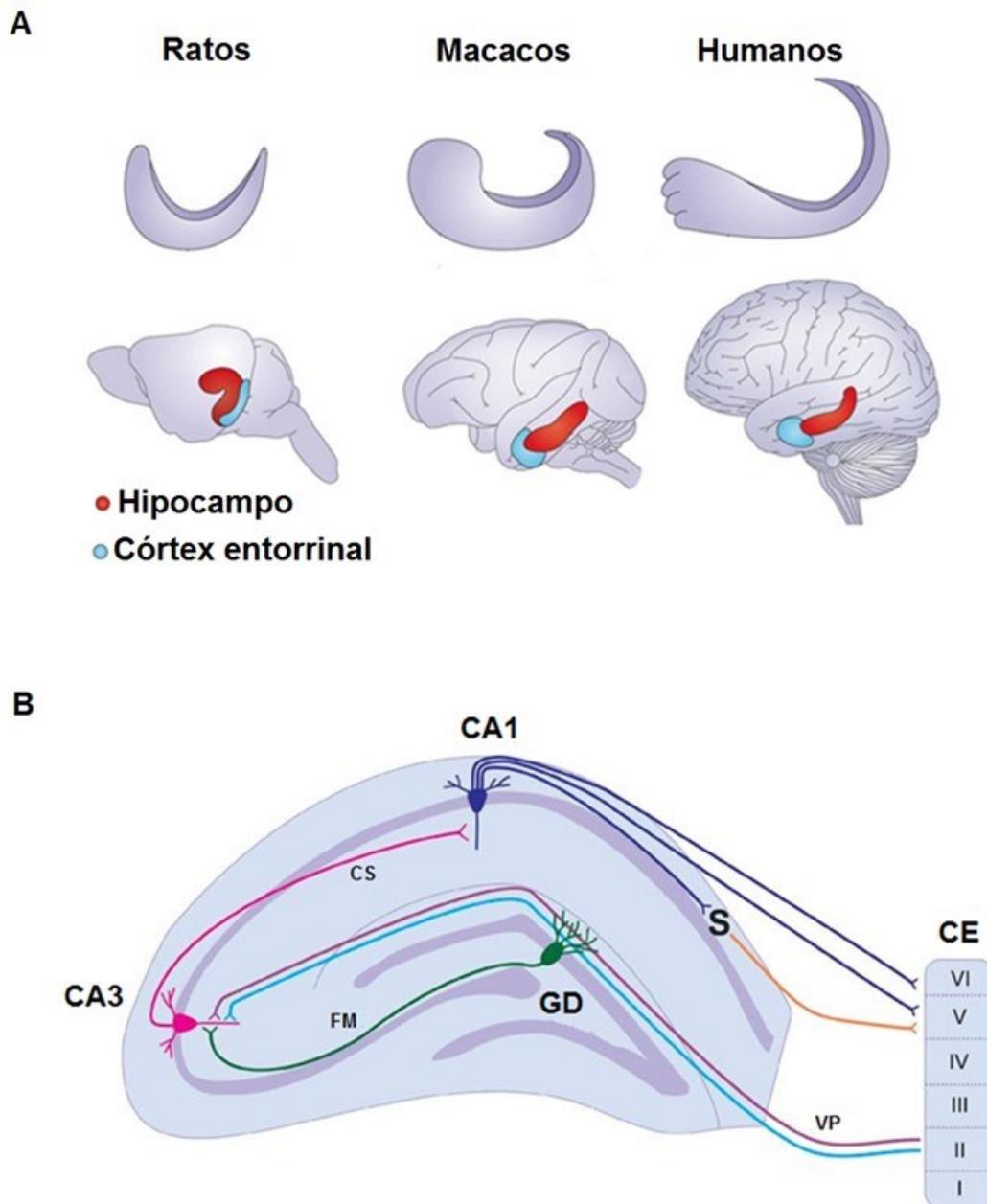
A amígdala é uma estrutura em forma de amêndoa, situada dentro da região anteroinferior do lobo temporal, e subdividida em três núcleos ou subáreas: lateral, basolateral e central (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Ela tem sido apontada como a principal região encefálica responsável pela transformação dos estímulos sensoriais em estímulos emocionais efetuados através do hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso autônomo. Estudos de neuroimagem em humanos demonstraram que ocorre um aumento na atividade nessa região tanto frente estímulos aversivos quanto apetitivos (HAMANN et al., 2002). O envolvimento da amígdala no processamento emocional, portanto, é extremamente importante para que memórias sejam consolidadas e lembradas de maneira mais duradoura. A função e as conectividades da amígdala são amplamente conservadas entre as espécies (EICHENBAUM, 2016).

Inicialmente, pensava-se que a formação de memórias aversivas associativas era dependente exclusivamente da atividade das populações celulares da amígdala e independentes do hipocampo, uma vez que as respostas de medo condicionado em humanos não eram afetadas por lesões nessa região (BECHARA et al., 1995). Entretanto, voltando à discussão acerca da natureza “não declarativa” das memórias aversivas, atualmente já está bem estabelecido que o hipocampo é importante na integração e contextualização de informações sensoriais multimodais no tempo e no espaço, e também é recrutado para a formação dessas memórias (MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013; ÇALIŞKAN; STORK, 2019). O hipocampo é uma estrutura em forma de C que está situada na parte caudal do cérebro, no lobo temporal, e subdividida em regiões distintas, como o giro denteado, as regiões CA3, CA2 e CA1, organizadas funcionalmente em um circuito trisináptico (Figura 5). O córtex entorrinal envia projeções (via perforante) às células granulares do giro denteado, cujas projeções axonais

(fibras musgosas) enviam informações às células piramidais da região CA3. Da região CA3, essas informações são então retransmitidas para a região CA1, através das projeções colaterais de Schaffer, e podem então ser enviada a outras regiões ou serem processadas na própria região CA1. Uma particularidade da região CA1 é a alta densidade de “células de local” (*place cells*, em inglês), capazes de codificar informações espaciais, e que são de extrema importância para o processamento de memórias aversivas associativas (FANSELOW, 2000).

Além disso, estudos em roedores demonstram que as porções dorsal e ventral do hipocampo apresentam conectividade e funções distintas (STRANGE et al., 2014). Enquanto a porção dorsal do hipocampo (homóloga ao hipocampo anterior em humanos) estaria relacionada principalmente ao processamento do componente espacial da memória, o componente emocional seria processado sobretudo pela porção ventral (homóloga ao hipocampo anterior em humanos), o que poderia ser explicado pela diferença de conectividade com as demais regiões cerebrais, já que a porção ventral do hipocampo tem maior conectividade com a amígdala e o hipotálamo (RISOLD; SWANSON, 1996). Entretanto, essa visão dicotômica dorsal-ventral não é totalmente verdadeira, uma vez que as diferenças de conectividade do hipocampo com estruturas corticais e subcorticais são graduais, sugerindo que as diferenças funcionais ao longo do eixo longo também podem exibir organização em forma de gradiente (STRANGE et al., 2014). Além disso, propriedades eletrofisiológicas e padrão de expressão gênica distintos já foram observados ao longo desse eixo (MAGGIO; SEGAL, 2007; THOMPSON et al., 2008; DOUGHERTY; ISLAM; JOHNSTON, 2012). Ainda, a ativação da amígdala repercute em alterações também no hipocampo dorsal (e não apenas no hipocampo ventral), incluindo um aumento da expressão de Arc (MCINTYRE et al., 2005; MCREYNOLDS et al., 2014) e potencialização da LTP (ABE, 2001), reforçando a importância do hipocampo dorsal na consolidação de memórias aversivas.

Figura 5 – Organização anatômica e funcional do hipocampo.



Legenda: Localização anatômica do hipocampo e do córtex entorrinal no cérebro de ratos, macacos e humanos (A), e representação esquemática do circuito trisináptico de fluxo de informação (B). CE= córtex entorrinal; CS= projeções colaterais de Schaffer; FM= fibras musgosas; GD= giro denteado; S= subículo; VP= via perforante. Fonte: adaptado de STRANGE et al., 2014 e PATTEN et al., 2015.

Por fim, além dessas áreas, o córtex pré-frontal medial (CPFm), localizado no lobo frontal do cérebro dos mamíferos, também modula o processamento de memórias aversivas (SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, 2010; HOLLOWAY; MCINTYRE, 2011; CHOI; GOURLEY; RESSLER, 2012; ROSESKE et al., 2015), uma vez que conecta-se de maneira bidirecional direta ou indireta com diversas regiões cerebrais envolvidas na formação de

memórias aversivas, como a amígdala e o hipocampo (GABBOTT et al., 2005; COURTIN et al., 2013). O núcleo *reuniens* do tálamo e a matéria cinzenta periaquedutal também fazem parte de um circuito recrutado para o processamento de memórias com caráter aversivo e expressão comportamental de respostas de medo (ROZESKE et al., 2015).

1.2.6 A generalização do medo

O fenômeno de generalização de uma memória condicionada foi descrito pela primeira vez na literatura por Ivan Pavlov, em 1927. Pavlov observou que a resposta de salivação de cães que haviam sido previamente treinados a associar um determinado som ao recebimento de alimento, também se manifestava frente a outros estímulos sonoros (de frequências distintas e que nunca haviam sido condicionados ao recebimento de alimento). Desde então e ao longo das últimas décadas, diversos estudos buscam elucidar e caracterizar a generalização de memórias condicionadas, especialmente aquelas de caráter emocional aversivo.

Sabe-se que presença direta de uma ameaça ou a sua antecipação levam à manifestação comportamental de respostas adaptativas de medo e ansiedade, respectivamente (PAPE; PARÉ, 2010). Essas respostas possuem uma função biológica e evolutiva evidente, pois guiam comportamentos de esquiva ou enfrentamento essenciais para a sobrevivência do indivíduo. Após a formação de uma memória aversiva, a expressão generalizada de comportamentos de medo ocorre quando as respostas de medo relacionadas a um estímulo em particular não se restringem a ele, sendo também expressas frente a outros estímulos semelhantes, mas não necessariamente relacionados à memória original.

A expressão generalizada de comportamentos de medo é fundamental em um ambiente em constante mudança, uma vez que o aprendizado de que um estímulo prediz um evento em particular permite que um indivíduo manifeste essa mesma resposta frente a estímulos semelhantes (DUNSMOOR; PAZ, 2015; JASNOW et al., 2017). No entanto, quando a generalização do medo ocorre mesmo frente a estímulos que poderiam ser facilmente distinguidos do original, estímulos não ameaçadores são interpretados como nocivos, levando à re-experiência do medo frente a situações seguras, a um estado de hipervigilância constante e à manifestação de respostas fisiológicas exageradas (JASNOW et al., 2017).

Embora inicialmente tenha sido proposto que a generalização do medo estava relacionada exclusivamente com a similaridade de um estímulo sensorial com o estímulo previamente condicionado (GUTTMAN; KALISH, 1956), estudos recentes vêm demonstrando que os processos de codificação e discriminação de informações sensoriais são muito mais

complexos, já que a valência emocional que um indivíduo atribui a um evento aversivo vai além de seus detalhes físicos ou sensoriais, sendo dependente e influenciada por experiências prévias. Dessa forma, mesmo que os mecanismos relacionados à seletividade da generalização do medo ainda não tenham sido totalmente estabelecidos, esta caracteriza-se por um processo ativo baseado em ambiguidade e incerteza, e não apenas uma falha de discriminação entre estímulos sensoriais (ONAT; BÜCHEL, 2015; STRUYF et al., 2017; TUOMINEN et al., 2019).

Assim como observado em outros processos relacionados à formação e ao armazenamento de memórias, a generalização do medo parece ser influenciada por vários fatores intrínsecos (incluindo estados internos, gênero, modificações genéticas ou epigenéticas e alterações hormonais), bem como por fatores externos (como o tipo e intensidade da estimulação aversiva). Ainda, a generalização do medo também é sensível à passagem do tempo, visto que gradativamente as memórias podem perder tanto a precisão quanto a força (POLLACK et al., 2018). Considerando o grande número de variáveis que podem interferir com a generalização do medo, ainda não está bem estabelecido qual a circuitaria neuronal envolvida no processamento de memórias aversivas que culminam na expressão generalizada de comportamentos de medo, porém, o equilíbrio da sinalização entre transmissores excitatórios e inibitórios, neuromoduladores e vias de sinalização intracelular no córtex pré-frontal medial, no hipocampo, na amígdala e em núcleos do tálamo parece ser determinante para a regulação da expressão de respostas defensivas e discriminação de estímulos aversivos (XU; SÜDHOF, 2013; DUNSMOOR; PAZ, 2015; GROSSO et al., 2018).

Além da neurobiologia e neuroquímica relacionadas à generalização do medo, ainda se faz necessário investigar e compreender que fatores delimitam a fronteira entre a generalização do medo considerada adaptativa (que tem como objetivo a autopreservação), daquela que acarreta na manifestação de respostas defensivas exacerbadas e que impactam de maneira negativa e significativa a qualidade de vida de um indivíduo. Neste ponto, vale ressaltar a importância não apenas das similaridades ou diferenças entre estímulos, mas também do contexto em que uma resposta defensiva se manifesta, visto que um mesmo comportamento que se caracteriza como adaptativo e relevante em um ambiente pode ser desnecessário e inútil em outro (FANSELOW, 1994; BLANCHARD; BLANCHARD, 2008).

Segundo o modelo de reforço da consolidação proposto por Pitman (1989), a magnitude e a orientação das respostas comportamentais de medo estão diretamente relacionadas com a intensidade na qual a memória do evento traumático foi armazenada. Ou seja, em indivíduos pré-dispostos, a liberação de hormônios e neuromoduladores relacionados ao estresse ocorreria de maneira mais acentuada durante e/ou imediatamente após um evento

traumático de grande severidade, sendo essa “superestimulação” responsável por potencializar também as cascatas de sinalização intracelular recrutadas para a consolidação da memória aversiva. Adicionalmente, têm-se considerado que possivelmente os mecanismos neurobiológicos envolvidos com a consolidação de memórias aversivas que posteriormente levarão à manifestação inadequada de respostas defensivas (tal como o aumento da expressão generalizada de medo) não sejam análogos ao de uma memória de medo considerada “normal” ou adaptativa. Diversos estudos em roedores corroboram o modelo proposto por Pitman, e demonstram que a potencialização da consolidação de uma memória aversiva resulta no aumento da expressão generalizada de medo frente a pistas neutras (BALDI; LORENZINI; BUCHERELLI, 2004; GAZARINI et al., 2013; 2014; GHOSH; CHATTARJI, 2015).

1.2.7 Os transtornos psiquiátricos relacionados às memórias aversivas

Em alguns casos as respostas de medo e ansiedade são exacerbadas e inapropriadas, já que prejudicam a qualidade de vida e manifestam-se mesmo frente exposição a estímulos e pistas não ameaçadores. Nesses casos, são consideradas como mal adaptativas ou disfuncionais e são a base para o desenvolvimento de alguns transtornos psiquiátricos (GILMARTIN; BALDERSTON; HELMSTETTER; 2014).

Dentre esses transtornos, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), é classificado atualmente pelo Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) como um transtorno relacionado ao trauma, já que possui uma etiologia bem definida: a exposição a um acontecimento traumático de grande severidade (YEHUDA et al., 2015). Os principais sintomas desse transtorno são a re-experiência espontânea e persistente desse evento, a esquiva de pessoas e lugares que remetam ao trauma, além do aumento da expressão generalizada de respostas de medo. Também, há uma alta co-morbidade entre TEPT e com transtornos de humor e ansiedade e, com base nisso, atualmente os agentes farmacológicos com indicação clínica para o tratamento desse transtorno são os inibidores seletivos de recaptação de serotonina sertralina e paroxetina. Outros fármacos comumente indicados incluem os inibidores da enzima monoamina oxidase, benzodiazepínicos e antagonistas adrenérgicos (YEHUDA et al., 2015)

Embora atenuem a reatividade do sistema nervoso simpático normalmente observada em indivíduos com TEPT, a eficácia clínica desses fármacos é limitada (CHARNEY et al., 2018; TORRISI et al., 2019). A indicação de um tratamento farmacológico baseado especificamente na fisiopatologia do transtorno, por outro lado, tem se mostrado um grande

desafio, uma vez que ainda não está claro quais são os mecanismos moleculares e os fatores ambientais determinantes envolvidos no desenvolvimento do TEPT (MALIKOWSKA-RACIA; SALAT, 2019). Além disso, embora a probabilidade de desenvolvimento de TEPT varie de acordo com o tipo de trauma e de acordo com o gênero, aproximadamente 20 a 30% dos indivíduos expostos a eventos traumáticos de grande severidade desenvolvem esse transtorno (DESMEDT; MARIGHETTO; PIAZZA, 2015). Portanto, para que terapias mais efetivas sejam desenvolvidas é fundamental investigar as diferenças interindividuais e elucidar os principais mecanismos moleculares e as regiões encefálicas envolvidas no processamento de estímulos aversivos e formação das memórias aversivas no TEPT.

Nesse sentido, apesar das limitações de que nenhum modelo animal seja capaz de mimetizar com excelência todas as características de uma condição humana, muitos aspectos neurobiológicos e comportamentais são evolutivamente conservados entre espécies, o que permite utilizar a experimentação animal para entender o processamento dessas memórias, bem como para a avaliação de estratégias terapêuticas capazes de modulá-las (WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014).

1.2.8 As ferramentas experimentais para estudo de memórias aversivas e generalização do medo

A pesquisa utilizando modelos animais permite avaliar a formação e manutenção de memórias aversivas e da generalização de comportamentos de medo em diferentes esferas de complexidade: desde as estruturas encefálicas e circuitaria neuronal recrutadas, até as alterações morfológicas, celulares e moleculares necessárias para esses processos, tais como formação de espinhas dendríticas e novas sinapses, vias de sinalização e funcionalidade sináptica, e modificações genéticas e epigenéticas (JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015).

Protocolos experimentais de aprendizagem associativa através do condicionamento vêm sendo amplamente utilizados desde o início dos anos 1900. A avaliação da resposta comportamental de ratos após a apresentação de choques elétricos nas patas, por sua vez, passou a ser amplamente utilizada como uma ferramenta de estudo das memórias aversivas. O condicionamento para memórias aversivas caracteriza-se pela associação entre um estímulo neutro, como um som ou um contexto espacial, com um estímulo aversivo incondicionado, sendo o choque nas patas o estímulo aversivo mais utilizado. Após essa associação, o estímulo neutro se torna um estímulo condicionado, uma vez que passa a suscitar respostas defensivas

comportamentais (como comportamentos de congelamento ou de fuga), autonômicas (como alterações na pressão arterial e respiração) e endócrinas (como liberação de hormônios relacionados ao estresse) mesmo na ausência do estímulo incondicionado (LEDOUX, 2014).

A possibilidade de controlar e ajustar as variáveis experimentais (como intensidade, duração e número de estímulos aversivos incondicionados) de acordo com a hipótese de trabalho torna os protocolos de aprendizagem associativa ferramentas versáteis para o estudo das memórias aversivas, bem como da generalização das respostas de medo (GAZARINI et al., 2014). Já foi demonstrado, por exemplo, que a intensidade e o número dos choques elétricos aplicados estão correlacionados positivamente com a magnitude da resposta de congelamento observada nos animais. Com isso, protocolos de condicionamento considerados fracos ou intermediários são comumente empregados com o objetivo de induzir um nível de congelamento baixo, e que permita observar a potencialização da expressão de respostas de medo após uma determinada manipulação, assim como protocolos de intensidade forte são úteis para avaliar o potencial de uma intervenção atenuar a expressão dessas respostas (BALDI; LORENZINI; BUCHERELLI, 2004).

A manipulação das diferentes fases de formação e manutenção das memórias aversivas também pode ser explorada através de protocolos de aprendizagem associativa. Nesses protocolos, a sessão de condicionamento (pareamento entre os estímulos condicionado e incondicionado) representa a aquisição da memória aversiva, que é gradualmente estabilizada e consolidada ao longo dos próximos minutos a horas. Posteriormente, a memória consolidada pode ser evocada, desestabilizada, labilizada, reconsolidada ou extinta. Assim, o momento em que uma intervenção é realizada determina qual fase do processamento da memória aversiva será afetado. Além disso, protocolos de aprendizagem associativa também permitem avaliar o fenômeno de generalização do medo (manifestação da resposta condicionada, como congelamento, frente exposição a um estímulo não pareado), bem como a influência da manipulação das diferentes fases de formação e manutenção da memória aversiva sobre a posterior expressão generalizada de respostas de medo (McGAUGH, 2000).

Por fim, algumas vezes a capacidade das espécies animais utilizadas na pesquisa básica experimentarem o sentimento é questionada, já que esse termo descreve uma sensação humana vivenciada frente a uma ameaça e que é, de certa forma, muito subjetiva (GROSS; CANTERAS, 2012). Apesar disso, pesquisas utilizando protocolos de condicionamento aversivo são protocolos robustos, pouco dispendiosos e de fácil manipulação (RUDY; HUFF; MATUS-AMAT, 2004), e têm permitido a investigação das regiões cerebrais e vias de neurotransmissão e neuromodulação que controlam as diferentes fases de formação e

manutenção de memórias aversivas e a manifestação de respostas comportamentais correlatas. Nesse cenário, a via de neuromodulação que vem ganhando destaque nas últimas décadas é o sistema adenosinérgico.

1.3 A INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO ADENOSINÉRGICA EM PROCESSOS DE APRENDIZADO E MEMÓRIA

Os primeiros trabalhos avaliando o impacto da modulação dos receptores adenosinérgicos na formação de memórias foram publicados na década de 1990, em paralelo com as descobertas sobre a modulação da LTP (Tabela 1). Em 1999, Kopf e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que o bloqueio farmacológico do A_{2A}R com a cafeína ou com o antagonista seletivo SCH 58261 imediatamente após o treino em um protocolo de esQUIVA inibitória aumentava a latência para descer da plataforma quando os animais eram avaliados 24 horas após o treino (KOPF et al., 1999). Nesse teste, os animais são colocados em uma plataforma e imediatamente após descerem da plataforma para o piso gradeado do aparato eles recebem um choque nas patas. Assim, um dia depois, quando reexpostos ao mesmo aparato, quanto melhor for a retenção da memória do evento aversivo, maior será a latência para o animal descer da plataforma. Dessa maneira, o aumento da latência para descer da plataforma observado em consequência do tratamento com cafeína e SCH 58261 observado por Kopf e colaboradores sugeria que o bloqueio do A_{2A}R favorece a formação da memória nesta tarefa.

Em 2005, trabalhos desenvolvidos no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina avaliaram o papel do A_{2A}R em outro tipo de memória, a memória de reconhecimento social de curto prazo (PREDIGER; FERNANDES; TAKAHASHI, 2005; PREDIGER; TAKAHASHI, 2005), onde é avaliada a capacidade de um animal adulto reconhecer um animal jovem que havia sido previamente exposto a ele. Quanto melhor o animal adulto se lembrar do animal jovem, menos tempo ele passará explorando o animal jovem na segunda exposição. Nesses trabalhos, foi demonstrado que a bloqueio farmacológico do receptor A_{2A}R é capaz de facilitar a memória social de ratos adultos (PREDIGER; TAKAHASHI, 2005), bem como de reverter os prejuízos de memória social observados no envelhecimento (PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005) e em modelos animais de Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (PREDIGER; FERNANDES; TAKAHASHI, 2005) e da doença de Parkinson (PREDIGER; DA CUNHA; TAKAHASHI, 2005). Além desses trabalhos, outros grupos de pesquisa (utilizando testes comportamentais para avaliar diferentes tipos de memória, como memória espacial e memória de trabalho)

também demonstraram que, em animais geneticamente modificados quanto à expressão do A_{2A}R, a deleção do A_{2A}R promove uma melhora da memória, enquanto a superexpressão desse receptor relaciona-se com um prejuízo mnemônico (VAN DEN BUUSE, 2006; GIMÉNEZ-LLORT et al., 2007; WANG; MA; ZHOU et al., 2009; LI et al., 2015).

Tabela 1 – Estudos que demonstram a influência da modulação do A_{2A}R em testes para avaliação de diferentes tipos de memórias.

Ferramenta para modulação do A_{2A}R	Teste comportamental	Efeito sobre a memória	Alterações moleculares	Referências
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Esquiva inibitória	Facilitatório	n.a.	KOPF et al., 1999
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Esquiva inibitória	Facilitatório	n.a.	ANGELUCCI et al., 1999
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Condicionamento aversivo ao som	Prejuízo	n.a.	CORODIMAS; PRUITT; STIEG, 2000
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Reconhecimento social	Facilitatório	n.a.	PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005; PREDIGER; DA CUNHA; TAKAHASHI, 2005; PREDIGER; FERNANDES; TAKAHASHI, 2005; PREDIGER; TAKAHASHI, 2005
Administração de agonista farmacológico (córtex cingulado)	Esquiva inibitória	Prejuízo	n.a.	PEREIRA et al., 2005
Animais transgênicos nocaute para o A _{2A} R	Labirinto em Y	Facilitatório	n.a.	WANG; MA; VAN DEN BUUSE, 2006
Animais transgênicos com superexpressão do A _{2A} R	Labirinto radial de 6 braços para memória de trabalho Reconhecimento de objetos	Prejuízo	Aumento da expressão do receptor A _{2A} nos córtices frontoparietal e pré-frontal	GIMÉNEZ-LLORT et al., 2007

	Labirinto aquático de Morris		Diminuição dos níveis do receptor dopaminérgico D ₂ no estriado Diminuição dos níveis do receptor glutamatérgico mGlu5 no estriado	
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Labirinto em Y	Facilitatório	n.a.	CUNHA et al., 2008
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Labirinto em Y Reconhecimento de objetos	Facilitatório	Redução da toxicidade induzida por peptídeos beta amiloides	CANAS et al., 2009
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Reconhecimento de objetos	Facilitatório	n.a.	PIRES et al., 2009
Animais transgênicos nocaute para o A _{2A} R	Labirinto radial de 8 braços Labirinto aquático de Morris	Facilitatório	n.a.	ZHOU et al., 2009
Administração de antagonista farmacológico (v.o.)	Labirinto em Y	Facilitatório	Redução da excitotoxicidade glutamatérgica em sinapses	COGNATO et al., 2010
Administração de antagonista farmacológico (v.o.)	Reconhecimento de objetos	Facilitatório	Redução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em animais envelhecidos Aumento da atividade do trocador iônio de sódio e potássio em animais envelhecidos	LEITE et al., 2011
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Reconhecimento de objetos	Facilitatório	Recuperação dos níveis de dopamina no	HORITA et al., 2013.

			córtex pré-frontal após lesão com 6-hidróxidopamina (6-OHDA)	
Animais transgênicos nocaute para o A _{2A} R no estriado	Condicionamento aversivo ao som	Facilitatório	n.o.	WEI et al., 2014
Animais transgênicos nocaute para o A _{2A} R em todo o cérebro	Condicionamento aversivo ao som	Prejuízo	Diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo	WEI et al., 2014
Animais com nocaute condicional para o A _{2A} R no hipocampo	Condicionamento aversivo ao som	Prejuízo	Diminuição da expressão do receptor A _{2A} no hipocampo dos animais nocaute	WEI et al., 2014
Animais com expressão condicionada de receptor opto-A _{2A} no hipocampo	Labirinto em Y	Prejuízo	Facilitação da LTP no hipocampo Aumento dos níveis de pCREB no hipocampo	LI et al., 2015
Administração de antagonista farmacológico (v.o.) Animais transgênicos nocaute para o A _{2A} R	Labirinto em Y Paradigma de deslocamento de objetos	Facilitatório	Aumento da densidade hipocampal de syntaxina, SNAP-25 e vGLUT Facilitação da LTP no hipocampo	KASTER et al., 2015
Animais com nocaute condicional para o A _{2A} R em astrócitos	Labirinto em Y Labirinto radial de 8 braços	Prejuízo	Aumento da liberação pré-sináptica de glutamato Aumento da expressão da subunidade 2B do receptor NMDA Aumento da internalização do receptor AMPA	MATOS et al., 2015

Animais com nocaute condicional para o A _{2A} R em astrócitos	Labirinto aquático de Morris	Facilitatório	n.a.	ORR et al., 2015
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Labirinto em Y	Facilitatório	n.a.	PAGNUSSAT et al., 2015
Administração de agonista farmacológico (i.p.)	Esquiva inibitória Reconhecimento de objetos	Prejuízo		
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Reconhecimento de objetos Labirinto em T Esquiva inibitória	Facilitatório	Normaliza a atividade da proteína quinase A no hipocampo Facilitação da LTP no hipocampo	TYEJBI, S. et al., 2015
Administração de antagonista farmacológico (i.p.) Animais transgênicos nocaute para o A _{2A} R	Labirinto aquático de Morris Labirinto em Y	Facilitatório	Redução da fosforilação da proteína tau	LAURENT et al., 2016
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Paradigma de deslocamento de objetos Labirinto em Y	Facilitatório	Facilitação da LTP no hipocampo	SILVA et al., 2016
Animais com nocaute condicional para o A _{2A} R na amígdala Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Condicionamento aversivo ao som	Prejuízo	Aumento da expressão do receptor A _{2A} na amígdala, hipocampo e estriado ventral dos animais selvagens submetidos ao protocolo de condicionamento em comparação com animais controle Diminuição da expressão do receptor A _{2A} na amígdala dos animais nocaute	SIMÕES et al., 2016

			Prejuízo de LTP na amígdala	
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Reconhecimento de objetos	Facilitatório	n.a.	MOURO et al., 2017; MOURO, et al., 2019.
Administração de antagonista farmacológico (i.c.v.)	Labirinto aquático de Morris	Facilitatório	Redução da desmielinização Redução da ativação astrocitária e microglial	AKBARI, A. et al., 2018
Animais transgênicos nocaute para o A _{2A} R	Labirinto em Y Labirinto radial de 8 braços Esquiva inibitória Esquiva ativa	Prejuízo	Diminuição da neurogênese Diminuição dos níveis de calcineurina no córtex pré-frontal Diminuição dos níveis de SNAP25 no córtex pré-frontal	MOSCOSO-CASTRO et al., 2018.
Animais transgênicos com superexpressão do A _{2A} R	Labirinto em Y Labirinto aquático de Morris	Prejuízo	Prejuízo da LTD no hipocampo	TEMIDO-FERREIRA et al., 2018
Animais com expressão condicionada de receptor opto-A _{2A} no estriado Animais com expressão condicionada de receptor opto-A _{2A} no córtex pré-frontal	Labirinto aquático de Morris	Prejuízo Facilitatório	n.a	LI et al., 2018
Administração de antagonista farmacológico (i.p.)	Labirinto em Y Paradigma de deslocamento de objetos	Facilitatório	Redução da expressão de A _{2A} R no hipocampo Aumento dos níveis de syntaxina e	SILVA et al., 2018

			vGLUT no hipocampo	
			facilitação da LTP no hipocampo	

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo; i.c.v.: intracerebroventricular; LTD: depressão de longa duração; LTP: potencialização de longa duração; n.a.: não avaliado; n.o.: não observado; v.o.: via oral.

1.3.1 O receptor A_{2A} e as memórias aversivas

O papel do $A_{2A}R$ na modulação de memórias de carácter emocional aversivo, por outro lado, permaneceu pouco explorado ao longo das últimas duas décadas (Tabela 1). Os poucos trabalhos existentes, com exceção do trabalho publicado por Kopf e colaboradores em 1999, utilizaram como ferramenta farmacológica apenas a cafeína, que atua como um antagonista não-seletivo desse receptor e, portanto, não permitem relacionar o efeito observado especificamente com o $A_{2A}R$. Além dessa falta de seletividade da ferramenta farmacológica utilizada, os resultados obtidos nesses trabalhos são inconclusivos, uma vez que enquanto alguns demonstraram que a cafeína prejudica a formação de memórias aversivas em roedores, outros relataram o aumento de comportamentos tipo-ansiosos e o favorecimento da formação de memórias aversivas (ANGELUCCI et al., 1999). Outras limitações desses estudos são as grandes diferenças entre os protocolos de condicionamento utilizados e o período da administração do tratamento farmacológico, dificultando a comparação entre os resultados obtidos e impedindo a conclusão sobre o papel do $A_{2A}R$ em fases específicas da formação das memórias, como aquisição, consolidação e reconsolidação. Por exemplo, Angelucci e colaboradores demonstraram, em 1999, que enquanto a administração de diferentes doses de cafeína 30 minutos antes da sessão de treino em um protocolo de esquiva inibitória diminui o escore de retenção da memória aversiva quando os animais são retestados um dia depois, a administração 30 minutos após o treino aumenta o escore da retenção, sugerindo, então, que a cafeína influencia de maneira oposta a aquisição e a consolidação das memórias aversivas (ANGELUCCI et al., 1999).

Mais recentemente, começaram a surgir os primeiros trabalhos investigando especificamente o papel do $A_{2A}R$ na formação de memórias aversivas. Wei e colaboradores (2014) investigaram, através do uso de ferramentas genéticas, a contribuição do $A_{2A}R$ expresso no estriado ou em regiões extraestriatais na formação de uma memória aversiva condicionada

ao som. Nesse trabalho, foi demonstrado que enquanto animais geneticamente modificados para uma menor expressão do A_{2A}R apenas no estriado apresentaram um aumento do tempo de congelamento nas sessões de teste, animais geneticamente modificados para uma menor expressão do A_{2A}R em todo o encéfalo apresentaram uma diminuição do tempo de congelamento. Esses resultados sugerem que a ativação seletiva do A_{2A}R no estriado prejudica a formação da memória aversiva condicionada ao som, enquanto que a ativação do A_{2A}R em regiões encefálicas extraestriatais contribui para a formação dessa memória (WEI et al., 2014).

Corroborando os achados de Wei e colaboradores, o último trabalho nessa mesma linha de investigação foi publicado em 2016 por Simões e colaboradores (SIMÕES et al., 2016), que investigaram o papel do A_{2A}R da amígdala na formação de uma memória aversiva condicionada ao som, uma vez que essa estrutura encefálica é de grande importância para a formação dessas memórias. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a supressão da expressão do A_{2A}R através da utilização de vetores lentivirais, assim como a administração de cafeína ou do antagonista seletivo do A_{2A}R SCH 58261, promovem uma diminuição do tempo de congelamento, ou seja, acarretaram em um prejuízo da formação da memória aversiva. Entretanto, nesse trabalho o tratamento farmacológico realizado por 10 dias consecutivos antes do início do protocolo ou a utilização de animais nocaute não possibilitam clarificar o papel do A_{2A}R especificamente na janela de consolidação da memória aversiva. Além disso, a intensidade do protocolo de choques utilizada induziu à expressão de níveis relativamente baixos da resposta de congelamento (cerca de 30%), e alguns trabalhos vêm sugerindo que os mecanismos envolvidos na formação de memórias relacionadas a eventos com menor ou maior grau de aversividade não são idênticos (DESMEDT et al., 2015). O papel do A_{2A}R na consolidação de uma memória aversiva de maior intensidade e na expressão generalizada de medo permanecem, portanto, como um alvo de estudo interessante e, portanto, foram investigados neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação do $A_{2A}R$ nos processos de consolidação e generalização de uma memória de medo condicionado ao contexto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da manipulação farmacológica sistêmica do $A_{2A}R$ durante a consolidação da memória aversiva em protocolos de diferentes intensidades sobre a posterior manifestação e generalização de respostas de medo condicionado;
- Avaliar a ocorrência de sensibilização das respostas defensivas após a manipulação farmacológica sistêmica do $A_{2A}R$ durante a consolidação da memória aversiva em protocolos de diferentes intensidades;
- Investigar o efeito da modulação farmacológica sistêmica do $A_{2A}R$ durante a consolidação da memória aversiva e/ou da modulação da intensidade do protocolo de condicionamento sobre parâmetros neuroquímicos e eletrofisiológicos relacionadas à formação de memórias;
- Investigar o efeito da infusão intrahipocampal de um antagonista seletivo do $A_{2A}R$ durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e a expressão generalizada da resposta de medo nos contextos pareado e novo, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para os experimentos realizados nas instalações da Universidade Federal de Santa Catarina foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central desta Instituição. O trabalho foi realizado mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº 5218190418). Foram respeitadas as normas internacionais do cuidado e bem estar animal e todos os procedimentos foram realizados visando minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados. Foram utilizados animais entre 12 a 16 semanas de idade e pesando entre 270 e 350 g. Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas de polipropileno (36 x 30 x 15 cm) forradas com serragem, em um número máximo de 5 animais por gaiola. Durante todo o tempo de permanência no biotério de manutenção em nosso laboratório, os animais foram mantidos em ciclo de luz claro/escuro de 12 h (início da fase clara às 7 h), temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com acesso livre à água e comida, e limpeza e troca das gaiolas 3 vezes por semana. Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro.

Os experimentos realizados na Universidade de Coimbra (Portugal) durante o período de Doutorado Sanduíche (Experimentos 10, 11 e 12) foram aprovados pelo Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal (ORBEA). Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Instituto Charles River, pesando entre 300-350 g, com idade entre 12 a 16 semanas no momento dos testes. Os animais foram alojados em duplas em gaiolas (50 x 30 x 15 cm) forradas com areia sanitária mantidas em estantes ventiladas sob condições constantes de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h), livre acesso à água e comida, e limpeza e troca das gaiolas 3 vezes por semana. Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro.

3.2 DROGAS

2-(2-Furanil)-7-(2-feniletil)-7H-pirazol[4,3-e]-[1,2,4]-triazol-[1,5-c]=pirimidina-5-amina (SCH 58261; antagonista seletivo do $A_{2A}R$; Tocris, EUA) e 3-[4-[2-[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etilcarbonil)-3,4-dihidroxi-oxolan-2-il]purina-2-il]amino]etil]fenil]propanoico (CGS 21680; agonista seletivo do $A_{2A}R$; Tocris, EUA) foram dissolvidos em solução salina contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e administrados sistemicamente por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 0,05, 0,1 ou 0,2 mg/kg (no volume de 1,0 ml/kg)

imediatamente após a sessão de condicionamento. Para infusão intrahipocampal, SCH 58261 foi preparado a partir de uma solução estoque de 0,1 µg/µl e administrado através de cânulas-guia direcionadas ao hipocampo dorsal no volume de 0,5 µl (concentração final da droga infundida de 6, 12 ou 24 ng) imediatamente após a sessão de condicionamento. As doses e concentrações utilizadas nesse trabalho foram escolhidas com base em estudos prévios (POPOLI et al., 2002; CUNHA et al., 2006; XIAO et al., 2006; MIHARA et al., 2007; IMPELLIZZERI et al., 2011; PATERNITI et al., 2011; GOLEMBIOWSKA et al., 2013; PAGNUSSAT et al., 2015; SIMÕES et al., 2016).

3.3 PROCEDIMENTOS PARA INJEÇÃO INTRAHIPOCAMPAL DE DROGAS

3.3.1 Cirurgia estereotáxica e implantação de cânulas-guia

Para obtenção de um estado de anestesia e perda total dos reflexos, os animais receberam a injeção i.p. de uma solução de cetamina (100 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil). Ainda, a injeção subcutânea (s.c.) de uma solução de lidocaína 3% com adrenalina 1:50.000 (Dentsply Pharmaceutical, Brasil) no local da incisão foi aplicada visando promover anestesia local e minimizar o sangramento. Após a tricotomia e assepsia com uma solução de álcool iodado (2%) da região craniana, os animais foram devidamente fixados em aparelho estereotáxico para ratos (Stoelting, EUA) e, visando exposição do crânio, uma pequena porção da pele do animal foi retirada, permitindo a raspagem do periósteo até a observação das suturas lambdóide e coronal, utilizadas como ponto de referência para localização das coordenadas estereotáxicas. Com auxílio de broca odontológica de baixa rotação, o crânio dos animais foi perfurado para a inserção de dois parafusos de aço inoxidável, bem como a inserção bilateral de cânulas-guia (confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de 22 G e 25,0 x 7,0 mm, ajustadas para um comprimento de 11,0 mm). As cânulas-guia foram posicionadas 1,3 mm acima do hipocampo dorsal. As coordenadas para inserção das cânulas-guia no nesta região foram retiradas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2009): 3,6 mm posterior ao Bregma, ± 2,5 mm relativo ao eixo lateral e -2,0 mm relativo ao eixo dorso-ventral). Para melhor fixação das cânulas-guia e proteção da área exposta do crânio do animal, foi utilizado acrílico odontológico auto-polimerizável para a confecção de uma prótese sólida. Ainda, um fio de aço inoxidável (nº 24) foi inserido em cada uma das cânulas-guia, para minimizar o risco de obstrução e contaminação. Ao fim do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma injeção s.c. de banamina (2,5 mg/kg; Schering-Plough,

Brasil), um agente analgésico, antipirético e anti-inflamatório. Após retirados do aparelho estereotáxico, os animais foram mantidos em ambiente aquecido a fim de minimizar a hipotermia promovida pela anestesia. Um período de 10 dias foi reservado para a recuperação dos animais, sem a realização de nenhum procedimento experimental. Seguindo o preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para prevenção da dor e do distresse potencial, observamos os sinais gerais físicos e comportamentais dos animais durante o período de recuperação do procedimento cirúrgico. Como indicativos de dor ou angústia nos animais foram observadas: mudanças na aparência física (como ferimentos, postura curvada, textura do pelo, piloereção, pelo sujo de urina ou fezes e inchaço), mudanças no peso corporal, no consumo de alimento e água e outras (como diarreia), mudanças no comportamento normal (como vocalizações, inatividade ou diminuição da movimentação espontânea, isolamento social, automutilação, comportamento compulsivo e movimentos repetitivos ou estereotipados), e mudanças nas respostas a estímulos (como agressividade e vocalização após o manuseio). Em caso de observação de alguma (s) dessas mudanças físicas e comportamentais, a médica veterinária do Departamento de Farmacologia foi imediatamente contatada e, caso o fornecimento de tratamentos de apoio (como calor, reposição hídrica ou nutricional) e tratamento específico (por exemplo, utilização de um agente analgésico) ao animal não tenha propiciado uma melhora evidente dentro de 12 horas, o mesmo foi submetido a ortotanásia através da utilização de sobredose de agentes anestésicos (como cetamina e xilazina).

3.3.2 Injeção intrahipocampal

Para a injeção bilateral de SCH 58261 diretamente no hipocampo dorsal, agulhas medindo 12,3 mm foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais de 30 G. As agulhas foram, então, conectadas a um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, EUA) acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) de 5 µl conectada a uma bomba de infusão (Insight, Brasil). O tubo de polietileno foi preenchido com água destilada, e uma bolha de ar foi deixada interposta à solução a ser injetada para facilitar a visualização do deslocamento da solução durante a injeção da droga. No momento da infusão, o animal foi imobilizado, o fio de aço retirado com auxílio de um alicate e a cânula desobstruída com uma lima odontológica (Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil) de 11,0 mm. A agulha foi introduzida na cânula-guia e cada animal recebeu 0,5 µl/hemisfério da solução de SCH 58261. A droga foi injetada a um fluxo constante de 0,5

μl/minuto, um hemisfério por vez. Após a injeção, a agulha foi mantida na cânula-guia por 30 segundos adicionais, para reduzir o fluxo retrógrado da solução.

3.3.3 Análise histológica

Para a verificação do sítio de injeção da droga, ao término dos experimentos, os animais foram submetidos a ortotanásia através da injeção i.p. de uma sobredose da solução anestésica de cetamina e xilazina. Através das cânulas-guia, foi realizada a injeção bilateral do corante de azul de Evans (0,2 μl/hemisfério). Após decapitação, os encéfalos foram retirados e conservados e fixados por no mínimo 48 horas em solução de formalina 10%. Os encéfalos foram, então, submersos durante 72 horas em solução de sacarose 20% visando a crioproteção do tecido para posterior obtenção de cortes coronais (50 μm) em criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -20 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro gelatinizadas, corados pelo método de Giemsa modificado (Sigma Aldrich, EUA) e cobertas com resina sintética (Sigma Aldrich, EUA) e lamínula.

As imagens histológicas foram obtidas com o auxílio de um microscópio estereoscópico SZX16 (Olympus, Japão) e comparadas com os diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS; WATSON, 2009). A avaliação da análise histologia foi realizada de maneira cega e somente os animais com histologia bilateral confirmada para o hipocampo dorsal foram incluídos nas análises estatísticas.

3.4 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

Para o condicionamento de medo ao contexto, os animais foram expostos individualmente em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm) com paredes laterais de alumínio, parede frontal e teto de acrílico, e piso gradeado com barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro, espaçadas por 9 mm de distância (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Durante uma primeira exposição (exceto Experimento 5), denominada de sessão de familiarização, os animais exploraram livremente a caixa, por um período de 3 minutos, sem a apresentação de nenhum estímulo aversivo. No dia seguinte, os animais foram reexpostos nessa caixa para a sessão de condicionamento (ou pareamento), durante a qual foi induzida a formação da memória aversiva associativa. Durante essa sessão, após um período inicial de 30 segundos (período pré-choque, exceto no Experimento 5), foram aplicados estímulos nas patas dos animais elétricos (com duração de 3 segundos) através de um gerador de corrente elétrica

acoplado ao piso metálico gradeado. A sessão de condicionamento foi classificada de acordo com a intensidade e número de dos estímulos elétricos, da seguinte maneira: i) fraca, com a apresentação de 1 choque de 0,5 mA; ii) intermediária, com a apresentação de 3 choques de 0,7 mA (ou 0,9 em animais operados) e; iii) forte, com a apresentação de 3 choques de 1,2 mA. O intervalo entre os choques, nos protocolos de intensidade intermediária e forte, foi de 30 segundos. Após a sessão de condicionamento, cada animal permaneceu na caixa por 30 segundos adicionais (período pós-choque) antes de retornar à sua respectiva gaiola. As interferências farmacológicas aconteceram imediatamente após a sessão de condicionamento na intenção de modular a etapa de consolidação da memória de medo contextual, exceto no Experimento 4, em que ocorreu 3 ou 6 horas após a sessão de condicionamento na intenção de modular fases mais tardias de consolidação da memória de medo contextual.

A duração total do protocolo experimental foi variável, de acordo com o experimento, com duração máxima de 15 dias. No dia 1 pós-condicionamento, os animais foram reexpostos à caixa pareada com os estímulos nas patas (contexto pareado) por 3 minutos, sem nova aplicação de choques nas patas, visando a evocação da memória aversiva e avaliação das respostas de medo condicionado. No dia 2 pós-condicionamento, os animais foram expostos durante 3 minutos a uma caixa (30 x 30 x 30 cm) com paredes e piso de vidro e teto gradeado (contexto não pareado), que foi utilizada para avaliar a expressão generalizada da resposta de medo. Nos Experimentos 1, 4, 7, 8 e 13 os animais também foram reexpostos a sessões de teste nos contextos pareado e não pareado nos dias 14 e 15 pós-condicionamento, respectivamente. No experimento 3, propositalmente, as sessões de teste nos contextos não pareado e pareado foram realizadas nos dias 1 e 2 pós-condicionamento, respectivamente. Nos Experimentos 9, 10, 11 e 12 os animais não foram submetidos a sessões de teste nos contextos pareado e não pareado.

O tempo de congelamento, ausência de movimentos exceto os necessários pra a respiração e vocalização do animal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969), foi o comportamento defensivo avaliado como indicativo de resposta de medo e como um índice de retenção da memória. Durante a (s) reexposição (ões) ao contexto pareado ou exposição ao contexto não pareado, o tempo de congelamento foi quantificado (em segundos) a cada minuto, com auxílio de um cronômetro, e foi expresso como porcentagem de tempo de congelamento total de cada sessão experimental. Os experimentos foram gravados por um sistema de câmeras, permitindo que o experimentador permanecesse em uma antesala, acompanhando o comportamento do animal por meio da visualização pelo monitor. As sessões experimentais

foram realizadas sob luminosidade de 20 lux. A limpeza dos contextos foi feita com solução de etanol 10% entre a exposição de cada animal.

3.5 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO LIGADO À ENZIMA (ELISA)

Duas horas após a sessão de condicionamento no protocolo de intensidade intermediária, os animais foram ortotaniados através de decapitação em guilhotina e tiveram seus encéfalos rapidamente removidos e imersos em uma placa de Petri contendo solução salina e mantida sobre gelo, visando diminuição da atividade celular e melhor preservação do tecido. Em seguida, o córtex pré-frontal e o hipocampo dorsal foram dissecados, adicionados microtubos e imersos em solução de nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C até o momento do uso.

Para preparação do tecido para ELISA, as amostras foram colocadas em tampão fosfato (PBS) contendo Tween[®] 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA, 10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzametônio (0,1 mM). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a $6900 \times g$ por 10 min a 4 °C. Após centrifugação, o conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com albumina de soro bovino (BSA).

Para quantificação da concentração de BDNF foram utilizadas alíquotas de 100 µl de amostras e kits de ELISA com intervalo de sensibilidade entre 23,4 a 1500 pg/ml (R&D Systems, EUA; N° DY248), conforme descrito por Espírito Santo et al. (2018). Após a reação enzimática de conjugação e geração de um produto final de coloração azul, a concentração do BDNF foi obtida por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) em um leitor de placas de ELISA (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co., Nanjing, China) e por interpolação de uma curva padrão utilizando um ensaio colorimétrico.

3.6 PREPARAÇÃO DE SINAPTOSSOMAS E IMUNOCITOQUÍMICA

Duas horas após a sessão de condicionamento no protocolo de intensidade intermediária, os animais foram ortotaniados através de anestesia com halotano 3% por via inalatória seguida de decapitação em guilhotina. Os encéfalos foram rapidamente removidos e imersos em uma placa de Petri contendo fluido cerebrospinal artificial (NaCl 125 mM, KCl 3

mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Na₂HPO₄ 1,25 mM, NaHCO₃ 25 mM e glicose 11 mM, pH final 7,4) gelado e gaseificado com uma mistura carbogênica de O₂ 5% e CO₂ 95%. A solução foi mantida sobre gelo, visando diminuição da atividade celular e melhor preservação do tecido. Em seguida, o córtex pré-frontal e o hipocampo dorsal foram dissecados, adicionados microtubos e imersos em solução de nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C até o momento do uso.

Para obtenção de sinaptossomas não purificados, ou seja, contendo material da pré-, pós-sinapse e células da glia, as amostras foram homogeneizadas a 4 °C em 10 ml de solução de sacarose (0,32 M) contendo EDTA (1 mM), HEPES (10 mM), BSA (1 mg/ml), e de pH 7,4. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 14000 x g durante 12 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspendido em 1 ml de uma solução de Percoll 45% preparado em uma solução de Krebs (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM, EDTA 1 mM, glicose 10 mM, pH final 7,4). As amostras foram centrifugadas a 14000 x g durante 2 minutos a 4°C e, após centrifugação, a camada superficial contendo os sinaptossomas, foi removida e homogeneizada em 1 ml de solução de Krebs-HEPES (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 Mm, glucose, 5 mM, pH final 7,4).

Após a obtenção dos sinaptossomas não purificados, foram realizadas diluições seriadas das amostras em solução de Krebs-HEPES até obtenção de opacidade de 0,055 em leitura no espectrofotômetro a 600 nm. Em seguida, as amostras (80 µl) foram então colocadas em lamínulas cobertas com poli-D-lisina (Sigma, Portugal), mantidas em temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, os sinaptossomas foram fixados com paraformaldeído 4% (1 ml/lamínula) durante 15 minutos e, após lavagem com tampão PBS, foram permeabilizados em PBS contendo 0,2% de Triton X-100 por 10 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com tampão PBS, os sinaptossomas foram bloqueados com tampão PBS contendo 3% de BSA e 5% de soro de cavalo durante 1 hora, em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de bloqueio para diminuição de ligações inespecíficas, os sinaptossomas foram lavados com tampão PBS contendo 3% de BSA e incubados com 50 µl da solução dos anticorpos primários (diluídos em tampão PBS contendo 3% de BSA) *overnight* a 4 °C (ver Tabela 2). Em seguida, os sinaptossomas foram lavados com tampão PBS contendo 3% de BSA e incubados por 1 hora a temperatura ambiente e protegidos da luz com 50 µl da solução dos anticorpos secundários marcados com um fluoróforo Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594 (diluídos em tampão PBS contendo 3% de BSA). Após lavagem com tampão PBS, as lamínulas foram colocadas em lâminas contendo com meio de montagem (Molecular Probes, Holanda) e seladas com película

transparente. As preparações foram visualizadas em um microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200 através do software Axiovision 4.6 (PG-Hitec, Portugal), através da objetiva de 63 vezes de aumento. Para cada animal e cada combinação de proteínas marcadas os ensaios foram realizados em triplicata e cada lamínula foi analisada pela contagem de pelo menos cinco campos diferentes.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados na imunocitoquímica.

Anticorpo primário	Origem (Diluição)	Anticorpo secundário	Origem (Diluição)
A _{2A} R (sc-32361, Santa Cruz Biotechnology)	Cabra (1:200)	Alexa Fluor 594 anti-cabra (A11058, Invitrogen)	Burro (1:500)
Sinaptofisina (S5768, Sigma-Aldrich)	Camundongo (1:500)	Alexa Fluor 488 anti-camundongo (A21202, Invitrogen)	Burro (1:500)
vGLUT (AB5905, Millipore)	Cobaia (1:2000)	Alexa Fluor 488 anti-cobaia (A11073, Invitrogen)	Cabra (1:500)
vGAT (131004, Synaptic Systems)	Cobaia (1:2000)	Alexa Fluor 488 anti-cobaia (A11073, Invitrogen)	Cabra (1:500)

3.7 ELETROFISIOLOGIA EXTRACELULAR

3.7.1 Preparação das fatias de hipocampo

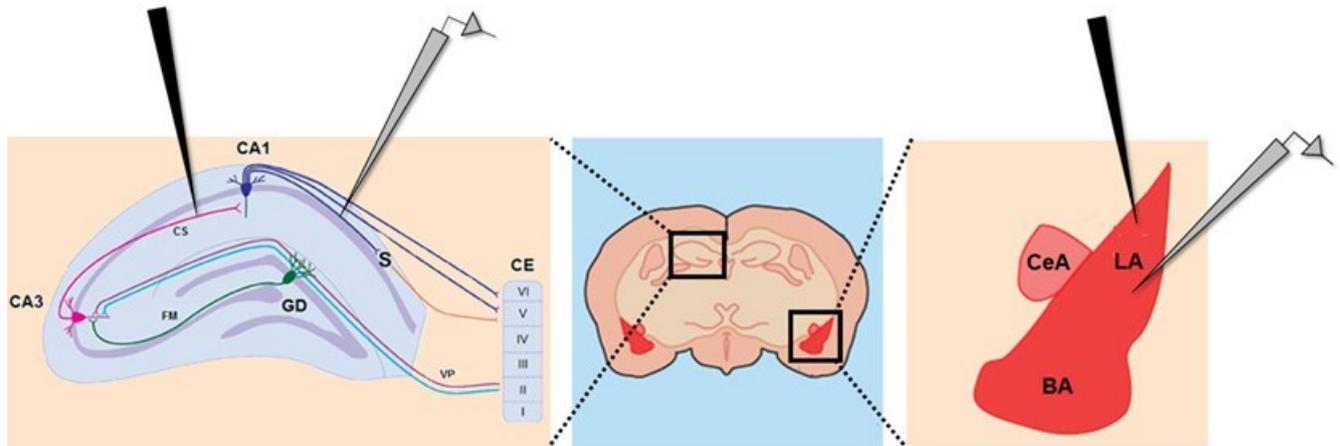
Duas horas após a sessão de condicionamento no protocolo de intensidade intermediária, os animais foram ortotansados através de anestesia com halotano 3% por via inalatória seguida de decapitação em guilhotina. Os encéfalos foram rapidamente removidos e imersos em uma placa de Petri contendo fluido cerebrospinal artificial gelado e gaseificado com uma mistura carbogênica de O₂ 5% e CO₂ 95%. A solução foi mantida sobre gelo, visando diminuição da atividade celular e melhor preservação do tecido. Os hipocampos foram dissecados e, em seguida, fatias coronais de hipocampo de aproximadamente 400 µm de espessura foram obtidas através de um fatiador de tecido McIlwain (Campden Instruments, Reino Unido). As fatias das porções dorsal e ventral foram separadas e transferidas para uma câmara contendo fluido cerebrospinal artificial gaseificado com uma mistura carbogênica de O₂ 5% e CO₂ 95%, mantida a 32 °C, durante uma hora, visando recuperação do procedimento de fatiamento e manutenção da viabilidade das fatias.

3.7.2 Obtenção de registros eletrofisiológicos extracelulares no hipocampo e na amígdala lateral

As fatias de hipocampo ou amígdala foram transferidas para uma câmara de registro, com temperatura constante de 30 °C, e foram constantemente perfundidas com fluido cerebrospinal artificial gaseificado com uma mistura carbogênica de O₂ 5% e CO₂ 95%, a uma taxa de 2 a 3 mL/minuto, até o fim da obtenção dos registros eletrofisiológicos. No hipocampo, um eletrodo de estimulação bipolar concêntrico PND-100 (Kopf, Alemanha) foi posicionado nas fibras nervosas colaterais de Schaffer onde, através de um estimulador Digitimer DS3 (Digitimer LTD, Reino Unido), foram aplicados pulsos de 4 a 6,4 mA de intensidade da corrente, de 0,1 ms de duração, uma vez a cada 20 segundos numa frequência de 0,05Hz. A amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) foi registrada através de um eletrodo de vidro (uma micropipeta com um diâmetro de ponta não maior que 1 mm, e resistência entre 2 a 4 mΩ) preenchido com uma solução de cloreto de sódio na concentração de 4 M posicionado na região CA1 do hipocampo. O posicionamento dos eletrodos de estimulação e da micropipeta de registro nas fatias de hipocampo estão representados na Figura 6.

Na amígdala, um eletrodo de estimulação bipolar concêntrico PND-100 (Kopf, Alemanha) foi posicionado nas fibras nervosas da porção lateral dessa estrutura onde, através de um estimulador Digitimer DS3 (Digitimer LTD, Reino Unido), foram aplicados pulsos de 0,5 a 1,6 mA de intensidade da corrente, de 0,1 ms de duração, uma vez a cada 20 segundos numa frequência de 0,03Hz. A amplitude da resposta de pico da população neuronal (PS, do inglês *population spikes*) foi registrada através de um eletrodo de vidro (uma micropipeta com um diâmetro de ponta não maior que 1 mm, e resistência entre 2 a 4 mΩ) preenchido com uma solução de cloreto de sódio na concentração de 4 M posicionado na região lateral da amígdala, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Representação esquemática do posicionamento do eletrodo de estímulo e da micropipeta de registro no hipocampo dorsal e na amígdala lateral.



Legenda: No hipocampo, o eletrodo de estímulo e a micropipeta de registro foram posicionados nas fibras nervosas colaterais de Schaffer e região CA1 do hipocampo, respectivamente, enquanto na amígdala foram ambos posicionados no núcleo lateral **BA= núcleo basal da amígdala** **CE= córtex entorrinal**; CeA= núcleo central da amígdala; CS= projeções colaterais de Schaffer; FM= fibras musgosas; GD= giro denteado; LA= núcleo lateral da amígdala; S= subículo; VP= via perforante. Fonte: adaptado de STRANGE et al., 2014; JANAK; TYE, 2015; PATTEN et al., 2015.

Após estabilização do sinal de registro obtido das fatias, foi realizada uma curva *input/output* a fim de se investigar a amplitude da resposta sináptica. Para isso, a partir do ponto em que o sinal era nulo, foram aplicados pulsos de estímulo com intensidade cada vez maior a cada 20 segundos. Após observação da resposta máxima sem contaminação, foi estabelecida a estimulação necessária para obtenção de um sinal basal próximo de 40% dessa resposta, que foi acompanhada por pelo menos 10 minutos antes da execução de qualquer protocolo (como estimulação por pulsos pareados e/ ou potenciação de longa duração).

Para obtenção dos registros, o eletrodo de registro foi acoplado a um amplificador ISO-80 (World Precision Instruments, Reino Unido). Três respostas consecutivas foram monitoradas para o cálculo da inclinação do campo dos PEPS ou PS. As respostas foram posteriormente analisadas através do software WinLTP 1.1, gentilmente cedido por W. W. Anderson (Universidade de Bristol, Reino Unido).

3.7.2.1 Estimulação por pulsos pareados

Após a obtenção de respostas basais estáveis nas fatias de hipocampo com estimulação com pulsos simples a 0,05Hz durante 10 minutos, foram aplicados estímulos de dois pulsos com um intervalo de 50 ms entre os pulsos. Na amígdala, foram aplicados estímulos de dois

pulsos com um intervalo de 30 ms entre os pulsos. A razão das respostas aos pulsos pareados (PPR) foi calculada como a razão entre a resposta registrada para o segundo pulso (P2) sobre a resposta registrada para o primeiro, através da média de 3 registros.

3.7.2.2 *Potenciação de longa duração*

A estimulação de alta frequência para indução de potenciação de longa duração (LTP) nas fatias de hipocampo foi realizada através de aplicação de um trem de 100 pulsos a 100 Hz com duração de 1 segundo. Nas fatias de amígdala, a estimulação de alta frequência para indução de LTP foi realizada através de aplicação de três trens de 100 pulsos a 100 Hz com duração de 1 segundo, a cada 5 segundos. Em ambas as estruturas, a resposta sináptica frente estimulação de alta frequência foi acompanhada durante 60 minutos. A ocorrência de LTP foi calculada através da variação percentual entre os minutos 51 a 60 após a estimulação de alta frequência em relação aos 10 minutos (resposta basal) que precederam a aplicação dos pulsos.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.8.1 Experimento 1 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e a expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária

Para investigar se o antagonismo sistêmico do A_{2A}R influencia a resposta de medo condicionado e a expressão generalizada da resposta de medo, 36 ratos foram distribuídos randomicamente em 4 grupos experimentais (8-10 animais por grupo) e receberam uma injeção i.p. de veículo ou do antagonista seletivo do A_{2A}R SCH 58261 (0,05, 0,1 ou 0,2 mg/kg) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os animais foram expostos a sessões de teste no contexto pareado nos dias 1 e 14 dias pós-condicionamento e no contexto não pareado nos dias 2 e 15 pós-condicionamento.

3.8.2 Experimento 2 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade fraca

Para avaliar se o antagonismo sistêmico do A_{2A}R induz a potencialização da consolidação da memória aversiva que impacta na posterior expressão generalizada da resposta de medo, 21 ratos foram distribuídos em 2 grupos experimentais independentes (10-11 animais por grupo) e receberam a injeção de veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) por via i.p. imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade fraca no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os animais foram expostos a sessões de teste nos contextos pareado e não pareado nos dias 1 e 2 pós-condicionamento, respectivamente.

3.8.3 Experimento 3 – Efeito da ordem de exposição aos contextos após a sessão de condicionamento sobre as resposta de medo condicionado e expressão generalizada de medo induzidas pelo antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva em um protocolo de intensidade intermediária

Visando investigar se a ordem de exposição aos contextos após a sessão de condicionamento influencia a expressão generalizada da resposta de medo resultante do antagonismo sistêmico do A_{2A}R, 20 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais (10 animais por grupo) e receberam uma injeção i.p. de veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Contudo, diferente dos experimentos anteriores, os animais foram submetidos aos testes nos contextos não pareado e pareado nos dias 1 e 2 pós-condicionamento, respectivamente.

3.8.4 Experimento 4 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante fases tardias da consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária

Para avaliar se o antagonismo sistêmico do A_{2A}R em fases tardias da consolidação da memória aversiva altera a resposta de medo condicionado e a expressão generalizada da resposta de medo, 26 ratos foram alocados em 3 grupos experimentais (8-9 animais por grupo) e receberam uma injeção i.p. de veículo imediatamente após a sessão de condicionamento, ou

de SCH 58261 (0,1 mg/kg) 3 ou 6 horas após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os animais foram expostos a sessões de teste no contexto pareado nos dias 1 e 14 dias pós-condicionamento e no contexto não pareado nos dias 2 e 15 pós-condicionamento.

3.8.5 Experimento 5 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária de choque imediato

Para descartar a ocorrência de sensibilização das respostas defensivas em decorrência do antagonismo sistêmico do A_{2A}R, e confirmar sua ação sobre a consolidação da memória associativa, 18 ratos foram distribuídos em 2 grupos experimentais (8-10 animais por grupo) e receberam uma injeção i.p. de veículo ou de SCH 58261 (0,1 mg/kg) imediatamente após a sessão de condicionamento em um protocolo de choque imediato. Neste protocolo, os animais não foram submetidos à sessão de familiarização no contexto a ser pareado, e receberam o primeiro choque imediatamente após exposição na caixa no dia da sessão de condicionamento, de maneira a não permitir a formação da experiência associativa (choque + contexto). Os animais foram expostos a sessões de teste nos contextos pareado e não pareado nos dias 1 e 2 pós-condicionamento, respectivamente.

3.8.6 Experimento 6 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva na posterior extinção dessa memória em um protocolo de intensidade intermediária

Para investigar se, além do efeito na potencialização da consolidação da memória aversiva e expressão generalizada da resposta de medo, o antagonismo sistêmico do A_{2A}R influenciaria também a resistência dessa memória à extinção, 16 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais (8 animais por grupo) e receberam uma injeção de veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) por via i.p. imediatamente após a sessão de condicionamento no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Diferente dos experimentos anteriores, um dia após a sessão de condicionamento os animais foram submetidos a uma sessão de extinção da memória aversiva (15 minutos de exposição no contexto pareado), e nos dois dias seguintes expostos nas sessões de teste nos contextos pareado

e não pareado, a fim de avaliar a eficácia desse procedimento em reduzir o tempo de congelamento.

3.8.7 Experimento 7 – Efeito do agonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária

Para verificar se o agonismo sistêmico tem um efeito oposto ao do antagonismo sistêmico do A_{2A}R sobre a consolidação da memória aversiva e/ou sobre a expressão generalizada da resposta de medo, 37 ratos foram alocados aleatoriamente em 4 grupos experimentais (8-10 animais por grupo) e receberam uma injeção i.p. de veículo ou do agonista seletivo dos A_{2A}R CGS 21680 (0,05, 0,1 ou 0,2 mg/kg) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os animais foram expostos a sessões de teste no contexto pareado nos dias 1 e 14 dias pós-condicionamento e no contexto não pareado nos dias 2 e 15 pós-condicionamento.

3.8.8 Experimento 8 – Efeito do agonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade forte

Visando avaliar o efeito do agonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória também na posterior expressão generalizada da resposta de medo, 17 ratos foram distribuídos em 2 grupos experimentais (7-10 animais por grupo) e receberam uma injeção i.p. de veículo ou de CGS 21680 (0,2 mg/kg) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade forte (que *per se* induz altos níveis de expressão generalizada da resposta de medo) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os animais foram expostos a sessões de teste no contexto pareado nos dias 1 e 14 dias pós-condicionamento e no contexto não pareado nos dias 2 e 15 pós-condicionamento.

3.8.9 Experimento 9 – Efeito da modulação farmacológica sistêmica do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva e/ou da modulação da intensidade do protocolo de condicionamento de medo ao contexto sobre o conteúdo de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo

Tem sido demonstrado que a consolidação de memórias aversivas em roedores é influenciada por alterações na plasticidade sináptica em regiões encefálicas como o córtex pré-frontal e o hipocampo, sendo esta dependente, dentre outros mediadores, da expressão de BDNF (LEE; EVERITT; THOMAS, 2004, ALONSO et al., 2005, LUBIN et al., 2008). Além disso, já foi documentada uma interação direta entre o BDNF e o A_{2A}R (LEE; CHAO, 2001; DIÓGENES et al., 2004; TEBANO et al., 2008; ASSAIFE-LOPES et al., 2014; WEI et al., 2014). Visando investigar os possíveis mecanismos moleculares relacionados com a modulação da consolidação da memória aversiva e expressão generalizada de resposta de medo observadas através da manipulação farmacológica sistêmica do A_{2A}R, bem como da intensidade da sessão de condicionamento em nossas condições experimentais, 25 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (4-5 animais por grupo) nas seguintes condições experimentais: naive, submetidos a uma sessão de condicionamento de intensidade intermediária e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de veículo, SCH 58261 (0,1 mg/kg) ou CGS 21680 (0,2 mg/kg), ou submetidos a uma sessão de condicionamento de intensidade forte e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de veículo. Após 120 minutos da sessão de condicionamento (exceto grupo naive), os encéfalos dos animais foram removidos, processados e submetidos a posterior análise dos níveis de BDNF por ELISA, conforme descrito previamente.

3.8.10 Experimento 10 – Efeito do protocolo de condicionamento de intensidade intermediária sobre a distribuição do A_{2A}R em sinapses glutamatérgicas ou GABAérgicas do córtex pré-frontal, hipocampo dorsal e hipocampo ventral durante a consolidação da memória aversiva

Diversos trabalhos vêm demonstrando que ocorrem alterações no conteúdo de proteínas sinápticas em paralelo com as modificações das respostas comportamentais em protocolos relacionados ao estresse, incluindo alterações no conteúdo de A_{2A}R em sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas (CUNHA et al., 2006; SIMÕES et al., 2016). Para avaliar o impacto do protocolo de condicionamento de medo ao contexto sobre o conteúdo sináptico de A_{2A}R, 8 ratos foram alocados em dois grupos experimentais (3-4 animais por grupo): naive, que não foi exposto à sessão de condicionamento, ou condicionado com o protocolo de condicionamento de intensidade intermediária. Após 120 minutos da sessão de condicionamento (exceto grupo naive), os encéfalos dos animais foram removidos, processados

e submetidos a posterior análise imunocitoquímica do conteúdo de A_{2A}R, através da avaliação da sua colocalização com sinaptofisina, vGLUT e vGAT, conforme descrito previamente.

3.8.11 Experimento 11 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R e/ou do protocolo de condicionamento de intensidade intermediária na estimulação de pulso pareado em fatias das porções dorsal ou ventral do hipocampo, ou na porção lateral da amígdala

Considerando as evidências acerca da propriedade do A_{2A}R de controlar a liberação de neurotransmissores em regiões cerebrais relevantes para os processos aprendizado e memória (DE LERA RUIZ; LIM; ZHENG, 2014), o propósito desse experimento foi investigar o envolvimento dos A_{2A}R na probabilidade de liberação de neurotransmissores mediante estímulos pareados nas regiões dorsal e ventral do hipocampo, bem como na porção lateral da amígdala, durante a consolidação da memória aversiva no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Para tanto, 31 ratos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (6-10 animais por grupo): expostos ao contexto a ser pareado mas sem a apresentação dos estímulos incondicionados ou administração de veículo ou droga, expostos ao contexto a ser pareado mas sem a apresentação dos estímulos incondicionados e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de SCH 58261 (0,1 mg/kg), condicionados na sessão de condicionamento de intensidade intermediária e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de veículo, e condicionados na sessão de condicionamento de intensidade intermediária e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de SCH 58261 (0,1 mg/kg). Após 120 minutos da exposição ao contexto ou sessão de condicionamento, os encéfalos dos animais foram removidos, o hipocampo e a amígdala separados e processados de maneira a manter a viabilidade de suas fatias (conforme descrito previamente) para a obtenção de registros eletrofisiológicos após estimulação por pulsos pareados.

3.8.12 Experimento 12 – Efeito do antagonismo sistêmico do A_{2A}R e/ou do protocolo de condicionamento de intensidade intermediária na estimulação de alta frequência em fatias das porções dorsal ou ventral do hipocampo, ou na porção lateral da amígdala

Uma vez que a ativação do A_{2A}R modula diversas vias de sinalização intracelular envolvidas no controle da plasticidade sináptica em diferentes regiões cerebrais, incluindo aquelas classicamente relacionadas com processos aprendizado e memória (COSTENLA et al., 2011; KASTER et al. 2015; SIMÕES et al., 2016; TEMIDO-FERREIRA et al., 2018),

buscamos investigar o envolvimento do $A_{2A}R$ na modulação de processos de plasticidade sináptica (como LTP) nas regiões dorsal e ventral do hipocampo, e na amígdala lateral, durante a consolidação da memória aversiva no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Nesse experimento, 31 ratos foram alocados nos seguintes grupos experimentais (6-10 animais por grupo): expostos ao contexto a ser pareado mas sem a apresentação dos estímulos incondicionados ou administração de veículo ou droga, expostos ao contexto a ser pareado mas sem a apresentação dos estímulos incondicionados e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de SCH 58261 (0,1 mg/kg), condicionados na sessão de condicionamento de intensidade intermediária e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de veículo, e condicionados na sessão de condicionamento de intensidade intermediária e tratados imediatamente após com uma injeção i.p. de SCH 58261 (0,1 mg/kg). Após 120 minutos da exposição ao contexto ou sessão de condicionamento, os encéfalos dos animais foram removidos, o hipocampo e a amígdala foram separados e processados de maneira a manter a viabilidade de suas fatias para a obtenção de registros eletrofisiológicos após estimulação de alta frequência para obtenção de LTP.

3.8.13 Experimento 13 – Efeito do antagonismo do $A_{2A}R$ no hipocampo dorsal durante a consolidação da memória aversiva sobre a resposta de medo condicionado e expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de intensidade intermediária

Buscando corroborar os dados obtidos através de registros eletrofisiológicos e investigar o envolvimento do hipocampo dorsal nos efeitos comportamentais de potencialização da consolidação da memória aversiva e aumento da expressão generalizada da resposta de medo induzidos através do antagonismo sistêmico do $A_{2A}R$, 34 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (8-9 animais por grupo) e receberam uma infusão intrahipocampal de veículo ou do antagonista seletivo dos $A_{2A}R$ SCH 58261 (6, 12 ou 24 ng) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os animais foram expostos a sessões de teste no contexto pareado nos dias 1 e 14 dias pós-condicionamento e no contexto não pareado nos dias 2 e 15 pós-condicionamento.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos experimentos comportamentais, a porcentagem do tempo de congelamento foi expressa como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados de ELISA foram apresentados como média \pm EPM de pg de BDNF a cada mg de proteína. Os resultados de imunocitoquímica foram expressos como média \pm EPM da porcentagem de comarcação entre as proteínas avaliadas. Para os experimentos relacionados a registro eletrofisiológicos, os dados foram apresentados como média \pm EPM da razão da estimulação de pulso emparelhado, da porcentagem de variação inclinação do PEPS em relação ao basal ou da porcentagem da magnitude do efeito observado.

Após avaliar a distribuição das amostras e assegurar sua normalidade ou homocedasticidade através do teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, à ANOVA de medidas repetidas, ou ao teste t de Student, conforme necessário. O teste post-hoc de Newman-Keuls foi utilizado quando a ANOVA revelou uma interação significativa, sendo aceito um valor de significância estatística de $P < 0,05$ para determinar as diferenças entre os grupos.

Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 11[®] (StatSoft Inc., EUA) e representados em gráficos confeccionados com o software GraphPad Prism 6[®] (GraphPad Prism, EUA).

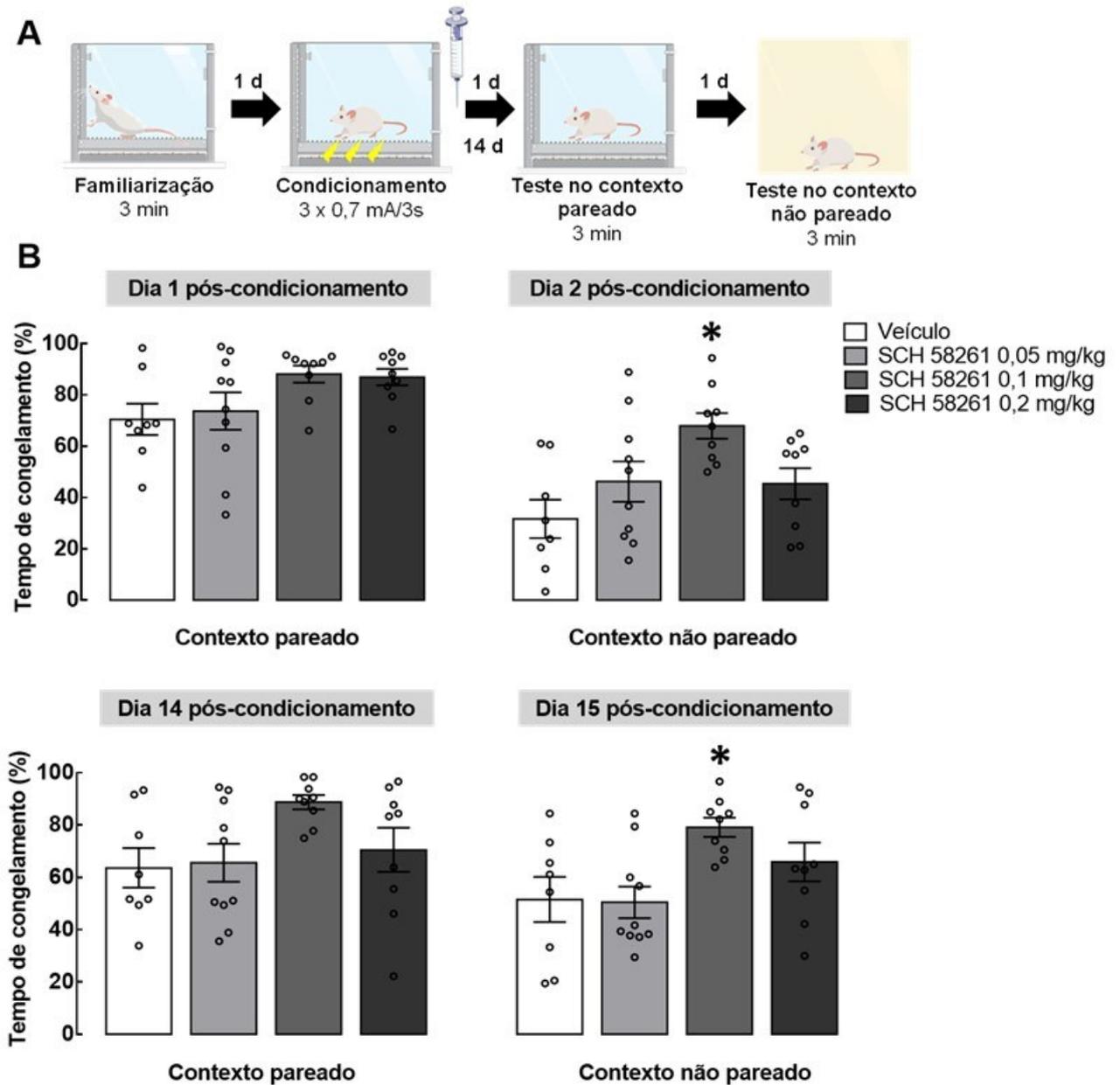
4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}AR DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA

A ANOVA de uma via não demonstrou efeito significativo do tratamento durante a sessão de teste no contexto pareado 1 dia após o condicionamento ($F_{3, 32} = 2,75$; $P = 0,06$), uma vez que quando reexpostos ao contexto previamente pareado com os choques nas patas, todos os grupos apresentaram valores semelhantes de tempo de congelamento [Média ± EPM: Veículo: $70,49 \pm 6,10\%$; SCH 58261 (0,05 mg/kg): $73,72 \pm 7,25\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $88,15 \pm 3,30\%$; SCH 58261 (0,2 mg/kg): $86,97 \pm 3,21\%$]. Tal efeito possivelmente está relacionado à manifestação de um nível teto para esta resposta comportamental nas condições experimentais adotadas. Durante a exposição à sessão de teste no contexto não pareado 2 dias após o condicionamento, a ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento ($F_{3, 32} = 4,71$; $P = 0,008$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 0,1 mg/kg de SCH 58261 apresentaram aumento significativo do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo [$P = 0,003$; Média ± EPM: Veículo: $31,66 \pm 7,49\%$; SCH 58261 (0,05 mg/kg): $46,22 \pm 7,88\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $67,96 \pm 4,98\%$; SCH 58261 (0,2 mg/kg): $45,37 \pm 6,07\%$], sugerindo aumento da expressão generalizada da resposta de medo, conforme ilustrado na Figura 7.

Quando os mesmos animais foram reexpostos ao contexto pareado e não pareado 14 e 15 dias depois, respectivamente, o mesmo padrão de resposta comportamental foi observado. Ou seja, a ANOVA de uma via não demonstrou efeito significativo do tratamento durante a sessão de teste no contexto pareado [$F_{3, 32} = 2,76$; $P = 0,06$; Média ± EPM: Veículo: $63,61 \pm 7,56\%$; SCH 58261 (0,05 mg/kg): $65,55 \pm 7,25\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $88,70 \pm 2,72\%$; SCH 58261 (0,2 mg/kg): $70,49 \pm 8,42\%$], mas sim durante a sessão de teste no contexto não pareado ($F_{3, 32} = 4,30$; $P = 0,012$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 0,1 mg/kg de SCH 58261 durante a consolidação da memória aversiva permaneceram apresentando um aumento significativo do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo [$P = 0,003$; Média ± EPM: Veículo: $51,53 \pm 8,63\%$; SCH 58261 (0,05 mg/kg): $50,44 \pm 6,01\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $79,13 \pm 3,66\%$; SCH 58261 (0,2 mg/kg): $65,86 \pm 7,43\%$], conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) durante a consolidação da memória aversiva induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.

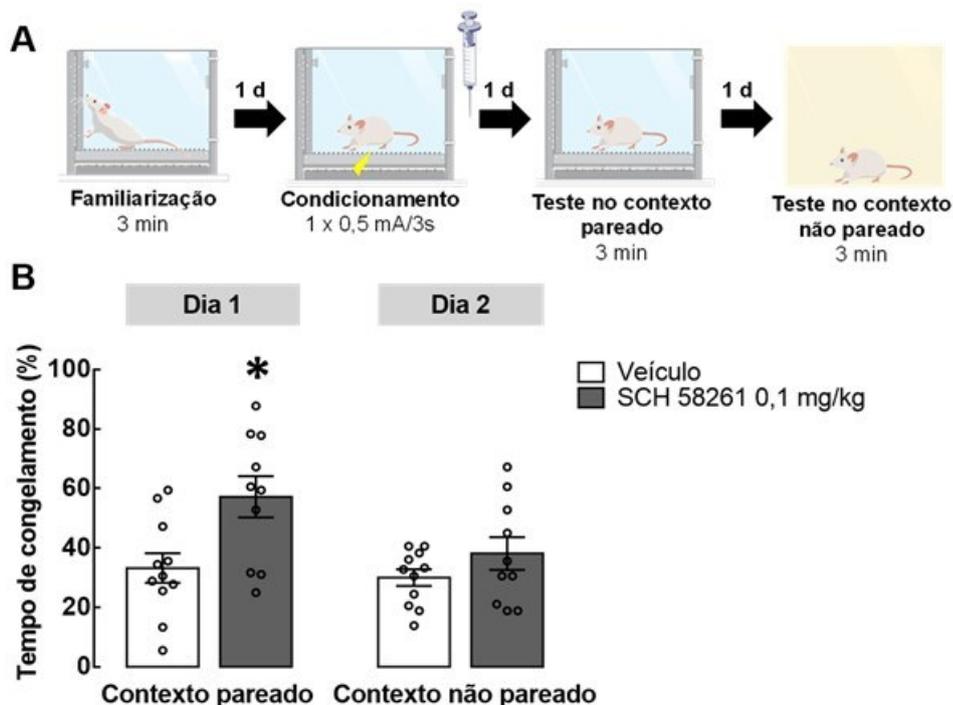


Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou SCH 58261 (0,05, 0,1 ou 0,2 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição às sessões de teste no contexto pareado 1 ou 14 dias após o condicionamento, ou no contexto não pareado 2 ou 15 dias após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.2 EXPERIMENTO 2 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R POTENCIALIZA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE FRACA

O teste “t” de Student revelou uma diferença significativa do tratamento na sessão de teste no contexto pareado realizado 1 dia após o condicionamento ($t_{19} = 2,85$; $P = 0,01$). Os animais tratados com SCH 58261 (0,1 mg/kg) apresentaram um aumento significativo no tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo [Média ± EPM: Veículo: $33,18 \pm 4,97\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $57,17 \pm 6,92\%$], confirmando a potencialização da consolidação da memória aversiva, conforme observado na Figura 8. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos na sessão de teste no contexto não pareado realizada 2 dias após o condicionamento ($t_{19} = 1,35$; $P = 0,19$) [Média ± EPM: Veículo: $29,30 \pm 2,78\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $38,11 \pm 5,54\%$].

Figura 8 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) potencializa a consolidação da memória aversiva no protocolo de intensidade fraca de condicionamento de medo ao contexto.



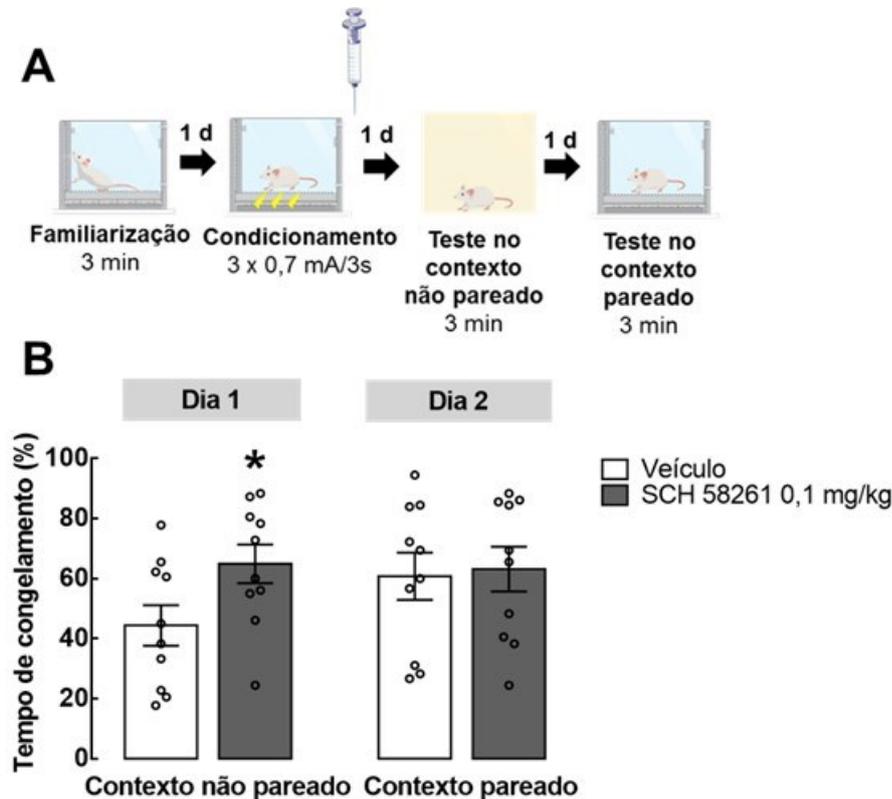
Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade fraca (1 choque de 0,5 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média ± EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição à sessão de teste no contexto pareado 1 dia após o condicionamento, ou à sessão de teste no contexto não pareado 2 dias após o condicionamento.

* indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo (teste “t” de Student para grupos independentes). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.3 EXPERIMENTO 3 – A ORDEM DE EXPOSIÇÃO AOS CONTEXTOS APÓS A SESSÃO DE CONDICIONAMENTO NÃO INTERFERE NO AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO INDUZIDO PELO ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA

Conforme observado na Figura 9, o teste “t” de Student revelou uma diferença significativa do tratamento na sessão de teste no contexto não pareado realizado 1 dia após o condicionamento ($t_{18} = 2,21$; $P = 0,04$). Os animais tratados com SCH 58261 (0,1 mg/kg) apresentaram um aumento significativo no tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo [Média ± EPM: Veículo: $44,39 \pm 6,70\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $64,89 \pm 6,43\%$], confirmando o aumento da expressão generalizada de medo em decorrência do antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva independentemente da pré-exposição ao contexto pareado. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos na sessão de teste no contexto pareado realizada 2 dias após o condicionamento [$t_{18} = 0,22$; $P = 0,83$; Média ± EPM: Veículo: $60,72 \pm 7,85\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $63,11 \pm 7,46\%$].

Figura 9 – O aumento da expressão generalizada da resposta de medo induzido pela administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) durante a consolidação da memória aversiva no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto independe da ordem de exposição aos contextos.



Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição às sessões de teste nos contextos não pareado e pareado 1 e 2 dias após o condicionamento, respectivamente. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo (teste “t” de Student para grupos independentes). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.4 EXPERIMENTO 4 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO $A_{2A}R$ DURANTE FASES MAIS TARDIAS DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA TAMBÉM PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA

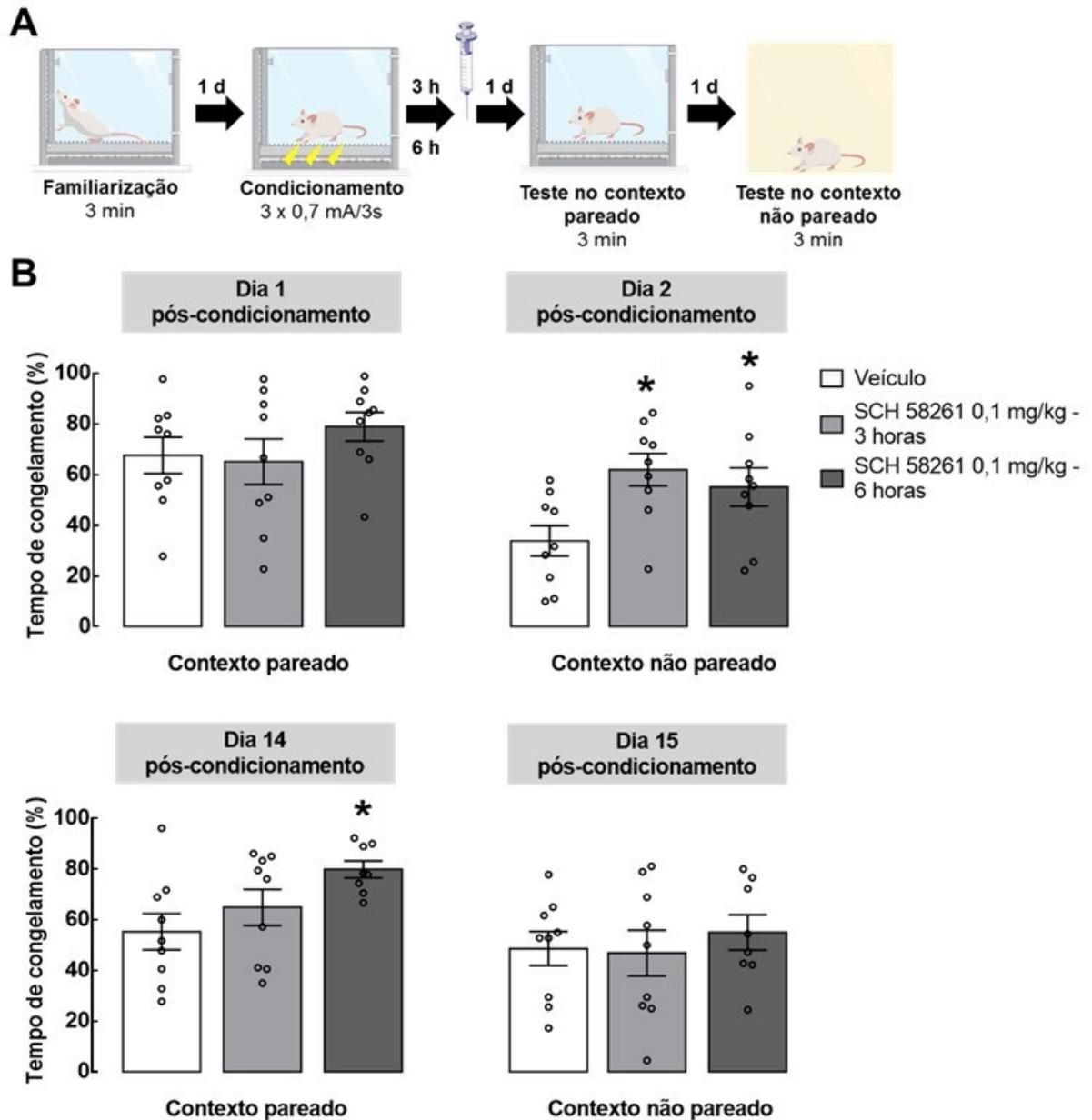
A ANOVA de uma via não revelou diferença significativa do tratamento ($F_{2,23} = 1,80$; $P = 0,19$) para o tempo de congelamento no teste no contexto pareado 1 dia após a sessão de condicionamento [Média \pm EPM: Veículo: $67,59 \pm 7,15\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 3 horas: $65,12 \pm 9,01\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 6 horas: $83,40 \pm 3,98\%$]. Entretanto, quando os animais foram reexpostos no contexto pareado 14 dias após o condicionamento, a ANOVA de

uma via indicou um efeito significativo do tratamento ($F_{2,23} = 3,74$; $P = 0,04$), sendo revelado pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls que os animais tratados com 0,1 mg/kg de SCH 58261 6 horas após o condicionamento apresentaram aumento significativo do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo [$P = 0,03$; Média \pm EPM: Veículo: $55,25 \pm 7,16\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 3 horas: $64,88 \pm 7,11\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 6 horas: $79,86 \pm 3,36\%$], conforme ilustrado na Figura 10.

Para as sessões de teste no contexto não pareado, a ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo do tratamento na sessão realizada 2 dias após o condicionamento [$F_{2, 23} = 5,82$; $P = 0,009$; Média \pm EPM: Veículo: $33,82 \pm 6,00\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 3 horas: $61,97 \pm 6,41\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 6 horas: $59,24 \pm 7,18\%$]. Conforme observado na Figura 10, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 0,1 mg/kg de SCH 58261 3 ou 6 horas após o condicionamento apresentaram um aumento significativo do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo ($P = 0,02$ e $P = 0,01$, respectivamente). Entretanto, na sessão de teste realizada 15 dias após o condicionamento não foi observada diferença significativa do tempo de congelamento entre os grupos [$F_{2, 23} = 0,30$; $P = 0,74$; Média \pm EPM: Veículo: $48,58 \pm 6,72\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 3 horas: $46,85 \pm 8,99\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) – 6 horas: $55,00 \pm 6,94\%$].

Em conjunto, esses resultados sugerem que o antagonismo do $A_{2A}R$ mesmo em momentos mais tardios da janela de consolidação induz aumento da expressão generalizada da resposta de medo, mas altera a persistência dessa resposta. Contudo, esse resultado também levanta o questionamento se a administração do antagonista seletivo do $A_{2A}R$ não estaria induzindo um quadro de sensibilização ao invés de potencializar a consolidação da memória aversiva e, por isso, independente do momento de sua administração ainda seria capaz de induzir um aumento da expressão generalizada do comportamento de medo.

Figura 10 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) em fases tardias da consolidação da memória aversiva (3 ou 6 horas) induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.

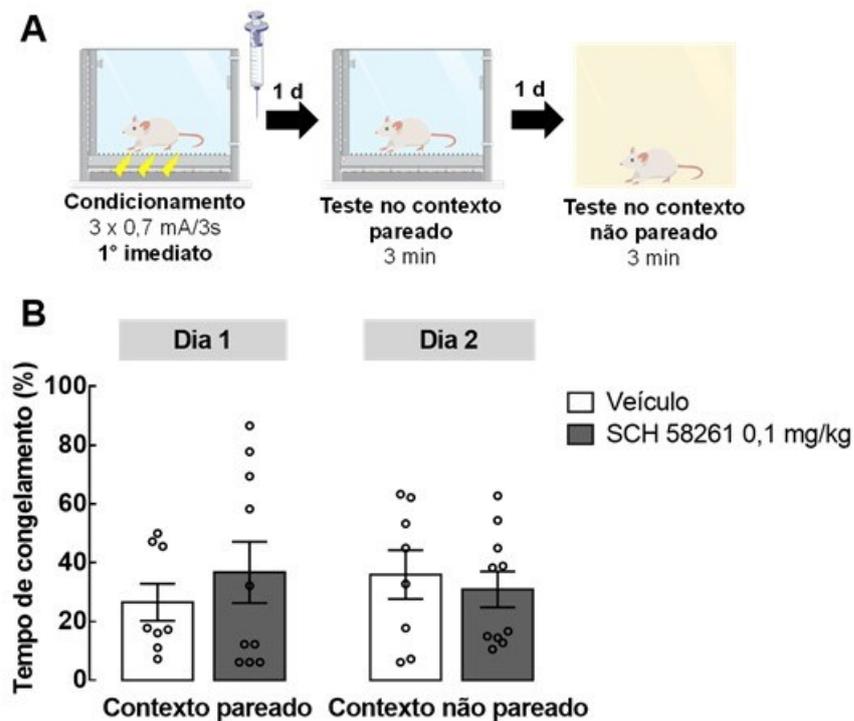


Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento ou 3 ou 6 horas após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA), respectivamente, no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição às sessões de teste no contexto pareado 1 ou 14 dias após o condicionamento, ou no contexto não pareado 2 ou 15 dias após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.5 EXPERIMENTO 5 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA NÃO INDUZ SENSIBILIZAÇÃO DAS RESPOSTAS DEFENSIVAS

Conforme observado na Figura 11, o teste “t” de Student não revelou uma diferença significativa do tratamento durante as sessões de teste nos contextos pareado ($t_{16} = 0,79$; $P = 0,4436$) ou não pareado ($t_{16} = 0,50$; $P = 0, 0,6213$) 1 ou 2 dias após o condicionamento, respectivamente, sugerindo que o antagonismo sistêmico do A_{2A}R aumenta a expressão generalizada do comportamento de medo por modular a consolidação da memória associativa aversiva e não através da indução de um quadro de sensibilização.

Figura 11 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) não potencializa a consolidação da memória aversiva ou induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de choque imediato.



Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,3 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto de choque imediato. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição à sessão de teste nos contextos pareado ou não pareado, 1 ou 2 dias após o condicionamento, respectivamente. ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.6 EXPERIMENTO 6 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA NÃO RESULTA EM POSTERIOR RESISTÊNCIA À EXTINÇÃO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA

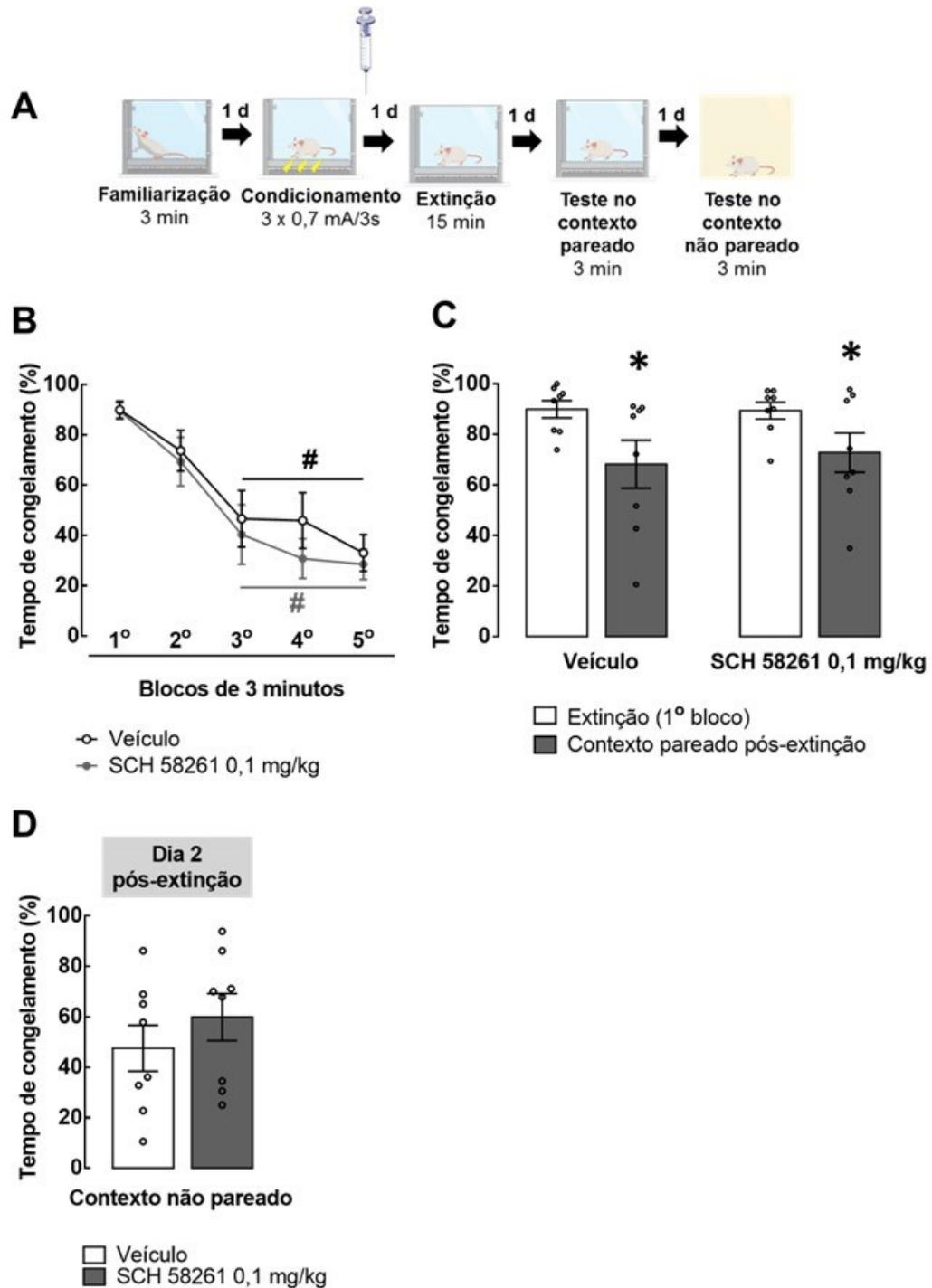
Durante a sessão de extinção a ANOVA com medidas repetidas demonstrou uma diferença significativa em relação ao fator repetição (cinco blocos de 3 minutos) durante essa sessão [$F_{4, 56} = 30,07$; $P = <0,0001$; Média \pm EPM: Veículo 1º bloco: $89,93 \pm 3,41\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 1º bloco: $89,37 \pm 3,32\%$; Veículo 2º bloco: $73,68 \pm 8,11\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 2º bloco: $69,31 \pm 9,67\%$; Veículo 3º bloco: $46,60 \pm 11,21\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 3º bloco: $40,35 \pm 11,90\%$; Veículo 4º bloco: $45,90 \pm 11,05\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 4º bloco: $30,76 \pm 7,87\%$; Veículo 5º bloco: $33,05 \pm 7,29\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 5º bloco: $28,54 \pm 6,05\%$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou, conforme ilustrado na Figura 12, uma redução significativa na expressão de congelamento nos grupos tratados com veículo e SCH58261 (0,1mg/kg) a partir do terceiro blocos em relação ao primeiro [Veículo 3º bloco *versus* Veículo 1º bloco: $P = 0,0002$; Veículo 4º bloco *versus* Veículo 1º bloco: $P = 0,0002$; Veículo 5º bloco *versus* Veículo 1º bloco: $P = 0,0001$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 3º bloco *versus* SCH 58261 (0,1 mg/kg) 1º bloco: $P = 0,0001$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 4º bloco *versus* SCH 58261 (0,1 mg/kg) 1º bloco: $P = 0,0001$; SCH 58261 (0,1 mg/kg) 5º bloco *versus* SCH 58261 (0,1 mg/kg) 1º bloco: $P = 0,0001$]. Não foram observados efeitos significativos do tratamento ($F_{1, 14} = 0,48$; $P = 0,50$) ou da interação entre o tratamento e os blocos de 3 min ($F_{4, 56} = 0,36$; $P = 0,84$). Dessa forma, ambos os grupos foram capazes de adquirir a memória de extinção.

Na sessão de teste no contexto pareado realizada um dia após a sessão de extinção, o teste “t” de Student não revelou diferença significativa entre os grupos [$t_{14} = 0,37$; $P = 0,7141$; Média \pm EPM: Veículo: $68,20 \pm 9,49\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $72,78 \pm 7,76\%$]. Entretanto, quando considerado o fator repetição, ou seja, foi comparado o tempo de congelamento durante a sessão de teste no contexto pareado *versus* o tempo de congelamento durante o primeiro bloco da sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas revelou uma diferença significativa em relação ao fator repetição ($F_{1, 14} = 19,88$; $P = 0,00054$), mas não revelou diferença significativa quanto ao fator tratamento ($F_{1, 14} = 0,60$; $P = 0,81$) ou interação entre os fatores ($F_{1, 14} = 0,36$; $P = 0,56$). Conforme observado na Figura 12, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou uma diminuição significativa do tempo de congelamento entre as sessões tanto para o grupo veículo ($P = 0,01$; Média \pm EPM: Veículo 1º bloco: $89,93 \pm 3,41\%$; Veículo teste: $68,20 \pm 9,49\%$) quanto para o grupo tratado com SCH 58261 (0,1 mg/kg) ($P = 0,2$; Média \pm EPM: SCH 58261

1º bloco: $89,37 \pm 3,32\%$; SCH 58261 teste: $72,78 \pm 7,76\%$). Esse resultado sugere que antagonismo sistêmico do A_{2A}R não induz um prejuízo na consolidação da memória de extinção.

O teste “t” de Student não revelou uma diferença significativa entre os grupos na sessão de teste no contexto não pareado realizada dois dias após a sessão de condicionamento [$t_{14} = 0,95$; $P = 0,36$; Média \pm EPM: Veículo: $47,50 \pm 9,14\%$; SCH 58261 (0,1mg/kg): $59,86 \pm 9,31\%$). Esse resultado sugere que a extinção da memória aversiva bloqueia o aumento da expressão generalizada da resposta de medo induzida pelo antagonismo sistêmico do A_{2A}R, provavelmente por atenuar a valência emocional dessa memória.

Figura 12 – A administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) não aumenta a resistência da memória aversiva à extinção no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.



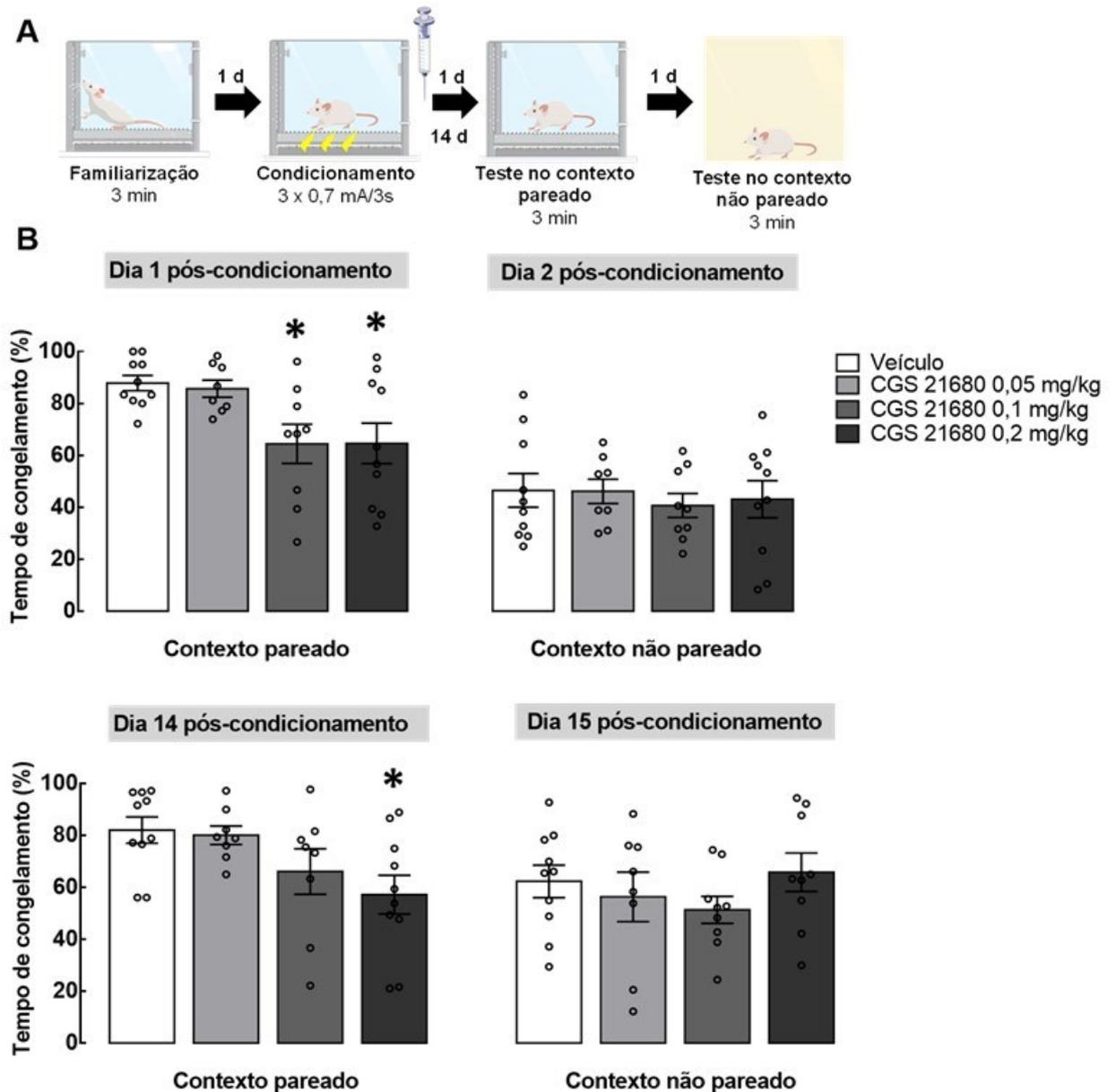
Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. Veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição à sessão de (B) extinção 1 dia após o condicionamento, ou exposição às sessões de (C) teste no contexto e (D) teste no contexto não pareado 1 e 2 dias após a sessão de extinção, respectivamente. # e * indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao próprio grupo durante o primeiro bloco da extinção (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.7 EXPERIMENTO 7 – O AGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA PROMOVE DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA

A ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo do tratamento durante a sessão de teste no contexto pareado 1 dia após o condicionamento ($F_{3, 33} = 5,01$; $P = 0,006$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 0,1 e 0,2 mg/kg de CGS 21680 apresentaram diminuição significativa do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo [$P = 0,02$; $P = 0,03$, respectivamente; Média \pm EPM: Veículo: $89,17 \pm 2,43\%$; CGS 21680 (0,05 mg/kg): $85,69 \pm 3,28\%$; CGS 21680 (0,1 mg/kg): $64,88 \pm 7,57\%$; CGS 21680 (0,2 mg/kg): $64,61 \pm 7,80\%$], sugerindo prejuízo da consolidação da memória aversiva, conforme ilustrado na Figura 13. Durante a exposição à sessão de teste no contexto não pareado 2 dias após o condicionamento, a ANOVA de uma via não demonstrou um efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento ($F_{3, 38} = 0,30$; $P = 0,82$), uma vez que quando reexpostos a esse contexto todos os grupos apresentaram valores semelhantes de tempo de congelamento [Média \pm EPM: Veículo: $47,50 \pm 6,25\%$; CGS 21680 (0,05 mg/kg): $46,18 \pm 4,67\%$; CGS 21680 (0,1 mg/kg): $40,12 \pm 4,83\%$; CGS 21680 (0,2 mg/kg): $43,11 \pm 7,14\%$], possivelmente devido à manifestação de um nível chão para esta resposta comportamental nas condições experimentais adotadas.

Quando os mesmos animais foram reexpostos em sessões de teste no contexto pareado e não pareado 14 e 15 dias depois, respectivamente, a ANOVA de uma via também demonstrou efeito significativo do tratamento durante a sessão de teste no contexto pareado [$F_{3, 33} = 3,59$; $P = 0,02$; Média \pm EPM: Veículo: $82,05 \pm 5,04\%$; CGS 21680 (0,05 mg/kg): $80,07 \pm 3,57\%$; CGS 21680 (0,1 mg/kg): $65,55 \pm 7,78\%$; CGS 21680 (0,2 mg/kg): $57,22 \pm 7,49\%$], mas não durante a sessão de teste no contexto não pareado [$F_{3, 33} = 1,15$; $P = 0,34$; Média \pm EPM: Veículo: $62,33 \pm 6,26\%$; CGS 21680 (0,05 mg/kg): $56,389 \pm 9,56\%$; CGS 21680 (0,1 mg/kg): $51,36 \pm 5,24\%$; CGS 21680 (0,2 mg/kg): $45,67 \pm 6,44\%$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 0,2 mg/kg de CGS 21680 durante a consolidação da memória aversiva permaneceram apresentando uma diminuição significativa do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo ($P = 0,04$) quando reexpostos ao contexto previamente pareado com os choques nas patas, conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – A administração sistêmica de CGS 21680 (0,1 ou 0,2 mg/kg) durante a consolidação da memória aversiva diminui a resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto.



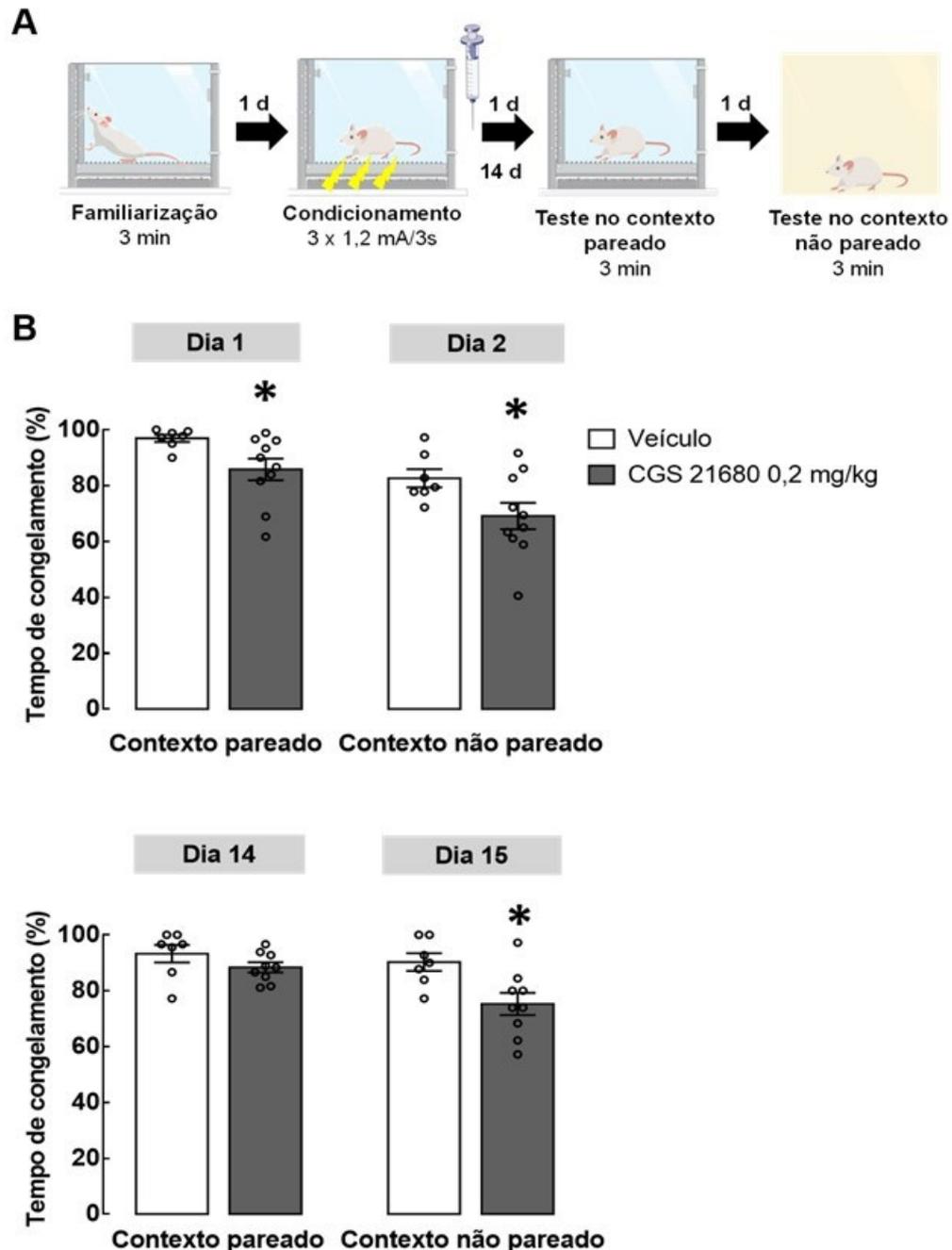
Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou CGS 21680 (0,05, 0,1 ou 0,2 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição às sessões de teste no contexto pareado 1 ou 14 dias após o condicionamento, ou no contexto não pareado 2 ou 15 dias após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.8 EXPERIMENTO 8 – O AGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA PROMOVE DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DA RESPOSTA DE MEDO NOS CONTEXTOS PAREADO E NÃO PAREADO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE FORTE

Conforme observado na Figura 14, o teste “t” de Student revelou uma diferença significativa do tratamento durante as sessões de teste nos contextos pareado [$t_{15} = 2,31$; $P = 0,04$; Média \pm EPM: Veículo: $82,05 \pm 5,04\%$; CGS 21680 (0,05 mg/kg): $80,07 \pm 3,57\%$] ou não pareado ($t_{15} = 2,13$; $P = 0,05$) 1 ou 2 dias após o condicionamento, respectivamente. Os animais tratados com CGS 21680 (0,2 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo, sugerindo que o agonismo sistêmico do A_{2A}R diminui a expressão generalizada do comportamento de medo por prejudicar a consolidação da memória aversiva.

Quando os mesmos animais foram reexpostos em sessões de teste 14 e 15 dias depois, o teste “t” de Student não revelou diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos frente exposição ao contexto pareado ($t_{15} = 1,43$; $P = 0,17$), mas revelou que os animais tratados com CGS 21680 (0,2 mg/kg) continuaram apresentando uma diminuição significativa do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo durante a exposição ao contexto não pareado ($t_{15} = 2,80$; $P = 0,01$), demonstrando uma diminuição persistente da expressão generalizada da resposta de medo, conforme ilustrado na Figura 14.

Figura 14 – A administração sistêmica de CGS 21680 (0,2 mg/kg) não prejudica a consolidação da memória aversiva e diminui a expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade forte de condicionamento de medo ao contexto.

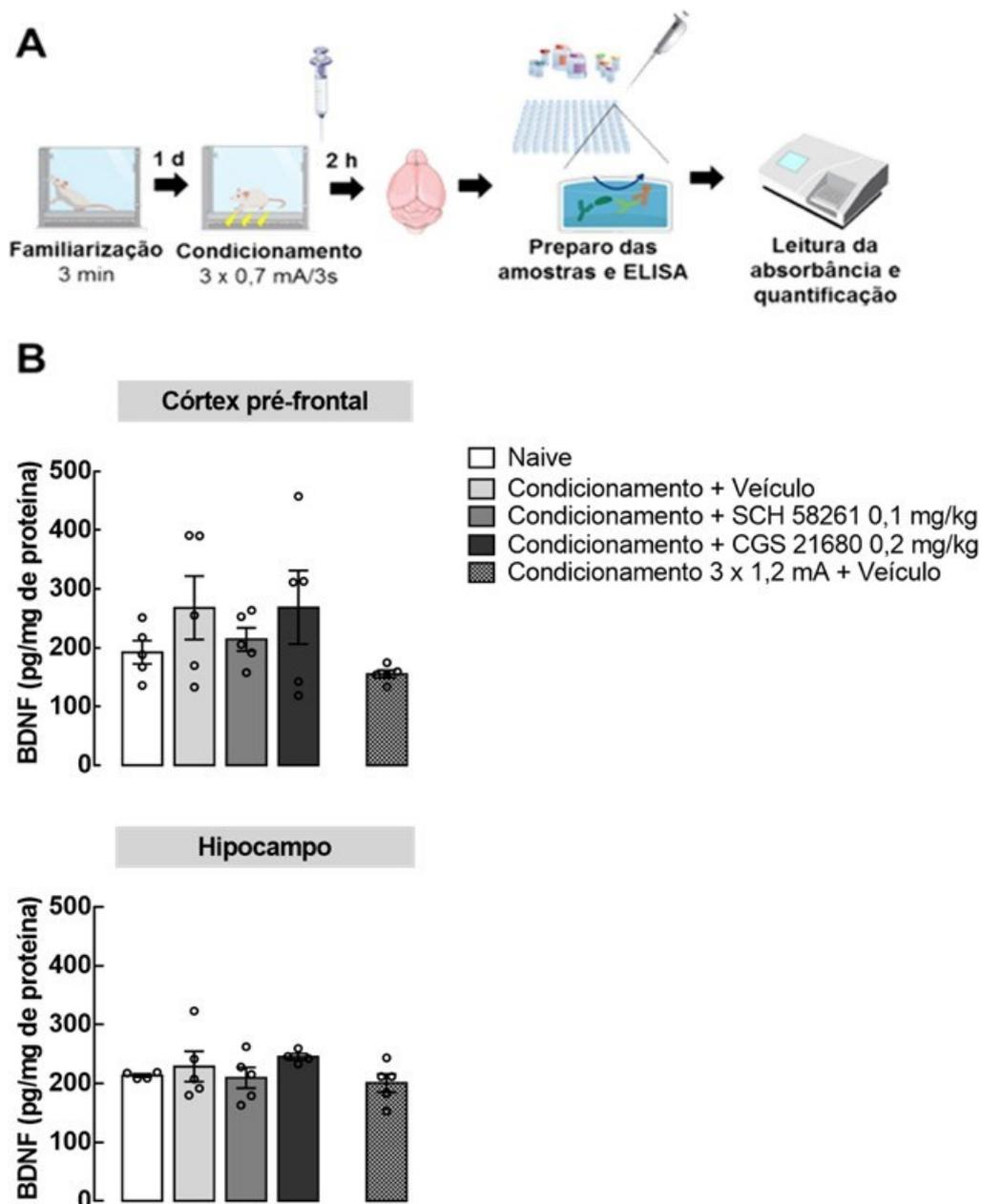


Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou CGS 21680 (0,2 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade forte (3 choques de 1,2 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição às sessões de teste no contexto pareado 1 ou 14 dias após o condicionamento, ou às sessões de teste no contexto não pareado 2 ou 15 dias após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo (teste "t" de Student para grupos independentes). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.9 EXPERIMENTO 9 – A MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA SISTÊMICA DO A_{2A}R DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E/OU A INTENSIDADE DO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO NÃO ALTERAM OS NÍVEIS DE BDNF NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E NO HIPOCAMPO

Para a análise dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal durante a consolidação da memória aversiva, a ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo da intensidade da sessão de condicionamento [$F_{2, 12} = 2,96$; $P = 0,09$; Média \pm EPM: Naive: $192,15 \pm 19,91\%$; Condicionamento intermediário + veículo: $267,82 \pm 53,91\%$; Condicionamento forte + veículo: $155,13 \pm 6,54\%$], bem como da manipulação farmacológica dos A_{2A}R no protocolo de intensidade intermediária [$F_{2, 12} = 0,41$; $P = 0,68$; Média \pm EPM: Veículo: $267,82 \pm 53,90\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $214,24 \pm 19,65\%$; CGS 21680 (0,2 mg/kg): $257,59 \pm 79,29\%$]. O mesmo foi observado para o hipocampo em relação à intensidade da sessão de condicionamento ($F_{2, 12} = 0,72$; $P = 0,51$; Média \pm EPM: Naive: $203,68 \pm 9,91\%$; Condicionamento intermediário + veículo: $228,72 \pm 25,82\%$; Condicionamento forte + veículo: $200,50 \pm 15,33\%$) e à manipulação farmacológica do A_{2A}R no protocolo de intensidade intermediária [$F_{2, 12} = 0,16$; $P = 0,85$; Média \pm EPM: Veículo: $228,72 \pm 25,82\%$; SCH 58261 (0,1 mg/kg): $209,47 \pm 17,75\%$; CGS 21680 (0,2 mg/kg): $245,10 \pm 5,47\%$] conforme ilustrado na Figura 15. Assim, esses resultados sugerem que não há um envolvimento direto do BDNF, nesse tempo experimental, com as alterações comportamentais observadas através da manipulação farmacológica sistêmica do A_{2A}R, bem como da intensidade da sessão de condicionamento empregada em nossas condições experimentais.

Figura 15 – A intensidade da sessão de condicionamento no protocolo de condicionamento de medo ao contexto e/ou a administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) ou CGS 21680 (0,2 mg/kg) não alteram os níveis de BDNF no córtex pré-frontal ou hipocampo durante a consolidação da memória aversiva.



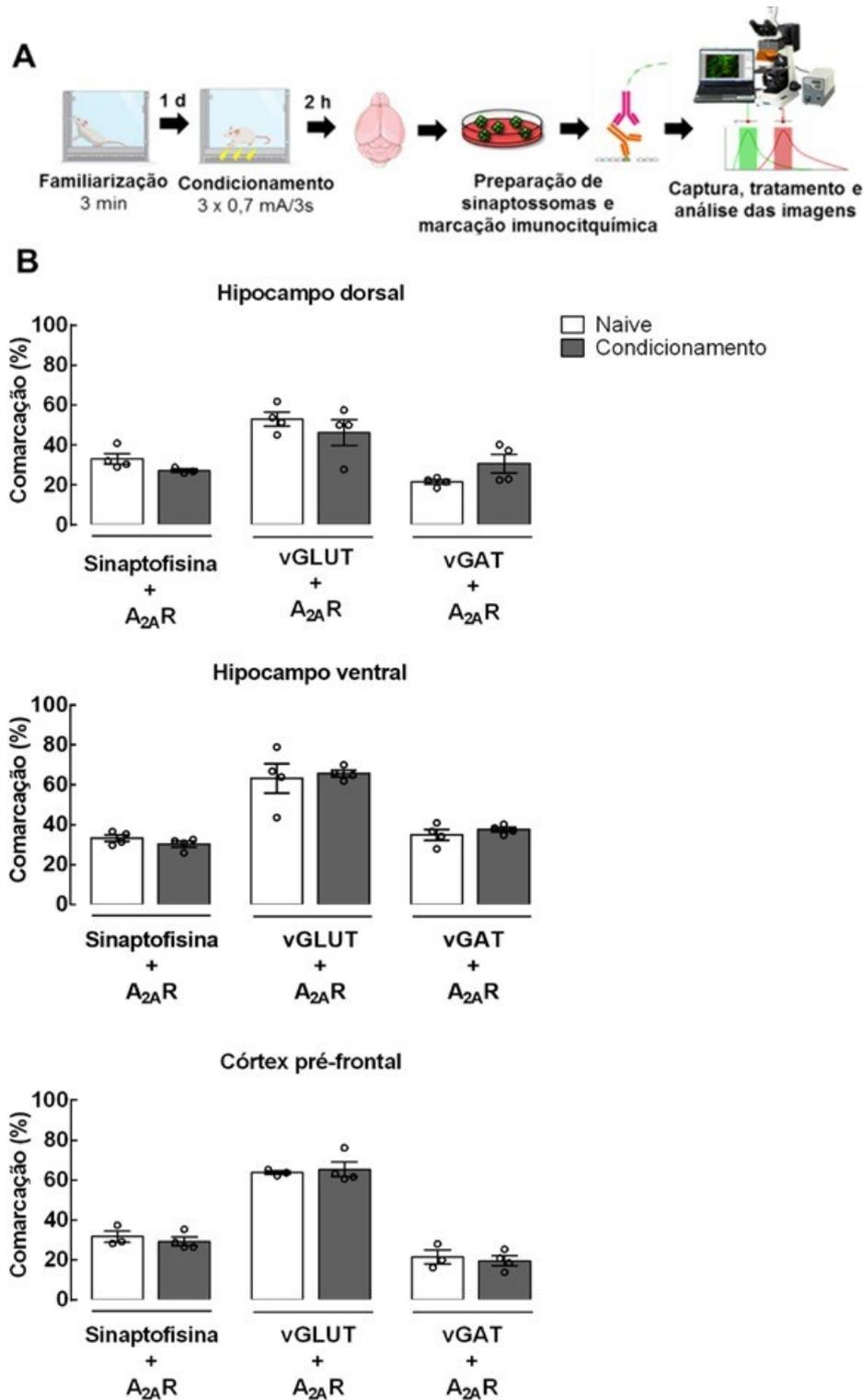
Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Os animais do grupo naive não foram submetidos a qualquer sessão experimental, nem receberam nenhum tratamento. Veículo, SCH 58261 (0,1 mg/kg) ou CGS 21680 (0,05, 0,1 ou 0,2 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Veículo foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade forte (3 choques de 1,2 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM dos níveis de BDNF, em pg/mg de proteína, obtidos de amostras de córtex pré-frontal e hipocampo coletadas 120 minutos após o condicionamento. Os valores foram

analisados através de ANOVA de uma via independentes para a intensidade da sessão de condicionamento ou manipulação farmacológica dos A_{2A}R no protocolo de intensidade intermediária. ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.10 EXPERIMENTO 10 – O PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA NÃO ALTERA A DISTRIBUIÇÃO DO A_{2A}R EM SINAPSES GLUTAMATÉRGICAS OU GABAÉRGICAS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, HIPOCAMPO DORSAL E HIPOCAMPO VENTRAL DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA

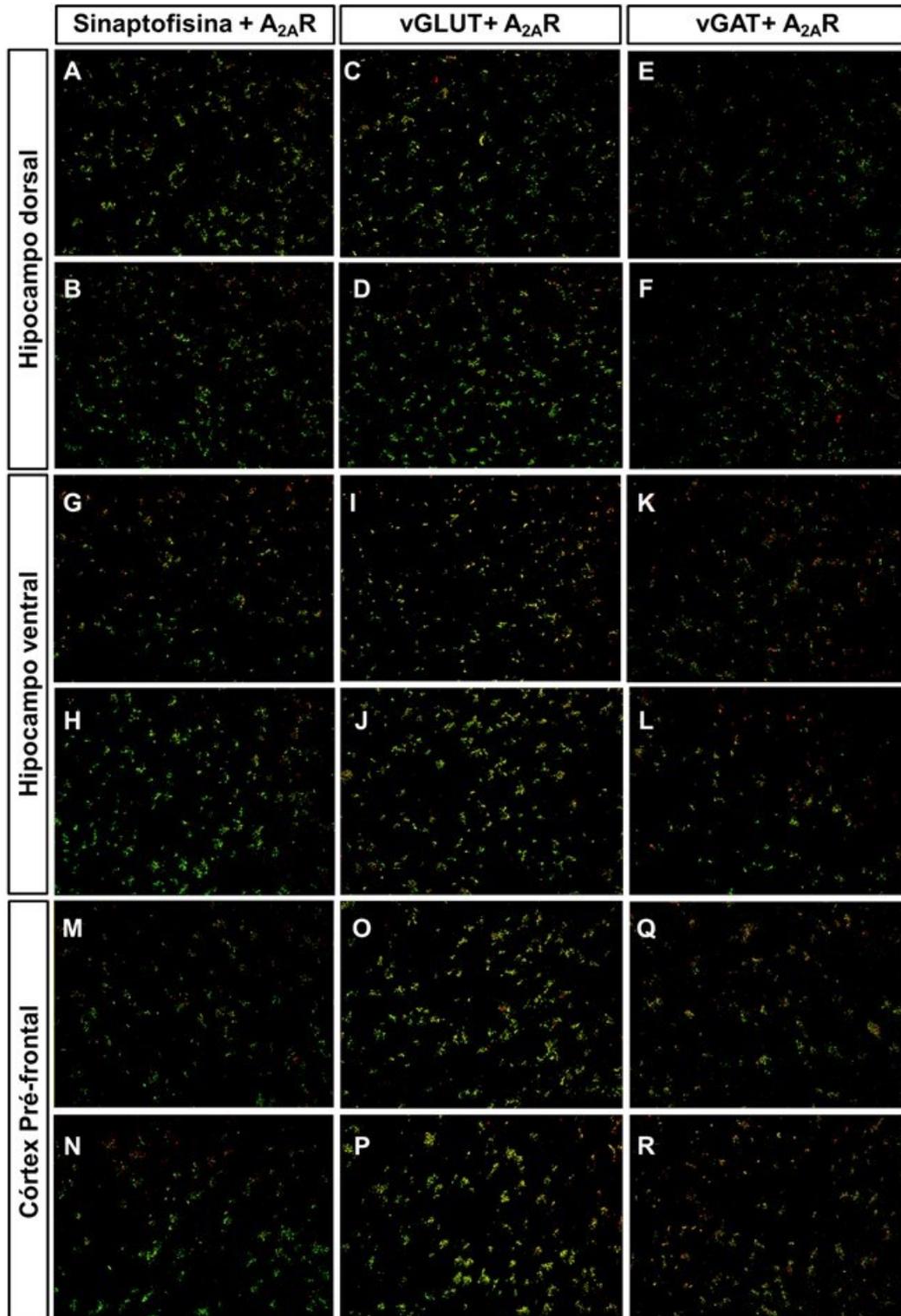
Conforme ilustrado na Figura 16, no hipocampo dorsal, hipocampo ventral ou córtex pré-frontal o teste “t” de Student não revelou uma diferença significativa do condicionamento na comarcação de A_{2A}R com sinaptofisina ($t_5 = 1,81$; $P = 0,13$; Média \pm EPM: Naive: $33,14 \pm 2,68\%$; Condicionado: $27,22 \pm 0,86\%$; $t_6 = 1,35$; $P = 0,22$; Média \pm EPM: Naive: $33,30 \pm 1,62\%$; Condicionado: $30,31 \pm 1,50\%$; $t_5 = 0,68$; $P = 0,52$; Média \pm EPM: Naive: $31,62 \pm 2,93\%$; Condicionado: $29,23 \pm 2,11\%$, respectivamente), vGLUT ($t_6 = 0,90$; $P = 0,40$; Média \pm EPM: Naive: $53,02 \pm 3,48\%$; Condicionado: $46,39 \pm 6,46\%$; $t_6 = 0,31$; $P = 0,76$; Média \pm EPM: Naive: $63,33 \pm 7,34\%$; Condicionado: $65,69 \pm 1,67\%$; $t_5 = 0,39$; $P = 0,72$; Média \pm EPM: Naive: $63,66 \pm 0,90\%$; Condicionado: $65,35 \pm 3,63\%$, respectivamente) ou vGAT ($t_5 = 1,41$; $P = 0,22$; Média \pm EPM: Naive: $21,58 \pm 1,10\%$; Condicionado: $27,63 \pm 4,89\%$; $t_6 = 0,91$; $P = 0,40$; Média \pm EPM: Naive: $33,94 \pm 2,71\%$; Condicionado: $37,60 \pm 1,16\%$; $t_5 = 0,43$; $P = 0,68$; Média \pm EPM: Naive: $21,34 \pm 3,50\%$; Condicionado: $19,57 \pm 2,39\%$, respectivamente). Em conjunto, esses dados sugerem que, em nossas condições experimentais, o condicionamento não altera o conteúdo de A_{2A}R em sinapses glutamatérgicas ou GABAérgicas durante a consolidação da memória aversiva.

Figura 16 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto de intensidade intermediária não altera o conteúdo de $A_{2A}R$ em sinapses glutamatérgicas ou GABAérgicas durante a consolidação da memória aversiva.



Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Os animais do grupo naive não foram expostos a nenhuma sessão experimental, e os animais do grupo condicionado foram expostos à sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de comarcação entre $A_{2A}R$ e sinaptofisina, vGLUT ou vGAT obtidas de amostras de hipocampo dorsal, hipocampo ventral e córtex pré-frontal coletadas 120 minutos após o condicionamento. $^{\circ}$ representa os indivíduos do respectivo grupo.

Figura 17 – Imagens representativas da comarcação de A_{2A}R com sinaptofisina, vGLUT ou vGAT em sinaptossomas de hipocampo dorsal, hipocampo ventral ou córtex pré-frontal de amostras obtidas durante a consolidação da memória aversiva em um protocolo de condicionamento de medo ao contexto de intensidade intermediária.



Legenda: Os animais do grupo naive não foram expostos a nenhuma sessão experimental (quadros A, C, E, G, I, K, M, O e Q) e os animais do grupo condicionado foram expostos à sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto (quadros B, D, F, H, J, L, N, P e R). Imagens obtidas a partir da objetiva com aumento de 63 vezes.

4.11 EXPERIMENTO 11 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R E/OU O PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA NÃO ALTERAM A FACILITAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO DE PULSO PAREADO NAS PORÇÕES DORSAL OU VENTRAL DO HIPOCAMPO, MAS O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R PREJUDICA ESSE MECANISMO NA AMÍGDALA LATERAL

Na estimulação por pulsos pareados com o intervalo entre os pulsos de 50 ms, o teste “t” de Student para amostra única demonstrou que a razão entre o segundo e o primeiro pulso foi significativamente maior que 1 em todos os grupos experimentais no hipocampo dorsal, conforme observado na Figura 18 [Contexto: $t_9 = 17,48$; $P = < 0,0001$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 23,11$; $P = < 0,0001$; Condicionamento + Veículo: $t_8 = 13,70$, $P = < 0,0001$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_4 = 7,83$, $P = 0,0014$; Média \pm EPM: Contexto: $1,795 \pm 0,045$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $1,95 \pm 0,041$; Condicionamento + Veículo: $1,83 \pm 0,060$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $1,95 \pm 0,12$]. Através da ANOVA de duas vias não foi observada diferença significativa entre os grupos para essa mesma razão no hipocampo dorsal em relação ao fator condicionamento ($F_{1, 26} = 0,08$; $P = 0,78$), ao fator tratamento ($F_{1, 26} = 4,21$; $P = 0,05$), ou na interação entre ambos os fatores ($F_{1, 26} = 0,05$; $P = 0,82$).

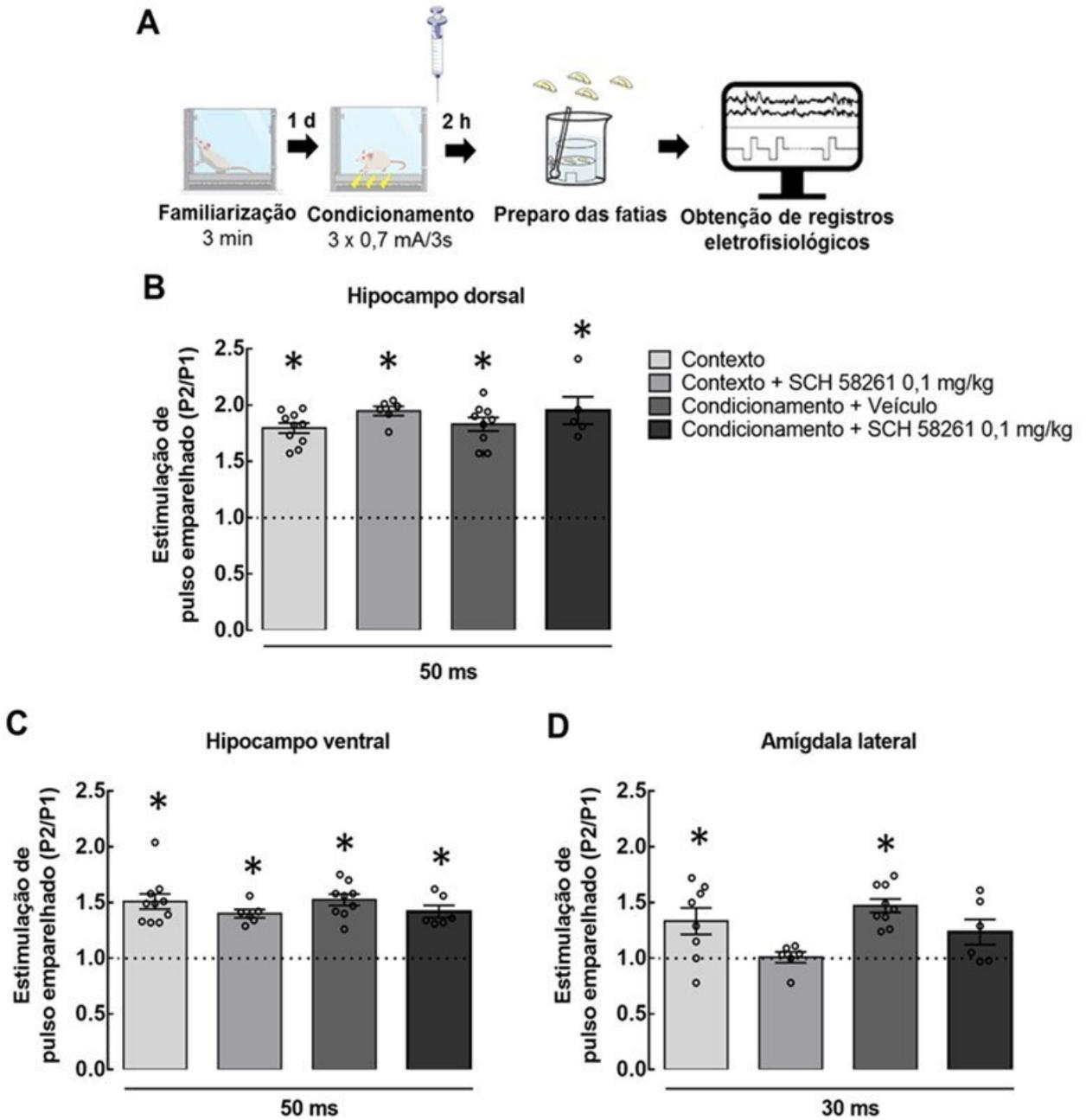
O teste “t” de Student para amostra única também demonstrou que a razão entre o segundo e o primeiro pulso foi significativamente maior que o 1 em todos os grupos experimentais no hipocampo ventral [Contexto: $t_9 = 7,47$; $P = < 0,0001$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 10,67$; $P = 0,0001$; Condicionamento + Veículo: $t_8 = 10,25$, $P = < 0,0001$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 7,57$, $P = 0,0006$; Média \pm EPM: Contexto: $1,51 \pm 0,068$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $1,40 \pm 0,04$; Condicionamento + Veículo: $1,52 \pm 0,05$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $1,42 \pm 0,05$]. Conforme observado na Figura 18, a ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre os grupos para essa mesma razão no hipocampo ventral em relação ao fator condicionamento ($F_{1, 27} = 0,08$; $P = 0,78$), ao fator tratamento ($F_{1, 27} = 3,10$; $P = 0,09$), ou na interação entre ambos os fatores ($F_{1, 27} = 0,00056$; $P = 0,98$).

Em conjunto, esses dados sugerem que o antagonismo sistêmico do A_{2A}R ou o protocolo de condicionamento de medo ao contexto não alteram a resposta frente a estimulação de pulso emparelhado tanto no hipocampo dorsal, quanto no hipocampo ventral, visto que todos

os grupos experimentais apresentaram uma facilitação de pulso pareado (facilitação da liberação de neurotransmissores) de magnitude semelhante.

Na amígdala lateral, para a estimulação por pulsos pareados com o intervalo entre os pulsos de 30 ms, o teste “*t*” de Student para amostra única demonstrou que a razão entre o segundo e o primeiro pulso foi significativamente maior que o 1 nos grupos Contexto ($t_7 = 2,81$; $P = 0,03$; Média \pm EPM: $1,33 \pm 0,12$) e Condicionamento + Veículo ($t_8 = 7,82$, $P = < 0,0001$; Média \pm EPM: $1,47 \pm 0,06$), mas não nos grupos Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg) ($t_5 = 0,17$; $P = 0,87$; Média \pm EPM: $1,01 \pm 0,05$) e Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg) ($t_5 = 2,06$, $P = 0,09$; Média \pm EPM: $1,23 \pm 0,11$). A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa em relação ao fator tratamento ($F_{1, 25} = 9,15$; $P = 0,006$), mas não em relação ao fator condicionamento ($F_{1, 25} = 3,89$; $P = 0,06$) ou na interação entre os fatores ($F_{1, 25} = 0,23$; $P = 0,64$). Assim, esses resultados demonstram que o antagonismo sistêmico do A_{2A}R prejudica a facilitação de pulso pareado (facilitação da liberação de neurotransmissores) na amígdala lateral, independente do condicionamento de medo ao contexto.

Figura 18 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto e/ou o antagonismo sistêmico dos $A_{2A}R$ induzem uma facilitação de pulso pareado em fatias de hipocampo dorsal e ventral, enquanto o antagonismo sistêmico dos $A_{2A}R$ prejudica a facilitação de pulso pareado em fatias de amígdala lateral.

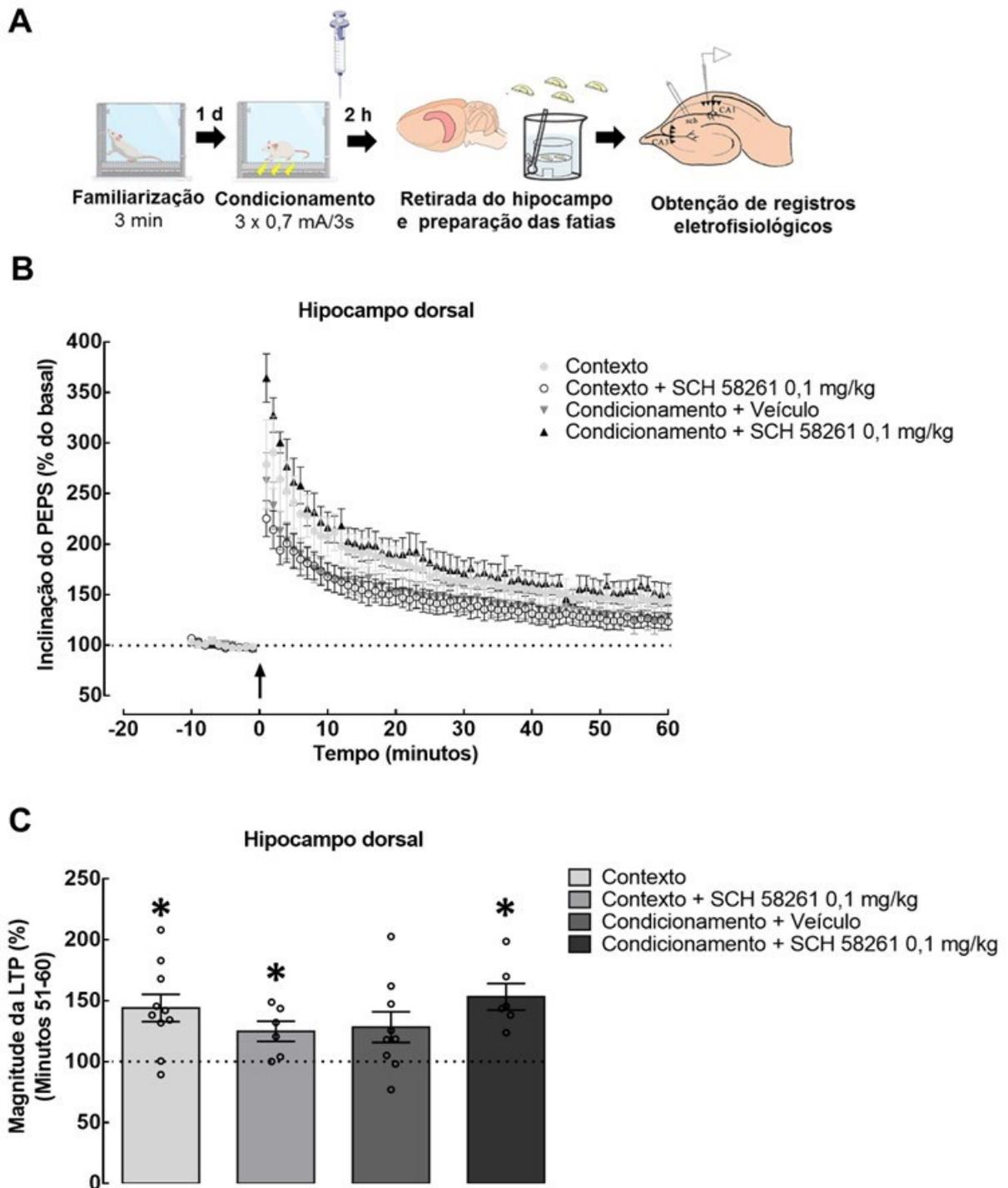


Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. Conforme o grupo experimental, os animais receberam uma injeção i.p. de veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) imediatamente após exposição ao contexto ou sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da razão das respostas de pulsos emparelhados (segundo pulso/primeiro pulso) obtidas em fatias de hipocampo dorsal (B), ventral (C) ou amígdala lateral (D) coletadas 120 minutos após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) do próprio grupo em relação ao valor de 1 (teste "t" de Student para amostra única). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

4.12 EXPERIMENTO 12 – O ANTAGONISMO SISTÊMICO DO A_{2A}R REVERTE O PREJUÍZO DA POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO INDUZIDO PELO PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA NO HIPOCAMPO DORSAL

Quando analisado o valor médio dos 10 últimos minutos após a aplicação da estimulação de alta frequência, a ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre os grupos quanto à LTP no hipocampo dorsal em relação ao fator condicionamento ($F_{1,27} = 0,28$; $P = 0,60$), ao fator tratamento ($F_{1,27} = 0,06$; $P = 0,82$), ou na interação entre ambos os fatores ($F_{1,27} = 3,41$; $P = 0,08$). Entretanto, quando avaliada a magnitude da LTP no hipocampo dorsal através do teste “t” de Student para amostra única demonstrou uma diferença significativa em relação ao valor de 100%, exceto no grupo que foi submetido ao protocolo de condicionamento de intensidade intermediária e recebeu a injeção i.p. de veículo durante a consolidação da memória aversiva, conforme observado na Figura 19 [Contexto: $t_9 = 3,93$; $P = 0,0035$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 3,01$; $P = 0,03$; Condicionamento + Veículo: $t_8 = 2,26$, $P = 0,05$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 4,87$, $P = 0,005$; Média \pm EPM: Contexto: $144,10 \pm 11,23\%$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $124,90 \pm 8,26\%$; Condicionamento + Veículo: $128,30 \pm 12,53\%$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $153,30 \pm 10,94\%$]. Esses dados sugerem que o protocolo de condicionamento de intensidade intermediária induz um prejuízo na LTP em fatias do hipocampo dorsal obtidas durante a consolidação da memória aversiva, sendo este prejuízo revertido pelo antagonismo sistêmico do A_{2A}R.

Figura 19 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto induz um prejuízo na potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo dorsal, que é revertido pelo antagonismo sistêmico dos A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva.

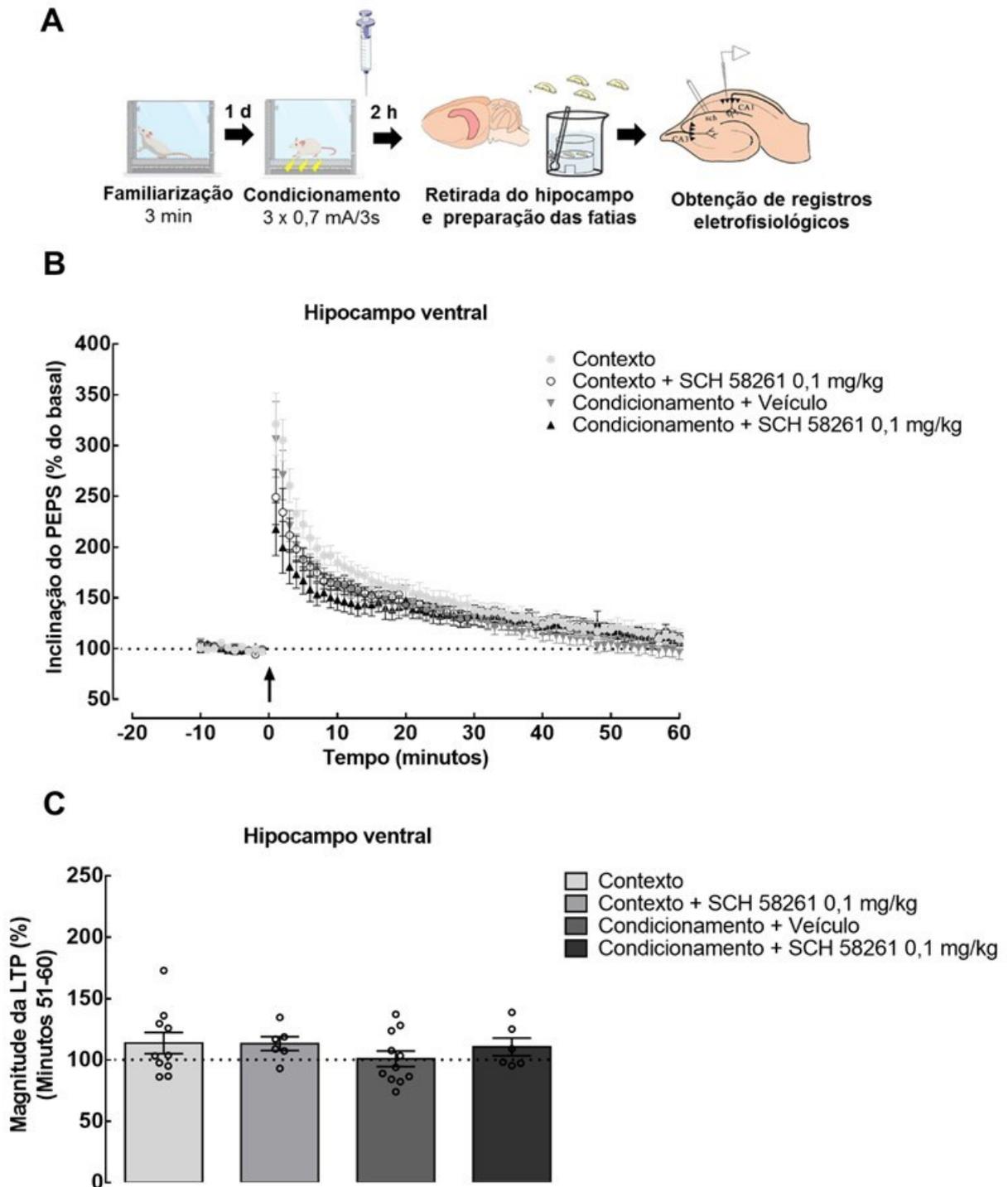


Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Decurso temporal da LTP ao longo de 60 minutos após a aplicação da estimulação de alta frequência, indicada pela seta. Conforme o grupo experimental, os animais receberam uma injeção i.p. de veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) imediatamente após exposição ao contexto ou sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os registros eletrofisiológicos foram obtidos de fatias de hipocampo dorsal coletadas 120 minutos após a exposição ao contexto ou à sessão de condicionamento, assim como após o respectivo tratamento farmacológico. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem da inclinação do potencial

excitatório pós-sináptico (PEPS) em relação ao basal. (C) Magnitude da LTP após aplicação de estimulação de alta frequência. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem da magnitude da LTP durante os 10 últimos minutos após a estimulação de alta frequência. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) do próprio grupo em relação ao valor de 100% (teste “t” de Student para amostra única). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

Conforme ilustrado na Figura 20, em fatias de hipocampo ventral não foi observada LTP após estimulação de alta frequência em nenhum dos grupos analisados. A ANOVA de duas vias não revelou nenhuma diferença significativa entre os grupos no valor da inclinação do PEPS relativo à média dos 10 últimos minutos após a aplicação do estímulo quanto ao fator condicionamento ($F_{1, 29} = 0,35$; $P = 0,56$), ao fator tratamento ($F_{1, 29} = 0,97$; $P = 0,33$), ou na interação entre ambos os fatores ($F_{1, 29} = 0,42$; $P = 0,52$). Também, o teste “t” de Student para amostra única não demonstrou nenhuma diferença significativa em relação ao valor de 100%, [Contexto: $t_9 = 1,60$; $P = 0,14$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 2,35$; $P = 0,06$; Condicionamento + Veículo: $t_{10} = 0,14$, $P = 0,89$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 1,47$, $P = 0,20$; Média \pm EPM: Contexto: $113,70 \pm 8,63\%$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $112,30 \pm 5,66\%$; Condicionamento + Veículo: $100,90 \pm 6,31\%$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $110,60 \pm 7,24\%$]. Dessa maneira, esses resultados sugerem nem o protocolo de condicionamento de intensidade intermediária nem o antagonismo sistêmico do A_{2A}R são capazes de induzir uma alteração na plasticidade sináptica (LTP) em fatias do hipocampo ventral.

Figura 20 – O protocolo de condicionamento de medo ao contexto e/ou o antagonismo sistêmico dos A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva não mantém a potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo ventral.

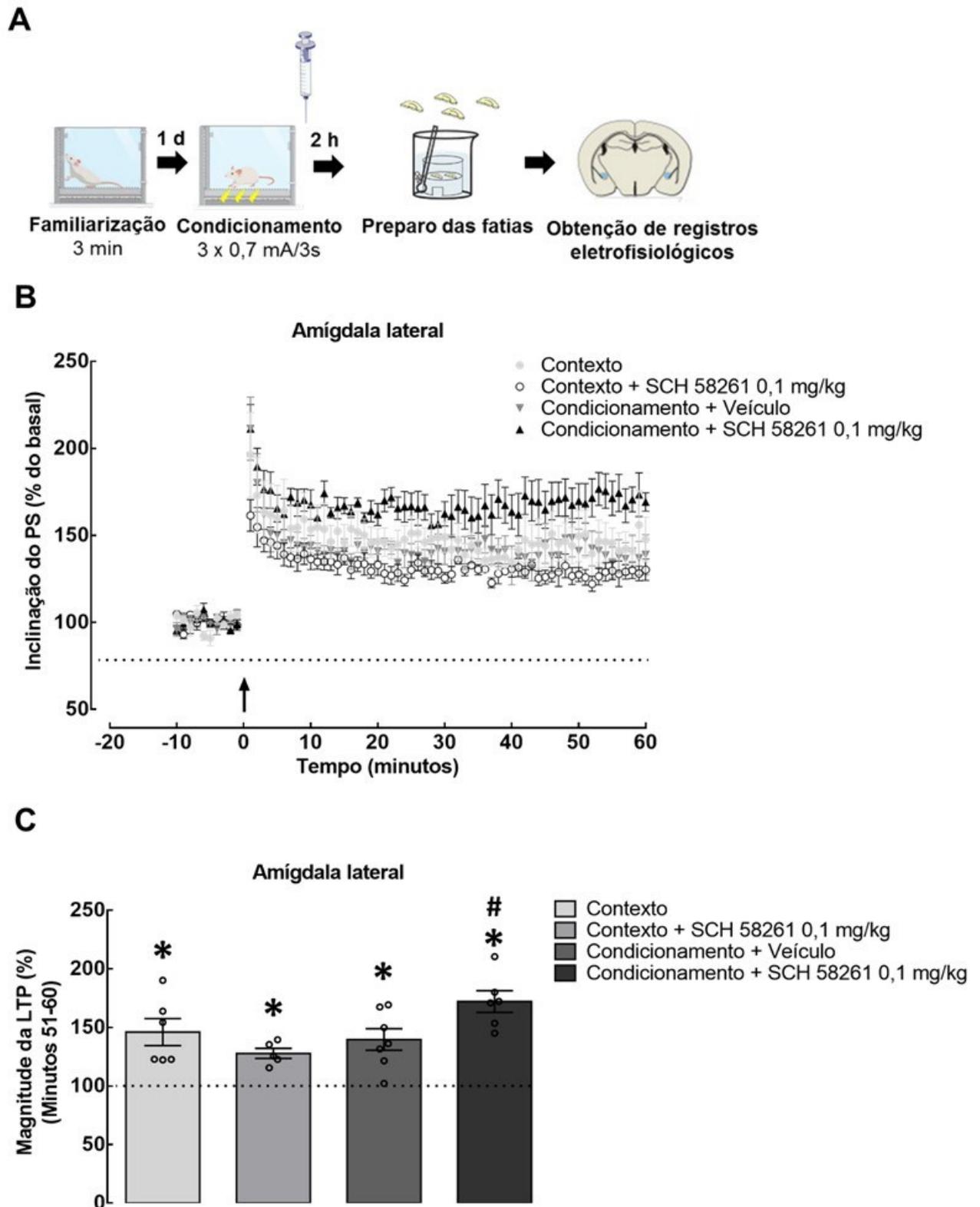


Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Decurso temporal da LTP ao longo de 60 minutos após a aplicação da estimulação de alta frequência, indicada pela seta. Conforme o grupo experimental, os animais receberam uma injeção i.p. de veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) imediatamente após exposição ao contexto ou sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os registros eletrofisiológicos foram obtidos de fatias de hipocampo dorsal coletadas 120 minutos após a exposição ao contexto ou à sessão de condicionamento, assim como após o respectivo tratamento farmacológico. Os valores são expressos como média ± EPM da porcentagem da inclinação do potencial

excitatório pós-sináptico (PEPS) em relação ao basal. (C) Magnitude da LTP após aplicação de estimulação de alta frequência. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem da magnitude da LTP durante os 10 últimos minutos após a estimulação de alta frequência. ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

Ainda, quando analisado o valor médio dos 10 últimos minutos após a aplicação da estimulação de alta frequência em fatias da amígdala lateral, conforme ilustrado na Figura 21, o teste “t” de Student para amostra única demonstrou uma diferença significativa em relação ao valor de 100% para todos os grupos experimentais [Contexto: $t_5 = 4,00$; $P = 0,01$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_4 = 6,44$; $P = 0,0030$; Condicionamento + Veículo: $t_6 = 4,31$, $P = 0,0050$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $t_5 = 7,74$, $P = 0,0006$; Média \pm EPM: Contexto: $146,1 \pm 11,52\%$; Contexto + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $127,8 \pm 4,32\%$; Condicionamento + Veículo: $139,7 \pm 9,21\%$; Condicionamento + SCH 58261 (0,1 mg/kg): $172,1 \pm 9,32\%$]. A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre os grupos em relação ao fator condicionamento ($F_{1, 20} = 4,05$; $P = 0,58$) ou ao fator tratamento ($F_{1, 20} = 0,56$; $P = 0,46$), mas sim na interação entre ambos os fatores ($F_{1, 20} = 7,21$; $P = 0,01$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que o aumento da magnitude da LTP foi maior nos animais condicionados e tratados com o antagonista seletivo do A_{2A}R em relação aos animais não condicionados e que receberam o mesmo tratamento farmacológico ($P = 0,02$), sugerindo uma alteração na plasticidade sináptica nessas condições experimentais.

Figura 21 – O antagonismo sistêmico dos $A_{2A}R$ durante a consolidação da memória aversiva altera a magnitude da potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo ventral.



Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Decurso temporal da LTP ao longo de 60 minutos após a aplicação da estimulação de alta frequência, indicada pela seta. Conforme o grupo experimental, os animais receberam uma injeção i.p. de veículo ou SCH 58261 (0,1 mg/kg) imediatamente após exposição ao contexto ou sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,7 mA) no protocolo de condicionamento

de medo ao contexto. Os registros eletrofisiológicos foram obtidos de fatias de amígdala lateral coletadas 120 minutos após a exposição ao contexto ou à sessão de condicionamento, assim como após o respectivo tratamento farmacológico. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem da inclinação da resposta de pico da população neuronal (PS) em relação ao basal. (C) Magnitude da LTP após aplicação de estimulação de alta frequência. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem da magnitude da LTP durante os 10 últimos minutos após a estimulação de alta frequência. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) do próprio grupo em relação ao valor de 100% (teste “t” de Student para amostra única). # indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo Contexto + SCH 58261 0,1 mg/kg (ANOVA de duas vias seguida de *teste post-hoc* de Newman-Keuls). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

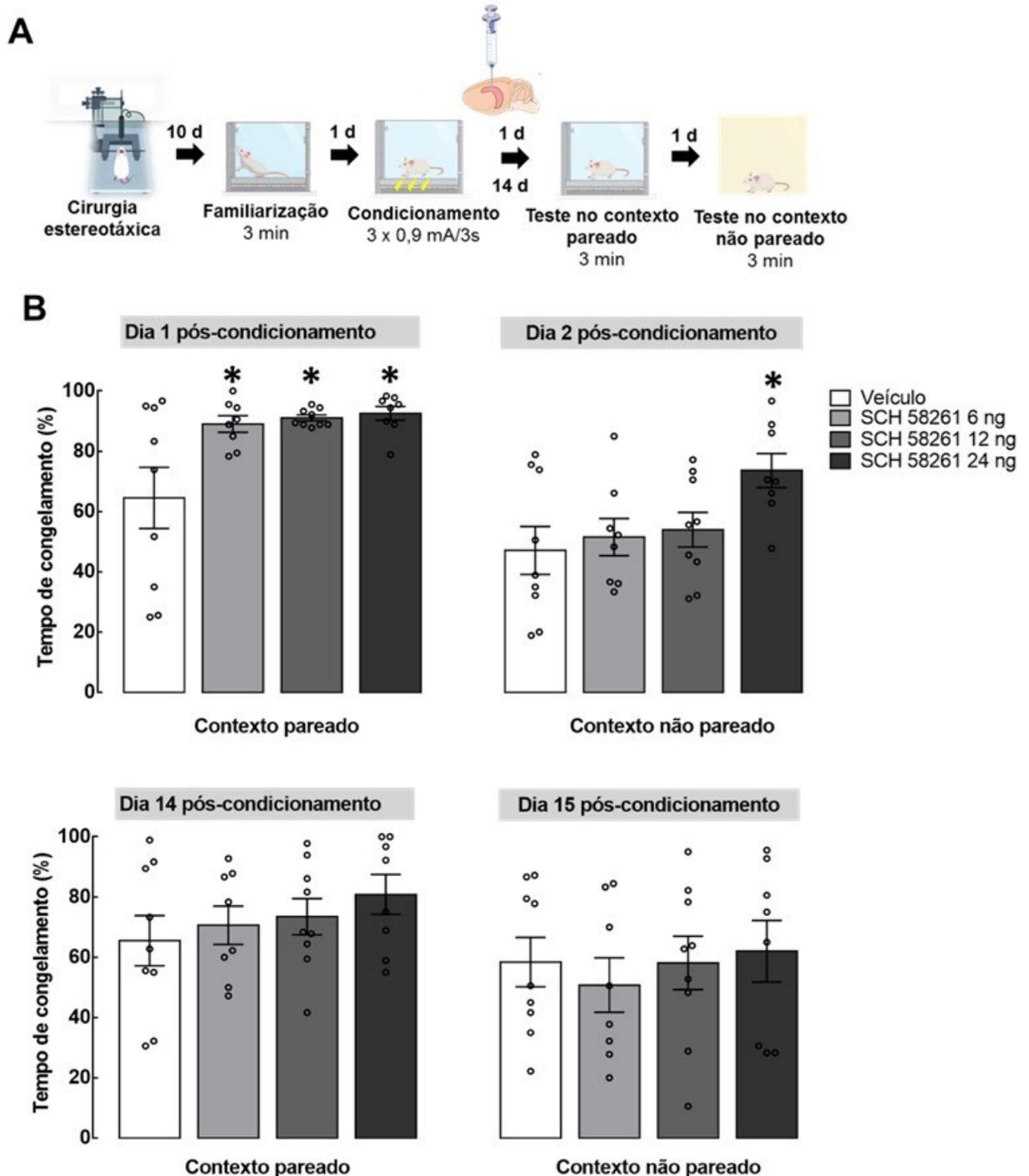
4.13 EXPERIMENTO 13 – O ANTAGONISMO DO A_{2A}R NO HIPOCAMPO DORSAL POTENCIALIZA A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO GENERALIZADA DA RESPOSTA DE MEDO EM UM PROTOCOLO DE INTENSIDADE INTERMEDIÁRIA, MAS NÃO SUSTENTA ESSES EFEITOS AO LONGO DO TEMPO

A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do tratamento durante a sessão de teste no contexto pareado 1 dia após o condicionamento ($F_{3, 30} = 5,68$; $P = 0,0033$). Conforme demonstrado na Figura 22, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que quando reexpostos ao contexto previamente pareado com os choques nas patas, todos os grupos tratados com o antagonista seletivo do A_{2A}R apresentaram valores mais elevados de tempo de congelamento em relação ao grupo tratado com veículo [SCH 58261 (6 ng): $P = 0,009$; SCH 58261 (12 ng): $P = 0,009$; SCH 58261 (24 ng): $P = 0,01$; Média \pm EPM: Veículo: $64,51 \pm 10,15\%$; SCH 58261 (6 ng): $89,03 \pm 2,73\%$; SCH 58261 (12 ng): $91,05 \pm 0,95\%$; SCH 58261 (24 ng): $92,57 \pm 2,30\%$]. Durante a sessão de teste no contexto não pareado 2 dias após o condicionamento, a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento no tempo de congelamento ($F_{3, 30} = 3,13$; $P = 0,04$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que os animais tratados com 24 ng de SCH 58261 apresentaram aumento significativo do tempo de congelamento em relação aos animais tratados com veículo [$P = 0,02$; Média \pm EPM: Veículo: $47,10 \pm 7,92\%$; SCH 58261 (6 ng): $51,53 \pm 6,20\%$; SCH 58261 (12 ng): $53,95 \pm 5,75\%$; SCH 58261 (24 ng): $73,61 \pm 5,64\%$], conforme ilustrado na Figura 22. Em conjunto, esses resultados demonstram que o antagonismo dos A_{2A}R no hipocampo dorsal é suficiente para potencializar a consolidação da memória aversiva e induzir um aumento da expressão generalizada da resposta de medo em um protocolo de condicionamento de intensidade intermediária.

Quando os mesmos animais foram reexpostos ao contexto pareado e não pareado 14 e 15 dias depois, respectivamente, o mesmo padrão de resposta comportamental não foi observado. A ANOVA de uma via não demonstrou efeito significativo do tratamento durante a sessão de teste no contexto pareado [$F_{3, 30} = 0,84$; $P = 0,48$; Média \pm EPM: Veículo: $65,49 \pm$

8,31%; SCH 58261 (6 ng): $70,63 \pm 6,35\%$; SCH 58261 (12 ng): $73,46 \pm 6,00\%$; SCH 58261 (24 ng): $80,83 \pm 6,60\%$], nem durante a sessão de teste no contexto não pareado [$F_{3,30} = 0,26$; $P = 0,86$; Média \pm EPM: Veículo: $58,40 \pm 8,19\%$; SCH 58261 (6 ng): $50,76 \pm 9,01\%$; SCH 58261 (12 ng): $58,09 \pm 8,85\%$; SCH 58261 (24 ng): $62,02 \pm 10,22\%$], conforme ilustrado na Figura 22. Esses resultados demonstram que o antagonismo do A_{2A}R no hipocampo dorsal não é suficiente para sustentar as alterações comportamentais relacionadas manifestadas frente a evocação da memória aversiva ao longo do tempo.

Figura 22 – A administração de SCH 58261 no hipocampo dorsal potencializa a consolidação da memória aversiva e induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo no protocolo de intensidade intermediária de condicionamento de medo ao contexto, mas não sustenta esses efeitos ao longo do tempo.



Legenda: (A) Esquema do desenho experimental utilizado. (B) Veículo ou SCH 58261 (6, 12 ou 24 ng) foram administrados através de cânulas-guia direcionadas para o hipocampo dorsal imediatamente após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária (3 choques de 0,9 mA) no protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de tempo de congelamento mediante exposição às sessões de teste no contexto pareado 1 ou 14 dias após o condicionamento, ou no contexto não pareado 2 ou 15 dias após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). ° representa os indivíduos do respectivo grupo.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos a participação do A_{2A}R na consolidação de uma memória aversiva e a influência desta modulação na posterior expressão generalizada de respostas defensivas condicionadas ao contexto. Os principais resultados obtidos através dos experimentos realizados demonstram que, em ratos Wistar:

i) a administração sistêmica de um antagonista seletivo do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva resulta, nos dias subsequentes, no aumento sustentado do tempo de congelamento nos contextos pareado e novo, sugerindo que tal manipulação farmacológica favorece o armazenamento da memória aversiva condicionada ao contexto e induz um aumento da expressão generalizada de resposta de medo;

ii) a administração sistêmica de um agonista seletivo do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva reduz o tempo de congelamento nos contextos pareado e novo nos dias subsequentes, sugerindo um prejuízo no armazenamento desta memória;

iii) as alterações comportamentais observadas em decorrência da administração sistêmica do antagonista seletivo do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva não dependem da ordem de exposição aos contextos pareado e novo, bem como não estão relacionadas à sensibilização inespecífica das respostas defensivas;

iv) o antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva não resulta em posterior resistência à extinção desta memória, nem altera os níveis de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo;

v) o antagonismo sistêmico do A_{2A}R durante a consolidação da memória aversiva prejudica a facilitação da liberação de neurotransmissores induzida pela estimulação de pulso pareado em fatias de amígdala lateral, mas não em fatias das porções dorsal ou ventral do hipocampo;

vi) em fatias de hipocampo dorsal, o protocolo de condicionamento *per se* induz um prejuízo na LTP, sendo esse efeito revertido pelo antagonismo sistêmico do A_{2A}R;

vii) durante a consolidação da memória aversiva, o antagonismo do A_{2A}R apenas no hipocampo dorsal também induz o aumento sustentado do tempo de congelamento nos contextos pareado e novo nos dias subsequentes, ou seja, é suficiente para favorecer o armazenamento da memória aversiva condicionada ao contexto e induzir um aumento da expressão generalizada de resposta de medo.

Estes achados vão ao encontro a outros estudos que investigaram o papel da adenosina e do A_{2A}R na modulação de diferentes tipos de memórias aversivas de caráter associativo.

Winsky e Harvey (1986) demonstraram que a injeção de 5 $\mu\text{mol/kg}$ de N6-(L- fenilisopropil) adenosina (L-PIA), um análogo da adenosina, 15 minutos antes da exposição de coelhos em uma sessão de condicionamento aversivo, reduz significativamente a manifestação de respostas condicionadas após a apresentação do som ou da luz previamente emparelhados com o estímulo não-condicionado (um choque na pele sobre a região paraorbital da cabeça). Além disso, os efeitos comportamentais resultantes da administração de 5 $\mu\text{mol/kg}$ de L-PIA em coelhos foram completamente antagonizados pela administração prévia dos antagonistas não seletivos teofilina (200 $\mu\text{mol/kg}$) e cafeína (300 $\mu\text{mol/kg}$), sugerindo o envolvimento direto dos receptores adenosinérgicos (WINSKY; HARVEY, 1987). Em concordância com esses resultados, uma única administração de L-PIA (0,01 mg/kg) ou propentofilina (3 mg/kg) (um inibidor da captação de adenosina) em camundongos imediatamente antes da sessão de condicionamento aversivo também reduziu significativamente o comportamento de esquiva em um protocolo de esquiva inibitória do tipo claro-escuro (HARAGUCHI; KURIBARA, 1991). Em conjunto, esses resultados foram os primeiros a sugerir que a ativação dos receptores adenosinérgicos acarreta na redução de respostas comportamentais condicionadas a estímulos aversivos em diferentes espécies, provavelmente através da interferência na aquisição e/ou consolidação das memórias aversivas associativas.

Ao longo das últimas décadas, a cafeína (antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgicos A_1 e A_{2A}) vem sendo empregada como ferramenta farmacológica em diferentes protocolos de condicionamento aversivo, em trabalhos que buscam comprovar a participação dos receptores adenosinérgicos nas diferentes fases de processamento de memórias aversivas associativas. Já foi demonstrado que administração de cafeína influencia a aquisição e a consolidação de memórias aversivas associativas de maneira dependente da dose. Enquanto baixas doses de cafeína (1 e 2 mg/kg, i.p.) administradas em ratos 45 minutos antes da sessão de condicionamento não interferiram com a retenção da memória aversiva em uma tarefa de esquiva inibitória, uma dose alta (20 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o comportamento de esquiva em uma sessão de teste realizada 24 horas depois, sugerindo um comprometimento da aquisição ou consolidação desta memória (DALL'OLIO et al., 1978). Posteriormente, efeitos semelhantes foram descritos em tarefas de condicionamento de esquiva em camundongos e ratos, onde a administração i.p. de cafeína (10, 20 ou 120 mg/kg) 15 ou 30 minutos antes da sessão de condicionamento acarretou em um prejuízo na retenção da memória aversiva associativa (SHEN et al., 1990; SANSONE; BATTAGLIA; CASTELLANO, 1994; SANDAY et al., 2013). Em concordância com estes estudos, também foi demonstrado que a administração i.p. de cafeína (10, 20 ou 30 mg/kg) 15 minutos antes da sessão de condicionamento auditivo

prejudica a retenção da memória aversiva associativa em ratos, observada através da diminuição da resposta de congelamento frente exposição ao contexto ou ao som 24 ou 48 horas mais tarde, respectivamente (CORODIMAS et al., 2000).

Adicionalmente, alguns trabalhos já demonstraram que o antagonismo dos receptores adenosinérgicos pela cafeína parece influenciar de maneira distinta a aquisição e a consolidação de memórias aversivas associativas em roedores, já que efeitos comportamentais opostos têm sido observados quando esta droga é administrada antes ou depois da sessão de condicionamento. Cestari e Castellano (1996) demonstraram que doses baixas de cafeína (0,25, 0,5 e 1 mg/kg) administradas por via i.p. imediatamente após a sessão de condicionamento em um protocolo de esquiva inibitória do tipo claro-escuro facilita a consolidação da memória aversiva em camundongos, conforme observado através do aumento do tempo de latência para entrada no compartimento escuro (previamente associado com choques nas patas) na sessão de teste realizada 24 horas mais tarde (CESTARI; CASTELLANO, 1996).

Corroborando esses achados, já foi demonstrado que a administração i.p. de diferentes doses de cafeína (entre 1 a 100 mg/kg) 30 minutos antes da sessão de condicionamento em um protocolo de tarefa de condicionamento de esquiva inibitória diminui a retenção da memória aversiva associativa em camundongos, enquanto a administração imediatamente após o condicionamento ou 30 minutos antes do teste realizado 48 horas mais tarde aumenta a retenção da memória aversiva associativa (ANGELUCCI et al., 1999). Ainda, em protocolos de medo condicionado ao som ou ao contexto, a administração i.p. de cafeína (30 mg/kg) em camundongos 10 minutos antes da sessão de condicionamento resultou em uma posterior redução significativa da resposta de congelamento na sessão de teste, sugerindo o prejuízo na retenção da memória aversiva neste tipo de protocolo (DUBROQUA et al., 2015).

Em ratos, a administração i.p. de cafeína (0,3 mg/kg) imediatamente após a sessão de condicionamento em um protocolo de esquiva inibitória, mas não 180 minutos depois, facilitou a retenção de memória aversiva e promoveu o aumento da latência para descer da plataforma quando os animais foram expostos à sessão de teste 24 horas depois (KOPF et al., 1999). Por outro lado, a administração crônica de cafeína (solução de 1 mg/mL disponibilizada na caixa-moradia por 30 dias) aparentemente não interfere na retenção da memória de curto ou longo prazo em ratos jovens (3 meses de idade), mas reverte o prejuízo cognitivo observado em ratos de meia idade (12 meses), conforme demonstrado em um protocolo de esquiva inibitória (SALLABERRY et al., 2013). Em conjunto, esses resultados demonstram que a administração aguda de cafeína influencia de maneira oposta e dose-dependente a aquisição e a consolidação de memórias aversivas associativas, sugerindo uma dinâmica temporal complexa do

recrutamento dos receptores adenosinérgicos, e evidenciando a necessidade de um melhor entendimento acerca da participação de subtipos específicos de receptores adenosinérgicos em momentos distintos do processamento de memórias aversivas associativas.

Nesse sentido, através da utilização de agonistas e antagonistas mais seletivos, muitos estudos investigaram os efeitos dos receptores adenosinérgicos A_1 (A_1R) na manutenção de memórias aversivas associativas (NORMILE; BARRACO, 1991; NORMILE et al., 1994; ZARRINDAST; SHAFAGHI, 1994; CORODIMAS; TOMITA, 2001; TABATA et al., 2001; PEREIRA et al., 2002). Normile e Barraco (1991) avaliaram os efeitos da administração de N6-ciclopentiladenosina (CPA), um agonista seletivo dos A_1R , em ratos submetidos a um protocolo de supressão condicionada. Nesse protocolo, ratos sob retenção hídrica são condicionados a associar o ato de lambem o bebedouro de água com choques nas patas, de forma a suprimir essa resposta. A retenção da memória aversiva associativa foi medida como a supressão do consumo de água (latência para beber) em uma sessão de teste 48 h após o condicionamento. A administração i.p. de 0,15 a 2,25 $\mu\text{mol/kg}$ de CPA 30 minutos antes do condicionamento reduziu a latência da resposta, ou seja, reduziu a retenção da memória aversiva. Ainda, o efeito do CPA na retenção da memória foi bloqueado pelo pré-tratamento pela via i.p. com o antagonista seletivo dos A_1R , 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX; 15 $\mu\text{mol/kg}$), enquanto que a administração do DPCPX por si só não teve efeito no desempenho da retenção (NORMILE; BARRACO, 1991).

A administração i.p. de CPA (0,8 ou 1,6 mg/kg) 30 minutos antes do condicionamento na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA também se mostrou capaz de reduzir a resposta de latência para descida da plataforma no teste de retenção realizado 24 horas depois. A administração i.p. prévia de DPCPX (3 mg/kg) preveniu o efeito do CPA (TABATA et al., 2001). Além disso, a ativação dos A_1R por CPA (1mg/kg) 30 minutos antes do condicionamento aversivo ao contexto reduziu significativamente a resposta de congelamento em ratos (CORODIMAS; TOMITA, 2001). Considerando esses achados, tem sido aceito que a ativação dos A_1R prejudica a aquisição e, conseqüentemente, a retenção de memórias aversivas associativas, enquanto que o antagonismo seletivo deste receptor *per se*, ao menos com a droga e dose testadas, não promove nenhum efeito significativo.

Em contraste com os dados citados anteriormente, Kopf e colaboradores (1999) demonstraram que o bloqueio farmacológico da dos A_1R em camundongos através da administração i.p. do antagonista seletivo DPCPX nas doses de 0,1, 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg, imediatamente ou 180 minutos após a sessão de condicionamento, não afetou a consolidação da memória aversiva associativa em um protocolo de esQUIVA INIBITÓRIA. Enquanto isso, foi

demonstrado no mesmo estudo que a administração i.p. de 0,3 mg/kg de cafeína ou de 0,3 mg/kg de SCH 58261 (antagonista seletivo do A_{2A}R) imediatamente mas não 180 minutos após o condicionamento, aumentou a expressão da resposta condicionada avaliada 24 horas mais tarde, ou seja, facilitou a consolidação da memória aversiva (KOPF et al., 1999). Assim, esses dados sugeriam que o A_{2A}R, mas não os A₁R, estaria envolvido na consolidação de memória aversivas associativas.

Em relação ao efeito da manipulação seletiva do A_{2A}R na aquisição e consolidação de memórias aversivas associativas, existem poucos estudos e os resultados ainda são um tanto controversos. Já foi demonstrado que a ativação farmacológica do A_{2A}R em camundongos 30 minutos antes da sessão de condicionamento através da injeção i.p. do agonista seletivo CV-1808 (0,25, 0,5, 1 ou 2 mg/kg) prejudicou a aquisição da memória em um protocolo de esquiva inibitória do tipo claro-escuro, mas não promoveu efeitos significativos quando realizada imediatamente após a aquisição ou 30 minutos antes da sessão de retenção realizada 24 horas mais tarde (KIM; RYU, 2008). Adicionalmente, a administração i.p. de 0,1 mg/kg de outro agonista seletivo do A_{2A}R (CGS 21680), 60 minutos antes da sessão de condicionamento, prejudicou a aquisição da memória aversiva em um protocolo de esquiva inibitória, efeito prevenido pela administração prévia de 0,5 mg/kg do antagonista seletivo do A_{2A}R SCH 58261 (PAGNUSSAT et al., 2015). Dessa forma, em oposição ao demonstrado por Kopf e colaboradores (1999), esses dados sugeriam que a ativação farmacológica do A_{2A}R prejudica a aquisição, mas não a consolidação de memórias aversivas nas condições experimentais testadas.

Curiosamente, o papel do A_{2A}R na consolidação de memórias aversivas associativas permaneceu pouco explorado ao longo das últimas duas décadas. Recentemente, Wei e colaboradores (2014) demonstraram que o A_{2A}R localizados no estriado ou em outras regiões encefálicas poderiam exercer um papel oposto sobre a formação de memórias aversivas, o que poderia justificar as inconsistências observadas nos estudos que utilizaram a manipulação farmacológica sistêmica deste receptor. Através da utilização de protocolos de medo condicionado ao som e camundongos com nocaute do gene ADORA2A (responsável pela expressão do A_{2A}R), eles relataram que enquanto a redução da expressão do A_{2A}R apenas no estriado resultava em um aumento da resposta de congelamento nas sessões de teste, os animais com a expressão do A_{2A}R reduzida em todo o encéfalo apresentavam uma diminuição significativa desta resposta condicionada. Assim, a ativação seletiva do A_{2A}R estriatais prejudicou, enquanto a ativação do A_{2A}R extraestriatais facilitou a retenção da memória aversiva condicionada ao som (Wei et al., 2014). Entretanto, devido à utilização de camundongos nocaute do gene ADORA2A, através deste trabalho não foi possível elucidar se

os efeitos sobre a retenção da memória resultam de uma interferência na aquisição ou consolidação da memória aversiva associativa, ou ainda em ambas as fases.

Mais recentemente, Simões e colaboradores (2016) demonstraram o envolvimento do A_{2A}R da amígdala na retenção de uma memória de medo condicionada ao som. Neste trabalho, foi observado que a administração i.p. repetida de cafeína ou de SCH 58261 durante 10 dias, bem como a supressão da expressão do A_{2A}R da amígdala através da utilização de vetores lentivirais, promovem uma redução significativa tanto da resposta de congelamento quanto da plasticidade sináptica (LTP) na amígdala lateral. Embora já esteja bem estabelecido na literatura que a amígdala lateral é uma estrutura encefálica de grande importância para a consolidação de memórias aversivas associativas (GROSSO et al., 2018), as ferramentas experimentais utilizadas para reduzir a ativação dos A_{2A}R neste trabalho não permitem afirmar, de fato, o envolvimento do A_{2A}R da amígdala na consolidação de uma memória de medo condicionada ao som, uma vez que não foram aplicadas unicamente após a sessão de condicionamento.

Em resumo, embora até o presente momento existissem evidências apontando para a participação da adenosina na consolidação de memórias de caráter emocional aversivo, bem como para o envolvimento da ativação do A_{2A}R neste efeito, as variações nos protocolos utilizados dificultam a compreensão da real influência dessa via de neuromodulação no processamento de memórias de medo. Além do momento em que foram realizadas as manipulações na atividade do A_{2A}R (antes ou depois da sessão de condicionamento), sabe-se que mecanismos e regiões encefálicas distintos podem ser recrutados para a consolidação de uma memória aversiva em diferentes protocolos de condicionamento (como condicionamento ao contexto, ao som, esquiva inibitória passiva ou ativa, entre outros) (ADOLPHS, 2013).

Além disso, a intensidade do protocolo de condicionamento pode influenciar de maneira significativa no padrão de respostas comportamentais e alterações bioquímicas observadas, muitas vezes inviabilizando a comparação entre resultados (BALDI; LORENZINI; BUCHERELLI, 2004; MALDONADO; MARTIJENA; MOLINA, 2011). Adicionalmente, em relação à formação de memórias aversivas ditas como “disfuncionais”, possivelmente os mecanismos neurobiológicos subjacentes não sejam análogos aos de uma memória aversiva “normal” ou “adaptativa”, visto que apenas uma parcela dos indivíduos expostos a eventos traumáticos de grande severidade manifesta respostas condicionadas de maneira exacerbada (DESMEDT; MARIGHETTO; PIAZZA, 2015). Nesse contexto, já foram sugeridos critérios que deveriam ser levados em consideração para que um modelo animal permitisse a investigação dos mecanismos envolvidos na modulação de memórias aversivas traumáticas, como aquelas relacionadas ao TEPT em humanos, sendo que dentre eles destacam-se a

capacidade do agente estressor induzir respostas biológicas e comportamentais relacionadas ao TEPT, de maneira intensidade-dependente e persistente ao longo do tempo, e que apresenem variabilidade individual (YEHUDA; ANTELMAN, 1993; WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014).

Assim, a partir destes resultados obtidos no presente trabalho demonstramos que a ativação sistêmica do $A_{2A}R$ durante a consolidação de uma memória aversiva condicionada ao contexto é um dos eventos moleculares envolvidos na manutenção da intensidade e especificidade com que esta memória será armazenada, e que o bloqueio farmacológico deste receptor leva à consolidação de uma memória aversiva robusta e de maior relevância emocional. A administração do SCH 58261 (antagonista seletivo do $A_{2A}R$) na dose de 0,1 mg/kg por via i.p., imediatamente após a sessão de condicionamento de um protocolo de intensidade fraca, induziu aumento da resposta comportamental de congelamento quando os animais foram reexpostos ao contexto pareado um dia depois. Quando o mesmo antagonista foi administrado imediatamente após a sessão de condicionamento de um protocolo de intensidade intermediária (na mesma dose e via de administração), por sua vez, observamos aumento da expressão generalizada da resposta de congelamento. Por outro lado, após a administração por via i.p. de 0,2 mg/kg de CGS 21680 (agonista seletivo do $A_{2A}R$) imediatamente após a sessão de condicionamento foram observados efeitos opostos. A administração do agonista após a sessão de condicionamento no protocolo de intensidade intermediária reduziu de maneira significativa a resposta de congelamento frente reexposição ao contexto pareado um dia depois, enquanto que a administração após a sessão de condicionamento no protocolo de intensidade forte reduziu também a expressão generalizada da resposta de congelamento no contexto novo.

A resposta de congelamento é um parâmetro comportamental utilizado para avaliar o grau de aversividade que os animais atribuem aos contextos pareado e novo após protocolos de condicionamento de medo ao contexto. Conforme já descrito na anteriormente (BALDI; LORENZINI; BUCHERELLI, 2004; MALDONADO; MARTIJENA; MOLINA, 2011), as diferenças na intensidade, número, duração e intervalo dos estímulos aversivos utilizados nestes protocolos, influenciam na relevância, duração e especificidade da memória associada a este evento. Protocolos de intensidade fraca resultam na manifestação de baixos níveis de resposta de congelamento quando os animais são reexpostos ao contexto pareado ou expostos a um contexto novo, e são úteis quando se busca avaliar o efeito facilitatório de uma estratégia comportamental ou farmacológica sobre a formação de uma memória aversiva. Por outro lado, protocolos de intensidade intermediária a forte resultam na manifestação de níveis máximos (teto) da resposta de congelamento quando os animais são reexpostos ao contexto pareado, bem

como podem desencadear (*per se* ou após manipulações comportamentais ou farmacológicas) aumento da resposta de congelamento quando os animais são expostos a um contexto novo, ou seja, induzir a expressão generalizada de medo (GAZARINI et al., 2013; 2014).

Dessa forma, indo ao encontro às evidências que sugerem a ativação endógena do A_{2A}R frente estimulação neuronal de alta frequência (PINTO-DUARTE et al., 2005; CUNHA, 2008), os resultados comportamentais observados no presente trabalho sugerem que a ativação do A_{2A}R pode ser um dos mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação da relevância emocional atribuída a uma memória aversiva durante a sua consolidação, bem como corroboram resultados de estudos prévios que demonstram a relação entre a potencialização da consolidação de uma memória aversiva com a posterior generalização da expressão de respostas de medo condicionado (BALDI; LORENZINI; BUCHERELLI, 2004; BUSTOS et al., 2010). Além disso, os resultados do presente estudo vão ao encontro do proposto por Li e colaboradores, que observaram um prejuízo na memória de reconhecimento espacial após aumento da sinalização intracelular dependente da ativação do A_{2A}R (LI et al., 2015).

Nestes estudos realizados em roedores, a indução farmacológica de hiperatividade adrenérgica ou aumento dos níveis de corticosterona durante a consolidação de memórias aversiva (como observado frente exposição situações estressoras) levou à expressão de níveis máximos de congelamento no contexto pareado e aumento da expressão generalizada de comportamento de medo no contexto não-pareado (KAOUANE et al., 2012; GAZARINI et al., 2014), sugerindo que é necessário um reforço do aprendizado para a indução dessa característica comportamental. Sendo assim, nossos resultados demonstram pela primeira vez na literatura a relação entre a modulação farmacológica do A_{2A}R, a potencialização da consolidação de uma memória aversiva condicionada ao contexto e o aumento da expressão generalizada de respostas de medo.

Outro ponto relevante é a dinâmica temporal em que ocorre a consolidação de memórias aversivas, bem como a sua influência na generalização do medo, que também tem sido alvo de investigação nas últimas décadas. Achados experimentais demonstraram que a apresentação de agentes interferentes logo após o aprendizado prejudicava a formação de uma memória, enquanto a apresentação tardia do mesmo tratamento era ineficaz. Assim, foi introduzida na literatura científica a ideia de que a estabilização de uma nova informação e o seu armazenamento como uma memória de longa duração estaria restrita a um período de poucas horas após a aquisição, e que não excedia um máximo de 6 horas (DUDAI, 2004). Entretanto, trabalhos mais recentes vêm demonstrando que a janela temporal necessária para a consolidação das memórias é muito variável e pode, sim, diferir desse período de 6 horas após

a aquisição, o que depende diretamente das condições experimentais. Por exemplo, existem trabalhos demonstrando que ondas de síntese proteica tardias (12 horas após a aquisição, por exemplo) estão relacionadas com a persistência das memórias, sendo que quando interferentes são administrados durante esse período, nenhum efeito a nível comportamental é observado quando a memória é evocada 1 dia após o condicionamento, mas sim quando é evocada depois de 7 dias (NAKAYAMA et al., 2015).

Por outro lado, Casagrande e colaboradores (2018) demonstraram recentemente que tanto o aumento da intensidade dos choques quanto a pré-exposição ao contexto a ser pareado aceleram a janela de consolidação, e sugeriram que este seria um possível mecanismo adaptativo para garantir o armazenamento rápido de informações relevantes (CASAGRANDE et al., 2018). Não existem evidências se, ao ocorrer uma aceleração da consolidação em protocolos de maior intensidade, as ondas de síntese proteica tardias ocorreriam em um período inferior a 12 horas após a aquisição. No que diz respeito à generalização do medo, Pedraza e colaboradores (2016) demonstraram recentemente que protocolos de maior intensidade aceleram o processo de consolidação sistêmica (a memória torna-se menos dependente do hipocampo e mais dependente de regiões corticais, tornando-se menos específica) e a manifestação da expressão generalizada do medo, sendo esses efeitos mediados pelo aumento da liberação de glicocorticoides (PEDRAZA et al., 2016).

Neste trabalho, a administração i.p. de SCH 58261 (0,1 mg/kg) nos intervalos de 3 ou 6 horas após uma sessão de condicionamento de intensidade intermediária também foi capaz de induzir um aumento no tempo de congelamento quando os animais foram expostos ao contexto não pareado 2 dias depois (PEDRAZA et al., 2016). Este resultado sugere que nas condições experimentais e no protocolo testado, não é observada uma aceleração da consolidação da memória aversiva, e que o bloqueio farmacológico do A_{2A}R mesmo em momentos mais tardios da janela de consolidação induz o aumento da expressão generalizada da resposta de medo. Contudo, esse resultado também levanta o questionamento se o antagonista seletivo do A_{2A}R poderia induzir um quadro de sensibilização ao invés de potencializar a consolidação da memória aversiva e, por isso, independente do momento de sua administração ainda seria capaz de induzir o aumento da expressão generalizada da resposta de medo

De maneira importante, os resultados deste trabalho também descartam que o aumento da expressão generalizada da resposta de congelamento seja reflexo de um efeito ansiogênico do antagonista utilizado. Demonstramos, através da utilização do protocolo de condicionamento de choque imediato, que o SCH 58261 não atua como um estímulo

incondicionado, e que seu efeito na indução de generalização do medo necessita do pareamento com os choques nas patas. Em protocolos de déficit por choque imediato, os animais não são pré-expostos ao contexto a ser pareado e receberam o primeiro choque nas patas imediatamente quando expostos ao contexto na sessão de condicionamento. Nesse caso, a memória associativa do evento aversivo não é formada, visto que o choque é apresentado de maneira tão abrupta que não permite ao animal associá-lo com o contexto. Sendo assim, um possível aumento no tempo de congelamento observado posteriormente seria inespecífico e não relacionado com a potencialização da consolidação da memória aversiva (LANDEIRA-FERNANDEZ et al., 2006). Logo, uma vez que a administração i.p. de SCH 58261 imediatamente após a sessão de condicionamento nesse tipo de protocolo não induziu um aumento no tempo de congelamento dos animais quando expostos aos contextos pareado ou não pareado, sugerimos que o bloqueio farmacológico do A_{2A}R aumenta a expressão generalizada do comportamento de medo por modular a consolidação da memória aversiva associativa e não através da indução de um quadro de sensibilização. Além disso, quando invertemos a ordem de exposição às sessões de teste nos contextos pareado e novo continuamos observando o aumento da expressão generalizada da resposta de congelamento, descartando que essa resposta resulte do reforço da memória aversiva através de processo de reconsolidação (DUDAI, 2012).

De maneira adicional, dados da literatura que sugerem que a ativação, e não o bloqueio do A_{2A}R, estaria relacionada à manifestação de comportamentos do tipo ansioso e depressivo (COELHO et al., 2014; CALKER et al., 2019). Ainda, alguns estudos que investigaram as características farmacocinética do SCH 58261 demonstraram que essa droga é rapidamente metabolizada e permanece disponível por poucos minutos no SNC (ONGINI, 1997; YACOUBI et al., 2001; YANG et al., 2007). Assim, uma vez que em nossos resultados a expressão generalizada da resposta de congelamento foi observada 24 ou 48 horas após o bloqueio do A_{2A}R, reforçamos a hipótese de que tal resposta comportamental está relacionada com a memória aversiva previamente formada ao invés de estar relacionada a um estado de ansiedade generalizada.

Diversos estudos com roedores e humanos também vêm demonstrando que memórias aversivas cuja consolidação é reforçada por protocolos de estresse ou indução farmacológica que levam à generalização também apresentam um prejuízo de extinção (DEBIEC; BUSH; LEDOUX, 2011; KINDT, 2013; GAZARINI et al., 2014; SOETER; VANVOSSSEN et al., 2017). A extinção é uma abordagem comportamental amplamente utilizada com o intuito de minimizar o impacto negativo das memórias traumáticas, e caracteriza-se pela apresentação repetida e/ou prolongada do estímulo condicionado (como o contexto) na ausência do estímulo

incondicionado (choques nas patas). Através desta apresentação, a resposta comportamental relacionada ao pareamento entre esses estímulos diminui gradualmente, uma vez que estímulo condicionado não mais prediz o estímulo incondicionado (VAN ELZAKKER et al., 2014). Entretanto, após a extinção da memória aversiva, a memória original não é apagada, mas sim suprimida temporariamente pela consolidação de uma nova memória associativa, de maneira que em memórias aversivas de grande significância emocional, a memória de extinção (que possui relevância e retenção muito menores) não seja capaz de suprimir a memória original (ORSINI, MAREN, 2012).

Neste trabalho, a potencialização da memória induzida pela administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) não prejudicou a aquisição ou a consolidação da memória de extinção. Ambos os grupos apresentaram uma redução significativa da resposta de congelamento ao longo da sessão de extinção, e apresentaram níveis semelhantes da resposta condicionada durante a sessão de teste no contexto pareado realizada um dia depois. Ainda, a redução da resposta condicionada no contexto pareado impediu o aumento da expressão generalizada de respostas de medo, reforçando a necessidade de um reforço do aprendizado para a indução dessa característica comportamental. Entretanto, vale destacar que embora o protocolo utilizado tenha acarretado em uma redução notável do tempo de congelamento durante a sessão de extinção, tal redução não se manteve de forma tão robusta no dia seguinte. Assim, o aumento do tempo da sessão de extinção, ou o aumento do número de sessões de extinção, poderiam ser estratégias interessantes para maximizar a extinção da memória aversiva potencializada pela administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg). Ainda, é importante destacar que embora nossos resultados indiquem que o antagonismo do A_{2A}R potencializa a consolidação de uma memória aversiva condicionada ao contexto, seu efeito sobre a consolidação de uma memória de extinção (manipulação farmacológica do receptor após a sessão de extinção) ainda precisa ser estudado, pois embora sejam processos semelhantes e que recrutam vias bioquímicas comuns, já existem evidências demonstrando muitas diferenças em relação a estes dois eventos (SANTINI; QUIRK; PORTER, 2008; ORSINI, MAREN, 2012; FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014; GIUSTINO; MAREN, 2018).

Visando entender os mecanismos através dos quais a modulação farmacológica do A_{2A}R potencializa a consolidação de uma memória aversiva condicionada ao contexto e resulta no posterior aumento da expressão generalizada de respostas de medo, foi investigado o perfil de expressão destes receptores durante a janela de consolidação no protocolo de intensidade intermediária utilizado no presente trabalho. A síntese de proteínas (incluindo receptores, fatores de transcrição, proteínas efetoras, fatores neurotróficos, entre outros) através da tradução

de RNA mensageiro é crucial para a plasticidade sináptica envolvida na consolidação de memórias aversivas, pois resulta na regulação positiva ou negativa da transcrição de diversos genes. Este processo ocorre de maneira mais pronunciada imediatamente após o aprendizado, embora ondas de síntese proteica também ocorram 3, 6 e 24 horas após o condicionamento, podendo ficar restrito a populações celulares específicas (DAVIS; SQUIRE, 1984; SUTTON; SCHUMAN, 2006; MYIASHITA et al., 2008; BEKINSCHTEIN et al., 2010). Embora existam trabalhos em roedores demonstrando o aumento da expressão de A_{2A}R em situações de estresse (CUNHA et al., 2006; BATALHA et al., 2012; KASTER et al., 2015), no tempo de 2 horas após a sessão de condicionamento, e com o número amostral utilizado, não observamos qualquer diferença significativa na expressão do A_{2A}R em sinapses de neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos nas regiões dorsal e ventral do hipocampo, bem como do córtex pré-frontal. Posteriormente, o aumento do número experimental, a avaliação em outros experimentais e/ou a utilização de outras metodologias (como ensaio de ligação) poderão confirmar a ocorrência ou não de uma alteração quantitativa do A_{2A}R. Independente disto, de acordo com nossa hipótese de que a ativação dos A_{2A}R (mediante estimulação de alta frequência) pode ser um dos mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação da relevância emocional atribuída a uma memória aversiva durante a sua consolidação, uma alteração quantitativa do A_{2A}R não seria obrigatoriamente necessária para justificar as alterações comportamentais observadas.

Além de uma diferença quantitativa na expressão do A_{2A}R, é importante explorar os mecanismos moleculares (ou alterações funcionais) relacionados com a potencialização da consolidação da memória aversiva e a expressão generalizada de comportamentos de medo observadas após o bloqueio farmacológico do A_{2A}R, uma vez que este receptor interage com vias de sinalização distintas em diferentes regiões cerebrais envolvidas no processamento cognitivo.

Uma das interações mais bem descritas é com a via do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e seu receptor do tipo tirosina quinase, o TrkB. O BDNF é uma proteína membro da família das neurotrofinas que controla a expressão de genes relacionados com a sobrevivência neuronal, diferenciação de novos neurônios e regulação de eventos de morte celular. Além disso, o BDNF também exerce ações importantes sobre a plasticidade sináptica, favorecendo a transmissão sináptica através do aumento da liberação de neurotransmissores, aumento da expressão e da condutância de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA e NMDA, favorecimento da formação de espinhas dendríticas e expressão de genes relacionados com a plasticidade sináptica (PANJA; BRAMHAM, 2014). Lee e Chao

demonstraram em 2001, utilizando células PC12 e métodos de imunoprecipitação e imunoblotting, que tanto a adenosina quanto o agonista seletivo do A_{2A}R, CGS 21680, induzem a fosforilação do receptor TrkB, e que esse efeito é revertido pela coadministração de um antagonista deste receptor (LEE; CHAO, 2001). Posteriormente, Diógenes e colaboradores foram os primeiros a demonstrar, utilizando fatias de hipocampo de ratos, que o efeito do BDNF em potencializar a LTP era perdido na presença de um antagonista do A_{2A}R (DIÓGENES et al., 2004). Em 2014, o mesmo grupo demonstrou a fosforilação e transativação do receptor TrkB em cultura de neurônios corticais mediante ativação do A_{2A}R (ASSAIFE-LOPES et al., 2014). Ademais, o A_{2A}R parece estar envolvido na modulação dos níveis de BDNF, já tendo sido demonstrado uma diminuição dos níveis basais de BDNF no hipocampo de camundongos com deleção genética deste receptor (TEBANO et al., 2008). Wei e colaboradores demonstraram que os animais com deleção genética do receptor A_{2A}R em todo o encéfalo apresentam uma diminuição do tempo de congelamento e prejuízo da formação da memória aversiva devido a diminuição da sinalização via BDNF-TrkB no hipocampo (WEI et al., 2014).

Apesar de todas estas evidências demonstrando a interação entre o A_{2A}R, BDNF e receptor TrkB, assim como o papel bem estabelecido do BDNF na consolidação de memórias aversivas e expressão generalizada de comportamentos de medo (NOTARAS; VAN DEN BUUSE, 2020), no presente trabalho não observamos nenhuma diferença significativa nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal ou hipocampo 2 horas após a sessão de condicionamento de intensidade intermediária ou forte, bem como 2 horas após a administração sistêmica de SCH 58261 (0,1 mg/kg) ou CGS 21680 (0,2 mg/kg). Entretanto, apesar de haverem estudos demonstrando que esse tempo seria suficiente para observar uma alteração dos níveis de BDNF, outros estudos sugerem a participação do BDNF apenas em fases mais tardias da consolidação de memórias aversivas (BEKINSCHTEIN et al., 2008), assim como a metodologia utilizada não nos permitiu distinguir entre BDNF e as formas pré-pró-BDNF ou pró-BDNF desta neurotrofina, que possuem efeitos biológicos distintos (KOWIAŃSKI et al., 2018). Desse modo, uma investigação mais detalhada deverá ser realizada para avaliar se a potencialização da consolidação da memória aversiva e a expressão generalizada de comportamentos de medo observadas após o bloqueio farmacológico do A_{2A}R estão relacionados com uma modulação negativamente na síntese e liberação de BDNF e/ou ativação de receptores TrkB.

O A_{2A}R também interage de diferentes maneiras com o sistema glutamatérgico que, como já bem descrito na literatura científica, é de extrema importância para a transmissão sináptica, LTP e processos de aprendizado e memória (NICOLL, 2017). Atualmente, já existem diversos trabalhos demonstrando a presença do A_{2A}R em sinapses glutamatérgicas,

especialmente em regiões extra-estriatais, onde estes são capazes de promover a liberação de glutamato para a fenda sináptica, facilitar a ativação do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo NMDA e a formação de heterodímeros com o receptor glutamatérgico metabotrópico mGlu5 (SHEN; CHEN, 2009). Em astrócitos, o A_{2A}R interage com o transportador de aminoácidos excitatórios, reduzindo a recaptção de glutamato e aumentando ainda mais a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica (MATOS et al., 2012). Alguns autores sugerem que um prejuízo na sinalização glutamatérgica durante a formação de memórias associativas pode interferir na precisão com que estas serão armazenadas (STEFANI; DI CIANO et al., 2001; GROTH; MOGHADDAM, 2003; ROBBINS; MURPHY, 2006; BENN et al., 2016), o que justificaria os efeitos comportamentais observados no presente trabalho com a utilização de um antagonista seletivo do A_{2A}R.

Ainda, uma terceira interação que já vem sendo estudada desde as décadas de 1980 e 1990 é entre o A_{2A}R e o receptor dopaminérgico do subtipo D₂. Ferré e colaboradores demonstraram, através de ensaios de ligação, que a ativação do A_{2A}R diminui a afinidade de ligação da dopamina com o receptor do subtipo D₂ no estriado e os efeitos por ele mediados (FERRÉ et al., 1991). Através de técnicas de co-imunoprecipitação e transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET, da sigla em inglês *fluorescence resonance energy transfer*), foi possível observar que os receptores A_{2A}R e D₂ formam heterodímeros em neurônios GABAérgicos estriatais (estruturas heterotetraméricas, composta por dois A_{2A}R e dois receptores D₂), onde a ativação do A_{2A}R reduz a afinidade de ligação da dopamina com o receptor D₂ e, conseqüentemente, diminui a sinalização intracelular mediada por esse receptor (que está acoplado a uma proteína G inibitória e diminui a produção de AMPc) (CASADÓ-ANGUERA et al., 2016). Diversos trabalhos apontam para a importância da transmissão dopaminérgica para a formação de memórias aversivas (FADOK; DICKERSON; PALMITER, 2009; ROSSATO et al., 2009). Entretanto, o papel da sinalização via receptor D₂ sobre processos de LTP ainda não foi totalmente elucidado, embora existam alguns trabalhos sugerindo que na amígdala, a ativação desse receptor é necessária para a indução da LTP, possivelmente devido à inibição de neurônios GABAérgicos (ABE et al., 2008). Wei e colaboradores também demonstraram que a deleção do A_{2A}R exclusivamente no estriado favorece a formação de uma memória aversiva, possivelmente devido ao aumento da ativação do receptor D₂ nessa região (WEI et al., 2014).

Dessa forma, a potencialização da consolidação da memória aversiva e o aumento da expressão generalizada da resposta de medo observados no presente trabalho após o bloqueio farmacológico do A_{2A}R poderiam ser atribuídos tanto à regulação negativa da transmissão

glutamatérgica, quanto ao aumento da atividade de receptores D_2 para dopamina. Tal interação e mecanismos adicionais, por sua vez, poderão ser explorados através de outras metodologias, incluindo análises bioquímicas (como dosagem de captação de glutamato) e o emprego de ferramentas farmacológicas nos protocolos comportamentais (como a co-administração de antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} e D_2).

Independentemente dos mecanismos moleculares envolvidos, diversas evidências vêm demonstrando que a liberação de adenosina e a modulação farmacológica do $A_{2A}R$ acarretam em alterações funcionais na transmissão sináptica e na comunicação celular que, por sua vez, afetam funções biológicas decorrentes desses processos, tais como a consolidação de memórias. Desde a década de 1970, diversos autores observaram que o efeito da adenosina sobre a transmissão sináptica é dependente de uma dinâmica temporal, da concentração de adenosina, da frequência de estimulação e, possivelmente, da localização do sítio de ação da adenosina nas sinapses. Ou seja, após a sua liberação (que é dependente da frequência da estimulação), a adenosina inibe a transmissão sináptica através da interação com receptores de alta afinidade na membrana pré-sináptica (A_1R , cuja ativação acarreta na diminuição do influxo de cálcio e da liberação de neurotransmissores), ou facilita a transmissão sináptica através da interação com receptores de menor afinidade ($A_{2A}R$, cuja ativação acarreta no aumento da produção de AMPc e dos potenciais excitatórios pós sinápticos) (PHILLIS; KOSTOPOULOS; LIMACHER, 1975; KURODA, 1978; KOBAYASHI, KURODA; YOSHIOKA, 1981). Adicionalmente, já foi demonstrado que a ativação do $A_{2A}R$ exerce um efeito de facilitação ou potencialização da LTP no hipocampo, no núcleo *accumbens* e na amígdala (MEDONÇA; RIBEIRO, 1994; D'ALCANTARA et al., 2001; REBOLA et al., 2008; RAU et al, 2015). Por outro lado, a inibição farmacológica ou a deleção gênica dos $A_{2A}R$ na amígdala resultam em prejuízo na retenção de memórias aversivas em paralelo à redução da LTP na amígdala (SIMÕES et al., 2016).

Em relação aos protocolos de condicionamento aversivo, estes compõem uma ferramenta particularmente útil para explorar respostas comportamentais (uma vez que uma resposta bem definida a um estímulo ambiental específico é produzida por meio de processos associativos). Entretanto, em relação aos mecanismos moleculares de aprendizado e memória, os dados experimentais que relacionam alterações na plasticidade sináptica Hebbiana (como alterações funcionais em neurônios pós-sinápticos induzidas por LTP e LTD) com a consolidação e a generalização de memórias aversivas nestes protocolos ainda são um alvo importante de estudo. Isto porque, embora seja bem aceito na literatura e demonstrado em inúmeros trabalhos que a plasticidade sináptica Hebbiana é importante para sustentar o

processamento de memórias aversivas associativas, ela não explica completamente estes processos, especialmente em situações de grande valência emocional (JOHANSEN et al., 2011; SWEATT, 2016).

Alterações moleculares independentes da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e despolarização sustentada de neurônios pós sinápticos também são importantes para a consolidação de memórias aversivas associativas. Enquanto a plasticidade sináptica Hebbiana se restringe a um grupo limitado de sinapses específicas envolvidas no processamento neural de determinada informação, alterações plásticas chamadas de não-Hebbianas (ou homeostáticas) são responsáveis pela manutenção constante de um estado de equilíbrio metabólico em todas as sinapses de um neurônio de forma orquestrada, de modo que a atividade de toda a população de sinapses seja regulada positiva ou negativamente de maneira simultânea. Assim, embora esse tipo de plasticidade não se manifeste como uma LTP ou LTD, é essencial para manter a condutância total dependente de glutamato dentro de uma faixa saudável e estável que não exceda a capacidade homeostática do neurônio (SWEATT, 2016).

Dessa forma, diferentes mecanismos de plasticidade sináptica estão envolvidos, também, na consolidação de uma memória aversiva associativa, e quaisquer alterações nestes mecanismos poderia facilmente influenciar a magnitude e a especificidade da resposta condicionada que será expressa posteriormente. Devido à tamanha complexidade dos mecanismos moleculares necessários para a retenção das memórias aversivas associativas, embora de modo geral inúmeros trabalhos demonstrem que a consolidação (e sua facilitação) destas memórias ocorre em paralelo a um aumento na LTP, ainda não podemos afirmar que há uma relação linear ou logarítmica entre aumento da LTP e potencialização da memória e generalização. Inclusive, tem sido discutido na literatura que um aumento exacerbado na potenciação da transmissão sináptica através da LTP poderia caracterizar uma plasticidade aberrante e disfuncional, e conduzir a um prejuízo na retenção de memórias (COSTENLA et al., 2011; KASTER et al., 2015; SANDAU et al., 2016). Alguns trabalhos também demonstraram que, mesmo mediante uma redução na magnitude da LTP, pode ser observado um aumento do medo condicionado e/ou aumento da expressão generalizada de respostas de medo (DITYATEV; BOLSHAKOV, 2005; HUANG et al., 2013; MEIS et al., 2018; NGUYEN et al., 2018).

Em concordância com estes dados, o aumento da atividade do A_{2A}R parece conduzir a uma plasticidade sináptica anormal e, com isso, resultar em prejuízo na formação de memórias associativas. Ou seja, o aumento da atividade do A_{2A}R facilita a manutenção da LTP, mas prejudica a retenção de memórias associativas. Tal relação já foi observada em decorrência do

envelhecimento (onde ratos idosos apresentam prejuízo cognitivo concomitantemente ao aumento da LTP e da expressão de A_{2A}R) (COSTENLA et al., 2011; TEMIDO-FERREIRA et al., 2018), assim como induzida através de diferentes protocolos comportamentais (inclusive no condicionamento aversivo ao contexto, conforme descrito anteriormente neste trabalho).

No presente trabalho observamos através da obtenção de registros eletrofisiológicos que tanto o protocolo de condicionamento aversivo ao contexto quanto o antagonismo sistêmico do A_{2A}R promovem alterações na plasticidade sináptica durante a consolidação da memória aversiva. Mediante estimulação de pulso emparelhado, observamos que o antagonismo sistêmico do A_{2A}R prejudicou a facilitação da liberação de neurotransmissores em fatias de amígdala lateral, mas não em fatias das porções dorsal ou ventral do hipocampo. Quando uma sinapse é rapidamente estimulada em sucessão, a segunda resposta pós-sináptica pode ser maior do que a primeira, visto que o aumento da concentração intracelular de cálcio no neurônio pré-sináptico induzido pelo primeiro estímulo ainda estará disponível, facilitando o processo de liberação vesicular de neurotransmissores na sinapse após a segunda estimulação (MANITA et al., 2007).

Uma vez que a liberação de pré-sináptica de neurotransmissores é um mecanismo chave que contribui para a plasticidade sináptica e para o armazenamento adequado de informações, e que a amígdala lateral é uma região encefálica crítica para o processamento de emoções e para a discriminação de estímulos aversivos (GROSSO et al., 2018), a redução deste parâmetro induzida pelo antagonista sistêmico do A_{2A}R em fatias da amígdala lateral pode ser um dos mecanismos envolvidos nos efeitos comportamentais observados durante a reexposição ao contexto pareado ou apresentação de um contexto novo.

Além disso, em concordância com os trabalhos que demonstram aumento do medo condicionado e/ou aumento da expressão generalizada de respostas de medo após redução na magnitude da LTP (DITYATEV; BOLSHAKOV, 2005; MEIS et al., 2018; NGUYEN et al., 2018), 2 horas após a sessão de condicionamento observamos um prejuízo na LTP em fatias de hipocampo dorsal de animais tratados apenas com veículo. De acordo com o esperado, o antagonista sistêmico do A_{2A}R não promoveu uma alteração significativa na magnitude da LTP em animais não condicionados, reforçando a necessidade de estimulação de alta frequência para que estes receptores sejam recrutados. Entretanto, o antagonismo sistêmico do A_{2A}R reverteu o prejuízo na LTP induzido pelo condicionamento, sugerindo que nesta região encefálica o aumento da LTP poderia conduzir a uma plasticidade sináptica disfuncional e promover o aumento da expressão generalizada de respostas de medo.

Indo ao encontro a estes achados, também demonstramos que o antagonismo do A_{2A}R no hipocampo dorsal potencializa a consolidação da memória aversiva e resulta no aumento da expressão generalizada de respostas de medo. Nos últimos anos, trabalhos relacionaram a estimulação de receptores glicocorticoides e noradrenérgicos hipocampais com a potencialização da consolidação das memórias aversivas e a generalização do medo a curto prazo (KAOUANE et al., 2012; GAZARINI, 2015). Apesar da baixa expressão do A_{2A}R no hipocampo, trabalhos prévios já relataram um aumento local da sua expressão após situações de estresse (KASTER et al., 2015; SIMÕES et al., 2016), o que destaca o interesse em entender o seu papel na consolidação de memórias de caráter aversivo e na generalização do medo. Ainda, observamos no presente trabalho que o antagonismo do A_{2A}R no hipocampo dorsal não foi capaz de sustentar as alterações comportamentais ao longo do tempo, sugerindo que o efeito persistente de expressão generalizada de comportamentos de medo observado com a administração sistêmica de SCH 58261 provavelmente está relacionado ao bloqueio desse receptor em outras estruturas encefálicas como, por exemplo, a amígdala lateral.

Inúmeros trabalhos ressaltam, ainda, que o hipocampo dorsal participa da formação da representação espacial e temporal do evento aversivo, e que sua interação com os diferentes núcleos da amígdala e o hipocampo permite a associação entre o contexto e o estímulo incondicionado (HERMANS et al., 2014; GAZARINI, 2015; CHANG; LIANG 2017; DE VOOGD et al., 2020). Considerando também a grande conectividade entre estas duas regiões, as modificações plásticas induzidas pelo antagonismo sistêmico do A_{2A}R na amígdala lateral poderiam refletir em alterações funcionais no hipocampo dorsal (e vice-versa), diminuindo a força e/ou especificidade da associação entre o contexto e o estímulo incondicionado, e acarretando em expressão generalizada das respostas de medo.

Em conjunto, a partir dos resultados deste trabalho foi possível observar através da obtenção de registros eletrofisiológicos que tanto a amígdala lateral quanto o hipocampo dorsal parecem estar envolvidas na potencialização da consolidação da memória aversiva e posterior generalização da resposta de medo induzidas pelo antagonismo do A_{2A}R. De fato, estes resultados estão de acordo com estudos que investigaram a neurobiologia destes fenômenos, e apontaram para o papel importante exercido por estas duas regiões encefálicas para a formação e manutenção de memórias aversivas. Ghosh e Chattarji (2015) demonstraram, por exemplo, que a intensidade dos estímulos incondicionados influencia no processamento da memória aversiva na amígdala lateral. Neste estudo, foi demonstrado que o aumento da intensidade dos estímulos incondicionados promove um aumento da expressão de generalizada de medo, que é

acompanhada do recrutamento e ativação de neurônios adicionais, que não seriam ativados em um aprendizado de menor intensidade (GHOSH; CHATTARJI, 2015; SANGHA et al., 2020).

Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram pela primeira vez que o antagonismo do A_{2A}R favorece a consolidação de uma memória aversiva em um protocolo de intensidade intermediária e promove um aumento na expressão generalizada de respostas de medo, bem como também sugerem que alterações complexas de plasticidade sináptica na amígdala lateral e no hipocampo dorsal podem estar relacionadas com estes efeitos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, diversos trabalhos pré-clínicos vêm demonstrando o impacto da modulação da atividade do A_{2A}R em processos de aprendizado e memória, bem como na manifestação de distúrbios psiquiátricos em humanos. Entretanto, pouco ainda se sabe acerca do envolvimento desse receptor na formação de memórias de caráter emocional aversivo e na manifestação de comportamentos de medo.

Diante das evidências científicas apresentadas ao longo desse trabalho, podemos sugerir que o A_{2A}R desempenha um papel importante na consolidação de uma memória aversiva associativa, influenciando na especificidade e magnitude das respostas comportamentais manifestadas frente a posterior evocação destas informações.

É necessário, a partir desse momento, ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares e eletrofisiológicos relacionados com a potencialização da consolidação e com a expressão generalizada de comportamentos de medo observadas após o bloqueio farmacológico do A_{2A}R. Dessa maneira, será possível contribuir para o entendimento do papel deste receptor em transtornos psiquiátricos relacionados à formação de memórias traumáticas, bem como de que maneira a sua modulação farmacológica poderia ser utilizada como estratégia terapêutica.

7 REFERÊNCIAS

ABE K. Modulation of hippocampal long-term potentiation by the amygdala: a synaptic mechanism linking emotion and memory. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 18-22, maio 2001.

ABE, K. et al. Involvement of dopamine D₂ receptors in the induction of long-term potentiation in the basolateral amygdala-dentate gyrus pathway of anesthetized rats. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1419-1424, dez. 2008.

ABRAHAM, W. C.; WILLIAMS, J. M. LTP maintenance and its protein synthesis dependence. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 260-268, mar. 2008.

ADOLPHS, R. The biology of fear. **Current Biology**, v. 23, n. 2, p. 79-93, jan. 2013.

ALONSO, M. et al. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. **Learning and Memory**, v. 12, n. 5, p. 504–510, set. 2005.

AKBARI, A. et al. Adenosine A_{2A} receptor blockade attenuates spatial memory deficit and extent of demyelination areas in lyolecithin-induced demyelination model. **Life Sciences**, v. 205, p. 63-72, jul. 2018.

ANGELUCCI, M. E. M. et al. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European Journal of Pharmacology**, v. 373, p. 135–140, jun. 1999.

ASSAIFE-LOPES, N. et al. Regulation of TrkB receptor translocation to lipid rafts by adenosine A_{2A} receptors and its functional implications for BDNF-induced regulation of synaptic plasticity. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 2, p. 251-267, jun. 2014.

BALDI, E., LORENZINI, C.A. & BUCHERELLI, C. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 81, n. 3, p. 162-166, maio 2004.

BATALHA, V. L. et al. Adenosine A_{2A} receptor blockade reverts hippocampal stress-induced deficits and restores corticosterone circadian oscillation. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 3, p. 320-331, mar. 2013.

BECHARA, A. et al. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. **Science**, v. 269, n. 5227, p. 1115-1118, ago. 1995.

BEKINSCHTEIN, P. et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2711-2716, fev. 2008.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage: New insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. **Neurotoxicity Research**, v. 18, n. 3-4, p. 377-385, nov. 2010.

BENN, A. et al. Optogenetic stimulation of prefrontal glutamatergic neurons enhances recognition memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 18, p. 4930-4939, maio 2016.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. **Handbook Of Anxiety And Fear**, [s.l.], p.63-79, 2008.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, n. 3, p. 370-375, mar. 1969.

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

BRUNS, R. F.; DALY, J. W.; SNYDER, S. H. Adenosine receptors in brain membranes: binding of N⁶-cyclohexyl[³H]adenosine and 1,3-diethyl-8-[³H]phenylxanthine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 5547-5551, set. 1980.

BUSTOS, S. G. et al. Previous stress attenuates the susceptibility to midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 5, p. 1097-1108, abr. 2010.

ÇALIŞKAN, G.; STORK, O. Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 321-338, jan. 2019.

CANAS, P. M. et al. Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 47, p. 14741-14751, nov. 2009.

CASADÓ-ANGUERA, V. et al. Evidence for the heterotetrameric structure of the adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor complex. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n., p. 595-600, abr. 2016.

CASAGRANDE, M. A. et al. Synaptic consolidation as a temporally variable process: uncovering the parameters modulating its time-course. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 150, p.42-47, abr. 2018.

CATTERALL, W. A.; FEW, A. P. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 882-901, set. 2008.

CESTARI, V.; CASTELLANO, C. Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 331, n. 1, p. 94-104, jan. 1996.

CHANG, S. D.; LIANG, K.C. The hippocampus integrates context and shock into a configural memory in contextual fear conditioning. **Hippocampus**, v. 27, n. 2, p. 145-155, fev. 2017.

CHARNEY, M. E. et al. Evidenced-Based Treatment of Posttraumatic Stress Disorder. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 99-115, maio 2018.

CHERN, Y. et al. Molecular cloning of a novel adenosine receptor gene from rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 185, n. 1, p. 304-309, 29 mai.1992.

CHOI, D. C.; GOURLEY, S. L.; RESSLER, K. J. Prelimbic BDNF and TrkB signaling regulates consolidation of both appetitive and aversive emotional learning. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 12, dez. 2012.

COELHO, J. E. et al. Overexpression of adenosine A_{2A} receptors in rats: effects on depression, locomotion, and anxiety. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, n. 67, jun. 2014.

COGNATO, G. et al. Caffeine and an adenosine A_{2A} receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 2, p. 453-62, jan. 2010.

CORODIMAS, K. P.; PRUITT, J. C.; STIEG, J. M. Acute exposure to caffeine selectively disrupts context conditioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 152, n. 4, p. 376-82, nov. 2000.

COSTENLA, A. R. et al. Enhanced role of adenosine A_{2A} receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 12-21, jul. 2011.

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

CUNHA, G. M. et al. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A_{2A} receptors upon sub-chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 141, n. 4, p. 1775-1781, set. 2006.

CUNHA, G. M. A. et al. Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. **Experimental neurology**, v. 210, n. 2, p. 776-81, abr. 2008.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 2, p. 107-125, fev. 2001.

CUNHA, R. A. Different cellular sources and different roles of adenosine: A₁ receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A_{2A} receptor-mediated facilitation of plasticity. **Neurochemistry International**, v. 52, p. 65-72, jan. 2008.

D'ALCANTARA, P. et al. Inactivation of adenosine A_{2A} receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. **Neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 455-64, 23 nov. 2001.

DALL'OLIO, R.; GANDOLFI, O.; MONTANARO, N. Effects of pre- and post-trial caffeine administrations upon "step-down" passive avoidance behavior in rats submitted or not to electroconvulsive shock. **Pharmacological Research Communications**, v. 10, n. 9, p. 851-858, out. 1978.

DAVIS, H. P.; SQUIRE, L. R. Protein synthesis and memory: a review. **Psychological Bulletin**, v. 96, n. 3, p. 518-559, nov. 1984.

DE GUBAHEFF, T.; SLEATOR, W. Effects of caffeine on mammalian atrial muscle, and its interaction with adenosine and calcium. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 148, n. 2, p. 202-214, maio 1965.

DE LERA RUIZ, M.; LIM, Y. H.; ZHENG, J. Adenosine A_{2A} receptor as a drug discovery **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3623-3650, maio 2014.

DEBIEC, J.; BUSH, D. E.; LEDOUX, J. E. Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats--a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. **Depression and Anxiety**, v. 28, p. 86-193, mar. 2011.

DESMEDT, A. et al. Adaptive emotional memory: the key hippocampal-amygdalar interaction. **Stress**, v. 18, n. 3, p. 297-308, 11 ago. 2015.

DESMEDT, A.; MARIGHETTO, A.; PIAZZA, P. V. Abnormal fear memory as a model for posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 290-297, set. 2015.

DI CIANO, P. et al. Differential involvement of NMDA, AMPA/Kainate, and dopamine receptors in the nucleus accumbens core in the acquisition and performance of Pavlovian approach behavior. **The Journal of Neurosciences**, v. 21, p. 9471-9477, dez. 2001.

DIENI, S. et al. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 6, p. 775-788, mar. 2012.

DIÓGENES, M. J. et al. Activation of adenosine A_{2A} receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 12, p.2905-2913, 24 mar. 2004.

DITYATEV, A. E.; BOLSHAKOV, V. Y. Amygdala, long-term potentiation, and fear conditioning. **Neuroscientist**, v. 11, n. 1, p. 75-88, fev. 2005.

DO ESPÍRITO SANTO, C.C. et al. Locomotor Treadmill Training Promotes Soleus Trophism by Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Paraplegic Rats. **Neurochemistry Research**, v. 43, n. 6, p. 1258-1268, jun. 2018.

DOUGHERTY, K. A.; ISLAM, T.; JOHNSTON, D. Intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurones from the rat dorsal and ventral hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 22, p. 5707-5722, set. 2012.

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **The Journal of Physiology**, v. 68, n. 3, p. 213-237, 25 nov. 1929.

DUBROQUA, S. et al. Caffeine impairs the acquisition and retention, but not the consolidation of Pavlovian conditioned freezing in mice. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 4, p. 721-731, fev. 2015.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, p. 51-86, 4 fev. 2004.

DUDAI, Y. The restless engram: consolidations never end. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, p. 227-247, 2012.

DUNSMOOR, J. E.; PAZ, R. Fear Generalization and anxiety: behavioral and neural mechanisms. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 336-343, set. 2015.

EICHENBAUM, H. Still searching for the engram. *Learning & Behavior*, v. 44, n. 3, p. 209-222, set. 2016.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, n. 4, p. 904-15, out. 2009.

FADOK, J. P.; DICKERSON, T. M. K.; PALMITER, R. D. Dopamine Is Necessary for Cue-Dependent Fear Conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 36, p. 11089-11097, set. 2009.

FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioral Brain Research**, v. 110, n. 1-2, p. 73-81, jun. 2000.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**, v. 1, n. 4, p. 429-438, dez. 1994.

fear generalization. **Neuroimage**, v. 188, p. 445-455, mar. 2019.

FERRÉ, S. et al. Stimulation of high-affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 15, p. 7238-7241, ago. 1991.

FERREIRA, S. G. et al. Presynaptic adenosine A_{2A} receptors dampen cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of corticostriatal glutamatergic transmission. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 4, p. 1074-1086, fev. 2015.

FREDHOLM, B. B. et al. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 443-448, 15 fev. 2001.

FURINI, C.; MYSKIW, J.; IZQUIERDO, I. The learning of fear extinction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 670-683, 2014.

FURLONG, T. J. et al. Molecular characterization of a human brain adenosine A₂ receptor. **Molecular Brain Research**, v. 15, p. 62-66, set. 1992.

GABBOTT, P. L. et al. Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. **Brain Research**, v. 993, n. 1-2, p. 59-71, dez. 2003.

GABBOTT, P. L.; WARNER, T; A.; JAYS, P. R.; SALWAY, P.; BUSBY, S. J. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 492, n. 2, p. 145-177, nov. 2005.

GARÇÃO, P. et al. Functional interaction between pre-synaptic $\alpha 6\beta 2$ -containing nicotinic and adenosine A_{2A} receptors in the control of dopamine release in the rat striatum. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 7, p. 1600-1611, ago. 2013.

GAZARINI, L. et al. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting $\alpha 1$ - and β -adrenergic receptors. **Learning and Memory**, v. 20, n. 4, p. 210-219, mar. 2013.

GAZARINI, L. et al. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.18, n. 1, 31 out. 2014.

GAZARINI, L. Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica sobre as memórias de medo: do fisiológico ao disfuncional. 2015. 204 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

GHOSH, S.; CHATTARJI, S. Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 112-20, jan. 2015.

GIESE, K. P.; MIZUNO, K. The Roles of Protein Kinases in Learning and Memory. *Learning and Memory*, v. 20, n. 10, p. 540-552, set. 2013.

GILMARTIN, M. R.; BALDERSTON, N. L.; HELMSTETTER, F. J. Prefrontal cortical regulation of fear learning. **Trends in Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 455-464, ago. 2014.

GIMÉNEZ-LLORT, L. et al. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 42-56, jan. 2007.

GIUSTINO, T. F.; MAREN, S. Noradrenergic Modulation of Fear Conditioning and Extinction. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, mar. 2018.

GOLEMBIOWSKA, K. et al. Effects of adenosine receptor antagonists on the in vivo LPS-induced inflammation model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 24, n. 1, p. 29-40, jul. 2013.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651-658, set. 2012.

GROSSO, A. et al. A neuronal basis for fear discrimination in the lateral amygdala. *Nature Communications*, v. 9, n. 1214, mar. 2018.

GUTTMAN, N.; KALISH, H. I. 1956. Discriminability and stimulus generalization. **Journal of Experimental Psychology**, v. 51, n. 1, p. :79-88, jan. 1956.

HAMANN, S. B. et al. Ecstasy and agony: Activation of the human amygdala in positive and negative emotion. **Psychological Science**, v. 13 n. 2, p. 135-141, mar. 2002.

HARAGUCHI, H.; KURIBARA, H. Behavioral effects of adenosine agonists: evaluation by punishment, discrete shuttle avoidance and activity tests in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 3, 303-310, mar. 1991.

HERMANS, E. J. et al. How the amygdala affects emotional memory by altering brain network properties. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 2-16, jul. 2014.

HOLLOWAY, C. M.; MCINTYRE, C. K. Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, n.4, p. 425-432, maio 2011.

HORITA, T. K. et al. Effects of the adenosine A_{2A} antagonist istradefylline on cognitive performance in rats with a 6-OHDA lesion in prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 230, n. 3, p. 345-352, dez. 2013.

HUANG, Y. et al. Cytokines induced by long-term potentiation (LTP) recording: A potential explanation for the lack of correspondence between learning/memory performance and LTP. **Neuroscience**, v. 231, p. 432-443, fev. 2013.

IMPELLIZZERI, D. et al. CGS 21680, an agonist of the adenosine A_{2A} receptor, decreases acute lung inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1-2, p. 305-316, out. 2011.

IZQUIERDO, I. et al. Different Molecular Cascades in Different Sites of the Brain Control Memory Consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496-505, set. 2006.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, nov. 1997.

JAAKOLA, V. P. et al. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. **Science**, v. 322, n. 5905, p. 1211-127, 21 nov. 2008.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 247-264, mar. 2006.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284-292, jan. 2015.

JASNOW, A. M. et al. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 3, p. 821-835, mar. 2017.

JOHANSEN, J. et al. Molecular mechanisms of fear learning and memory. **Cell**, v. 147, n. 3, p.509-524, out. 2011.

JOSSELYN, S. A.; KÖHLER, S.; FRANKLAND, P. W. Finding the engram. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 521-534, set. 2015.

KAOUANE, N et al. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. **Science**, v. 335, n. 6075, p. 1510-1513, mar. 2012.

KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A_{2A} receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.112, n. 25, p.7833-7838, jun. 2015.

KIM, D. H.; RYU, J. H. Activation of adenosine A_{2A} receptor impairs memory acquisition but not consolidation or Retrieval Phases. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 16, n. 4, p. 320-327, dez. 2008.

KINDT, M.; VAN EMMERIK, A. New avenues for treating emotional memory disorders: towards a reconsolidation intervention for posttraumatic stress disorder. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 6, n. 4, p. 283-295, ago. 2016.

KOBAYASHI, K.; KURODA, Y.; YOSHIOKA, M. Change of cycle AMP level in synaptosomes from cerebral cortex; Increase by adenosine derivatives. **Journal of Neurochemistry**, v. 36, n. 1, p. 86-91, jan. 1981.

KOPF, S. R. et al. Adenosine and memory storage: effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 146, n. 2, p. 214-219, set. 1999.

KORB, E.; FINKBEINER, S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. **Trends in Neuroscience**, v. 34, n. 11, p. 591-598, nov. 2011.

KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor With Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 3, p.579-593, abr. 2018.

KRUG, M.; LOSSNER, B.; OTT, T. Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. **Brain Research Bulletin**, v. 13, n. 1 p. 39-42, jul. 1984.

KURODA, Y. Physiological roles of adenosine derivatives which are released during neurotransmission in mammalian brain. **Journal of Physiologie**, v.74, n. 5,p. 463-470, jan. 1978.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. et al. Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 4, p. 873-879, ago. 2006.

LASHLEY, K. S. In search of the engram. **Symposiums of the Society of Experimental Biology**, p. 454-482, 1950.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 463-84, nov. 2001.

LAURENT, C. et al. A_{2A} adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. **Molecular Psychiatry**, v. 21, p. 97-107, jan. 2016.

LEBON, G. et al. Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. 521-525, 18 maio 2011.

LEDENT, C. et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. **Nature**, v. 388, n. 6643, 674-678, 14 ago. 1997.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 2871-2878, fev. 2014.

LEE, F. S.; CHAO, M. V. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 6, p. 3555-3560, 13 mar. 2001.

LEE, J. L. C.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science** v. 304, n. 5672, p. 839-843, maio 2004.

LEITE, M. R. et al. Protective effect of caffeine and a selective A_{2A} receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 309-315, abr. 2011.

LI, P. et al. Optogenetic activation of intracellular adenosine A_{2A} receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 11, p. 1339-1349, nov. 2015.

LISMAN, J.; YASUDA, R.; RAGHAVACHARI, S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 169-182, mar. 2012.

LONDOS, C.; WOLFF, J. Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5482-5486, dez. 1977.

LUBIN, F. D.; ROTH, T. L.; SWEATT, J. D. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 42, p. 10576-10586, out. 2008.

MAENHAUT, C. et al. RDC8 codes for an adenosine A₂ receptor with physiological constitutive activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, p. 1169-1178, 31 dez. 1990.

MAGGIO, N.; SEGAL, M. Striking variations in corticosteroid modulation of long-term potentiation along the septotemporal axis of the hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 21, p. 5757-5765, maio 2007.

MALDONADO, N. M.; MARTIJENA, I. D.; MOLINA, V. A. Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: reversal by midazolam pretreatment. **Behavioral Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 77-84, nov. 2011.

MALIKOWSKA-RACIA, N.; SALAT, K. Recent advances in the neurobiology of posttraumatic stress disorder: A review of possible mechanisms underlying an effective pharmacotherapy. **Pharmacological Research**, v. 142, p. 30-49, abr. 2019.

MANITA, S. et al. Paired-pulse ratio of synaptically induced transporter currents at hippocampal CA1 synapses is not related to release probability. **Brain Research**, v. 1154, p. 71-79, jun. 2007.

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

MATOS, M. et al. Adenosine A_{2A} receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**, v. 60, n., p. 702-716, maio 2012.

MATOS, M. et al. Deletion of adenosine A_{2A} receptors from astrocytes disrupts glutamate homeostasis leading to psychomotor and cognitive impairment: relevance to schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 11, p. 763-774, dez. 2015.

MCGAUGH, J. L. Making lasting memories: remembering the significant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 10402-10407, 18 jun. 2013.

MCGAUGH, J. L. Memory – a Century of Consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251, jan. 2000.

MCINTYRE, C. K, et al. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10718-10723, jul. 2005.

MCREYNOLDS, J. R. et al. Noradrenergic actions in the basolateral complex of the amygdala modulate Arc expression in hippocampal synapses and consolidation of aversive and non-aversive memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 115, p. 49-57, nov. 2014.

MEIS, S. et al. The relation between long-term synaptic plasticity at glutamatergic synapses in the amygdala and fear learning in adult heterozygous BDNF-knockout mice. **Cerebral Cortex**, v. 28, n. 4, p. 1195-1208, abr. 2018.

MENDONÇA, A. de; RIBEIRO, J. A. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 62, n. 2, p. 385-390, set. 1994.

MIHARA, T. et al. Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A1 and A2A receptor dual antagonist, 5-[5-amino-3-(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1-isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 2, p. 708-719, nov. 2007.

MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, v. 160, n. 3827, p. 554-555, maio 1968.

MIYASHITA, T. et al. Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 269-284, mar. 2008.

MONDAY, H. R.; YOUNTS, T. J.; CASTILLO, P. E. Long-term plasticity of neurotransmitter release: emerging mechanisms and contributions to brain function and disease. **Annual Review of Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. 299-322, jul. 2018.

MOSCOSO-CASTRO, M. Cognitive impairments associated with alterations in synaptic proteins induced by the genetic loss of adenosine A_{2A} receptors in mice. **Neuropharmacology**, 2017 Nov; v. 126, p. 48-57, nov. 2017.

MOURO, F. M. et al. Chronic and acute adenosine A_{2A} receptor blockade prevents long-term episodic memory disruption caused by acute cannabinoid CB₁ receptor activation. **Neuropharmacology**, v. 117, p. 316-327, maio 2017.

MOURO, F. M. et al. Memory deficits induced by chronic cannabinoid exposure are prevented by adenosine A_{2A}R receptor antagonism. **Neuropharmacology**, v. 155, p. 10-21, set. 2019.

MÜLLER, G. E.; PILZECKER, A. Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss. **Zeitschrift fuer Psychologie**, suppl.1, p. 1-288, 1900.

NABAVI, S. et al. Engineering a Memory With LTD and LTP. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 348-352, jul. 2014.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, p. 722-726, 17 ago. 2000.

NAKAYAMA, D. et al. Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 2. p. 819-830, jan. 2015.

NGUYEN, H. B. et al. Generalization of conditioned auditory fear is regulated by maternal effects on ventral hippocampal synaptic plasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1297-1307, maio 2018.

NICOLL, R.A. A brief history of long-term potentiation. **Neuron**, v. 93, jan. 2017.

NORMILE, H. J. et al. Activation of adenosine A₁ receptors in the nucleus accumbens impairs inhibitory avoidance memory. **Behavioral and Neural Biology**, v. 62, n. 2, p. 163-166, set. 1994.

NORMILE, H. J.; BARRACO, R. A. N⁶-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A₁ receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 101-104, jul. 1991.

NOTARAS, M.; VAN DEN BUUSE, M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders. **Molecular Psychiatry**, jan. 2020.

ONAT, S.; BÜCHEL, C. The neuronal basis of fear generalization in humans. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 12, p. 1811-1818, dez. 2015.

ONGINI, E. SCH 58261: A Selective A_{2A} Adenosine Receptor Antagonist. **Drug Development Research**, v. 42, n. 2, p. 63-70, dez. 1997.

ORR, A. G. et al. Astrocytic adenosine receptor A_{2A} and Gs-coupled signaling regulate memory. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 423-34, mar. 2015.

ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1773-1802, ago. 2012.

OVEREEM, K. A. et al. A Role for Nitric Oxide-Driven Retrograde Signaling in the Consolidation of a Fear Memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, n. 2, fev. 2010.
, 4, 2 2010 Feb

PAGNUSSAT, N. et al. Adenosine A_{2A} receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 15, p. 3831-3845, ago. 2015.

PANJA, D.; BRAMHAM, C. R. BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 664-676, jan. 2014.

PAPE, H. C.; PARE, D. Plastic Synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 419-463, abr. 2010.

PATERNITI, I. et al. Selective adenosine A_{2A} receptor agonists and antagonists protect against spinal cord injury through peripheral and central effects. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 31, abr. 2011.

PATTEN, A. R. et al. The benefits of exercise on structural and functional plasticity in the rodent hippocampus of different disease models. **Brain Plasticity**, v. 1, n. 1, p. 97-127, out. 2015.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Academic Press, 2009.

PEDRAZA, L. K. et al. The dynamic nature of systems consolidation: stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. **Hippocampus**, v. 26, n. 3, p. 362-371, mar. 2016.

PEREIRA, G. S. et al. Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, n. 3, p. 217-23, maio 2005.

PHILLIS, J. W.; KOSTOPOULOS, G. K.; LIMACHER, J. J. A potent depressant action of adenine derivatives on cerebral cortical neurones. **European Journal of Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 125-129, jan. 1975.

PINTO-DUARTE, A. et al. Adenosine A_{2A} receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, n. 3, p. 595-604, maio 2005.

PIRES, V. A. et al. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Pharmacology**, v. 20, n. 2, p. 134-145, mar. 2009.

PITMAN, R. K. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. **Biological Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 221-223, jul. 1989.

POLLACK, G. A. et al. Cued fear memory generalization increases over time. **Learning and Memory**, v. 25, n. 7, p. 298-308, jun. 2018.

POPOLI, P. et al. Blockade of striatal adenosine A_{2A} receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1967-1975, mar. 2002.

PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A_1 and A_{2A} receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 6, p. 957-964, jun. 2005.

PREDIGER, R. D.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. N. Antagonistic interaction between adenosine A_{2A} and dopamine D_2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioral Pharmacology**, v. 16, n. 4, p. 209-218, jul. 2005.

PREDIGER, R. D.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A_{2A} receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioral Brain Research**, v. 159, n. 2, p. 197-205, 30 abr. 2005.

PREDIGER, R. D.; TAKAHASHI, R. N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A_1 and A_{2A} receptors. **Neuroscience Letters**, v. 376, n. 3, p. 160-165, 16 mar. 2005.

RAU, A. R.; ARIWODOLA, O. J.; WEINER, J. L. Postsynaptic adenosine A_{2A} receptors modulate intrinsic excitability of pyramidal cells in the rat basolateral amygdala. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 6, 25 fev 2015.

REBOLA, N. et al. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. **Neuroscience**, v. 132, n. 4, p. 893-903, 2005.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1484-1486, jun. 1996.

ROBBINS, T. W.; MURPHY, E. R. Behavioural Pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 141-148, mar. 2006.

ROSSATO, J. I. et al. Dopamine Controls Persistence of Long-Term Memory Storage. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 1017-1020, ago. 2009.

ROZESKE, R. R. et al. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, n. 1, p. 22-36, jan. 2015.

RUDY, J. W.; HUFF, N. C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n.4, p. 675-685, nov. 2004.

SALLABERRY, C. et al. Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunecontent in middle-aged rats. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 153-159, jan. 2013

SANDAU, U. S. et al. Adenosine kinase deficiency in the brain results in maladaptive synaptic plasticity. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 48, p. 12117-12128, nov. 2016.

SANDAY, L. et al. Role of state-dependent learning in the cognitive effects of caffeine in mice. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1547-1557, ago. 2013.

SANGHA, S. et al. Know safety, no fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 108, p. 218-230, jan. 2020.

SANSONE, M.; BATTAGLIA, M.; CASTELLANO, C. Effect of Caffeine and Nicotine on Avoidance Learning in Mice: Lack of Interaction. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 9, p. 765-767, set. 1994.

SANTINI, E.; QUIRK, G. J.; PORTER, J. T. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 15, p. 4028-4036, abr. 2008.

SARA, S. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learning and Memory**, v. 7, n.2, p. 73-84, mar. 2000.

SATTIN, A.; RALL, T. W. The Effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. **Molecular Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 13-23, jan. 1970.

SCHNEIDER, A. M.; SHERMAN, W. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. **Science**, v. 159, p. 219-221, jan. 1968.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 193, p. 471-534, fev. 2009.

SHEN, H. Y.; CHEN, J. F. Adenosine A_{2A} receptors in psychopharmacology: modulators of behavior, mood and cognition. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 3, p. 195-206, set. 2009.

SHEN, Z.; WANG, G.; LIN, S. Z. Two-way shuttlebox avoidance conditioning and brain NADH in rats. **Physiology & Behavior**, v. 48, n. 4, p. 515-517, out. 1990.

SHIMIZU, H.; DALY, J. W.; CREVELING, C. R. A radioisotopic method for measuring the formation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in incubated slices of brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 16, n. 12, p. 1609-1619, dez. 1969.

SILVA, S. V. et al. Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A_{2A} receptor. **Nature Communications**, v. 7, n. 11915, jun. 2016.

SILVA, A. C. et al. Blockade of adenosine A_{2A} receptors recovers early deficits of memory and plasticity in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 117, p. 72-81, set. 2018.

SIMÕES, A. P. et al. Adenosine A_{2A} receptors in the amygdala control synaptic plasticity and contextual fear memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 12, p. 2862-2871, nov. 2016.

SMITH, N. B. et al. Fear extinction and memory reconsolidation as critical components in behavioral treatment for posttraumatic stress disorder and potential augmentation of these processes. **Neuroscience Letters**, v. 649, p. 170-175, 10 maio 2017.

SOETER, M.; KINDT, M. Noradrenergic enhancement of associative fear memory in humans. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 2, p. 263-271, set. 2011.

SOSSIN, W. S.; LACAÏLLE, J. -C. Mechanisms of translational regulation in synaptic plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 4, p. 450-456, ago 2010.

SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 231-235, abr. 2010.

SQUIRE, L. R.; DEDE, A. J. Conscious and unconscious memory systems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 3, mar. 2015.

STEFANI, M. R.; GROTH, K.; MOGHADDAM, B. Glutamate receptors in the rat medial prefrontal cortex regulate set-shifting ability. **Behavioral Neuroscience**, v.117, n. 4, p. 728-737, ago. 2003.

STRANGE, B. A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655-669, out. 2014.

STRUYF, D. et al. Gradients of fear: how perception influences fear generalization. **Behavior research and Therapy**, v. 93, p. 116-122, jun. 2017.

SU, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced mitochondrial motility arrest and presynaptic docking contribute to BDNF-enhanced synaptic transmission. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 3, p. 1213-1226, jan. 2014.

SUTTON, M. A.; SCHUMAN, E. M. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 49-58, out. 2006.

SWEATT, J. D. Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. **The Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 179-199, out. 2016.

TABATA, K. et al. Ameliorative effects of paeoniflorin, a major constituent of peony root, on adenosine A₁ receptor-mediated impairment of passive avoidance performance and long-term potentiation in the hippocampus. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 5, p. 496-500, maio 2001.

TAKEI, N. et al. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9760-9769, nov. 2004.

TANAKA, J.-I. et al. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. **Science**, v. 319, n. 5870, p. 1683-1687, mar. 2008.

TEBANO, M. T. et al. Adenosine A_{2A} receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, n. 1, p. 279-286, jan. 2008.

TEMIDO-FERREIRA, M. et al. Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A_{2A} receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. **Molecular Psychiatry**, jun. 2018.

THOMPSON, C. L. et al. Genomic anatomy of the hippocampus. **Neuron**, v. 60, n. 6, p.1010-1021, dez. 2008.

TORRISI, S. A. et al. Therapeutic challenges of post-traumatic stress disorder: focus on the dopaminergic system. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 404, abr. 2019.

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

TUOMINEN, L. et al. The relationship of perceptual discrimination to neural mechanisms of

TYEJBI, S. et al. Hyperactivation of D₁ and A_{2A} receptors contributes to cognitive dysfunction in Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 74, p. 41-57, fev. 2015.

TYNG, C. M. et al. The influences of emotion on learning and memory. **Frontiers in Psychology**, v. 8, n. 1454, ago 2017.

VAN CALKER, D. et al. The role of adenosine receptors in mood and anxiety disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 151, n. 1, p.11-27, out. 2019.

VAN CALKER, D.; MÜLLER, M.; HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 33, n. 5, p. 999-1005, nov. 1979.

VAN ELZAKKER, M. B. et. al. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 113, p. 3-18, set. 2014.

VANVOSSSEN, A. C. et al. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prefrontal cortex NMDA receptors. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 137, p. 154-162, jan. 2017.

WANG, J. H.; MA, Y. Y.; VAN DEN BUUSE, M. Improved spatial recognition memory in mice lacking adenosine A_{2A} receptors. **Experimental Neurology**, v. 199, n. 2, p. 438-45, jun. 2006.

WATKINS, J. C.; JANE, D.E. The glutamate story. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S100-S108, jan. 2006.

WEI, C. J. et al. Regulation of fear responses by striatal and extrastriatal adenosine A_{2A} receptors in forebrain. **Biological Psychiatry**, v. 75, n. 11, jun. 2014.

WEI, C. J.; LI, W.; CHEN, J. F. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 1358-1379, maio 2011.

WHITAKER, A. M.; GILPIN, N. W.; EDWARDS, S. Animal models of post-traumatic stress disorder and recent neurobiological insights. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 5-6, p. 398-409, set. 2014.

WINSKY, L.; HARVEY, J. A. Effects of N6-(L-phenylisopropyl)adenosine, caffeine, theophylline and rolipram on the acquisition of conditioned responses in the rabbit. **The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 241, n. 1, p. 223-229, abr. 1987.

WINSKY, L.; HARVEY, J. A. Retardation of associative learning in the rabbit by an adenosine analog as measured by classical conditioning of the nictitating membrane response. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 2684-2690, set. 1986.

XU, W.; SÜDHOF, T. C. A neural circuit for memory specificity and generalization. **Science**, v. 339, n. 6125, p. 1290-1295, mar. 2013.

YACOUBI, E. et al. In vivo labelling of the adenosine A_{2A} receptor in mouse brain using the selective antagonist [³H]SCH 58261. **The European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 1567-1570, nov. 2001.

YANG, M. et al. Characterization of the potency, selectivity and pharmacokinetic profile for six adenosine A_{2A} receptor antagonists. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 375, n. 2, p. 133-144, abr. 2007.

YEHUDA, R. et al. Post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 15057, out. 2015.

YEHUDA, R.; ANTELMAN, S. M. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 479-486, abr. 1993.

YUSTE, R. The discovery of dendritic spines by Cajal. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. 18, 21 abr. 2015.

ZARRINDAST, M. R.; SHAFAGHI, B. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. **European Journal of Pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 233-239, maio 1994.

ZEIDMAN, P.; MAGUIRE, E. A. Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 173-182, mar. 2016.

ZEZULA, J.; FREISSMUTH, M. The A_{2A}-adenosine receptor: a GPCR with unique features? **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. S184-190, mar. 2008.

ZHOU, Q. Y. et al. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 7432-7436, 15 ago. 1992.

ZHOU, S. J. et al. Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A_{2A} receptors. **Brain Research**, v. 1303, p. 74-83, dez. 2009.