



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

Hugo Bayer Reichmann

**Envolvimento do córtex infralímbico na consolidação de memórias de medo contextual
em ratos**

Florianópolis
2021

Hugo Bayer Reichmann

**Envolvimento do córtex infralímbico na consolidação de memórias de medo contextual
em ratos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Farmacologia

Orientador: Prof. Leandro José Bertoglio, Dr.

Florianópolis

2021

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

Bayer Reichmann, Hugo
Envolvimento do córtex infralímbico na consolidação de
memórias de medo contextual em ratos / Hugo Bayer
Reichmann ; orientador, Leandro José Bertoglio, 2021.
97 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Neuropsicofarmacologia. 3.
Neurobiologia da memória. I. Bertoglio, Leandro José. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Hugo Bayer Reichmann

**Envolvimento do córtex infralímbico na consolidação de memórias de medo contextual
em ratos**

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

Prof. Fabrício Hoffmann Martins Do-Monte, Dr.
Universidade do Texas (Houston), Estados Unidos da América

Prof. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, Dr.
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

Prof. Geison Souza Izídio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Leandro José Bertoglio, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado aos inquietos, curiosos e todos aqueles que se deleitam ao refletir sobre o mundo natural.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram como fosse preciso. A minha família, agradeço pelos bons momentos compartilhados, em especial a minha Vó Mathilde, que sempre instigou minha curiosidade, minhas irmãs, sobrinhas e sobrinho.

Ao meu orientador, o professor Dr. Leandro José Bertoglio, que abriu as portas de seu laboratório para mim e me orienta há mais de 5 anos, tendo me ensinado muito sobre diversos aspectos do mundo acadêmico e da neuropsicofarmacologia da memória.

Aos colegas que estiveram no laboratório comigo durante o período em que realizei este trabalho: Jaqueline Franzen, Fernanda Troyner, Marcelo Giachero, Felipe Vanz, Amanda Reis, Bruno Biscaia, Iasmim Orsi e Bruna Soares.

Aos professores e amigos do PPG em Farmacologia, em especial aos professores Geison Izídio e Rui Prediger, por aceitarem fazer parte de banca e aos professores Antônio de Padua Carobrez, Daniel Mansur e André Bafica pela amizade e discussões científicas e filosóficas. Muito obrigado também aos amigos com os quais morei durante o mestrado, João e Kauan, que tornaram os momentos de isolamento na pandemia mais leves e divertidos. Aos meus amigos de Bombinhas com os quais passei por diversos perrengues escalando rochas: Franco, Renzo e Federico. A Lara, pelo amor, carinho e apoio em momentos difíceis e com quem compartilhei tantos momentos sublimes e inesquecíveis, sempre tornando minha vida mais doce.

Por último, agradeço a CAPES e ao CNPq por terem permitido que eu realizasse esse trabalho através do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e da concessão de minha bolsa.

RESUMO

O córtex infralímbico (IL) é uma região crucial para a atenuação de memórias aversivas através da extinção. Estudos prévios demonstraram que lesão ou inativação dessa região antes da aquisição da memória torna as memórias mais generalizadas e resistentes à extinção. No entanto, ainda não foi esclarecido se, e como, o IL modula a especificidade da memória e sua susceptibilidade à extinção durante a consolidação. O objetivo do presente estudo foi avaliar como a inativação ou inibição da síntese proteica desta região durante a consolidação de memórias aversivas contextuais afeta sua expressão e susceptibilidade à extinção. Foram utilizados ratos submetidos à cirurgia estereotáxica para que fossem realizados os tratamentos no IL, que foram muscimol (MUS; agonista GABA) e anisomicina (ANI; inibidor de síntese proteica). O protocolo geral do estudo consiste no condicionamento aversivo contextual (CAC) seguido de tratamento, e a avaliação do tempo de congelamento no mesmo contexto (Teste A) e num contexto novo (Teste B), e na extinção da memória. Os resultados indicam que a atividade do IL imediatamente após o CAC, mas não 6 horas depois, é importante para a consolidação de memórias contextualmente precisas. O tratamento com muscimol gera efeitos que persistem por pelo menos uma semana, e ocorrem independentemente da intensidade do treino. Os efeitos dependem de aprendizado associativo (choque + contexto), uma vez que a infusão de MUS não teve efeito em animais que passaram pelos protocolos de choque imediato ou exposição ao contexto isolado. A inativação do IL durante a consolidação não afetou a sessão de extinção, mas impediu sua consolidação, já que os animais tratados mantiveram altos níveis de congelamento após a extinção. Assim, a atividade do IL durante a consolidação parece ser necessária para permitir que memórias aversivas contextuais sejam precisas e sensíveis à extinção. Além disso, os efeitos não estão relacionados a aumentos em comportamentos de tipo-ansiedade, como observado no teste do labirinto em cruz elevado. Os resultados obtidos com ANI indicam que a síntese proteica no IL também é importante para a consolidação de memórias sensíveis à extinção, mas não tão importante no que diz respeito a especificidade da memória. Em conjunto, os dados indicam que atividade e plasticidade no IL durante a consolidação são importantes para o controle da generalização e susceptibilidade à extinção de memórias aversivas contextuais.

Palavras-chave: Aprendizado e memória. Condicionamento de medo. Córtex pré-frontal.

ABSTRACT

The infralimbic cortex (IL) is a crucial brain region in the attenuation of fear memories through extinction. Previous studies have shown that lesion or inactivation of this region before memory acquisition renders memory more generalized and extinction-resistant. However, whether and how the IL modulates memory specificity and extinction susceptibility during consolidation remains unknown. The present study focuses on evaluating the effects of IL inactivation and protein synthesis inhibition during contextual fear memory consolidation on memory expression, generalization, and susceptibility to extinction. We subjected male adult Wistar rats to a stereotactic surgery that allowed intra-IL infusions of muscimol (GABA agonist) and anisomycin (protein synthesis inhibitor). Next, rats were exposed to a contextual fear conditioning (CFC) session followed by intra-IL treatment, and measurement of the treatments' effects on rat's behavior were assessed in the same context (Test A), in a novel one (Test B), or during memory extinction. The total time animals spent freezing was used as an index of memory intensity (Test A) and generalization (Test B). Our results showed that IL's activity immediately after CFC, but not 6 hours later, is important for consolidating contextually precise fear memories. The given treatment produced behavioral effects that persist for at least for a week, and occurred regardless of memory strength. The observed effects depended on associative learning (shock + context), since muscimol infusions had no effect in animals exposed to immediate shock or context alone. IL's inactivation during consolidation did not affect the extinction session, but prevented extinction consolidation, since treated animals continued to present high freezing levels on Test A performed after extinction. Thus, IL's activity seems necessary for the consolidation of precise and extinction-sensitive contextual fear memories. These post-acquisition IL inactivation-induced effects were not associated with changes in anxiety, as assessed in the elevated plus-maze test. Anisomycin results indicated that IL protein synthesis is also important for the consolidation of extinction-sensitive memories, but not as important for memory specificity. Collectively, these results provide evidence for IL's role in controlling generalization and susceptibility to extinction during fear memory consolidation. Expanding the knowledge about neurobiological processes that underlie the consolidation of generalized and extinction-resistant memories is crucial to developing new therapeutic strategies for patients with Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD).

Keywords: Contextual fear conditioning. Learning and memory. Prefrontal cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Condicionamento aversivo ao contexto.	19
Figura 2. As fases iniciais do processamento mnemônico.	21
Figura 3. Atualização mnemônica.	23
Figura 4. O córtex pré-frontal medial do rato.	27
Figura 5. Protocolo básico de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) utilizado neste trabalho.	38
Figura 6. Corte histológico demonstrando o sítio de infusão.	41
Figura 7. Expto. 1: Efeito da inativação do IL com MUS 20 minutos antes do CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B.	43
Figura 8. Expto. 2.1: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B.	45
Figura 9. Expto. 2.2: Efeito da inativação do IL com MUS 6 horas após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B.	46
Figura 10. Expto 3: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a expressão de comportamentos de tipo-ansiedade.	47
Figura 11. Expto 4: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC de menor intensidade sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B.	48
Figura 12. Expto 5: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B uma semana depois.	49
Figura 13. Expto 6: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC, CI ou CTX sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B.	50
Figura 14. Expto 7: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a extinção realizada no dia seguinte.	52
Figura 15. Expto 8: Efeito da inibição da síntese proteica no IL com ANI imediatamente após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B.	53
Figura 16. Expto 9: Efeito da inibição da síntese proteica no IL com ANI imediatamente após o CAC sobre a extinção realizada no dia seguinte.	55
Figura 17. Esquema ilustrando as conclusões do estudo.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANI = Anisomicina

ANOVA = Análise de Variância, do inglês *Analysis of Variance*

AP = Eixo Antero-posterior

BLA = Amígdala Basolateral, do inglês *Basolateral Amygdala*

CAC = Condicionamento Aversivo Contextual

CCA = Córtex Cingulado Anterior

CI = Choque Imediato

CPF = Córtex Pré-Frontal

CPFm = Córtex Pré-Frontal Medial

CPFvm = Córtex Pré-Frontal Ventromedial

CTX = Exposição ao Contexto Isolado

DL = Eixo Dorso-lateral

EC = Estímulo Condicionado

EI = Estímulo Incondicionado

EPM = Erro-Padrão da Média

Expto. = Experimento

ITCs = Células Intercalares da Amígdala, do inglês *Intercalated Cells*

LCE = Labirinto em Cruz Elevado

LTP = Potencialização de Longa Duração, do inglês *Long term potentiation*

ML = Eixo Médio-lateral

N = Número de Animais de um Grupo Experimental

MUS = Muscimol

IL = Córtex Infralímbico

PL = Córtex Prelímbico

TEPT = Transtorno de Estresse Pós-Traumático

VEI = Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	A História E Conceitos Fundamentais No Estudo Da Memória.....	15
1.2	O Condicionamento Pavloviano Como Abordagem Para O Estudo De Memórias Aversivas 18	
1.3	A Neurobiologia Da Memória	20
1.4	Características Neurobiológicas E Comportamentais De Memórias Traumáticas	31
1.5	Objetivos.....	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
3	RESULTADOS	43
3.1	Expto. 1: Efeito da inativação do córtex infralímbico durante a aquisição de memórias aversivas contextuais.....	43
3.2	Expto. 2: Efeito da inativação do córtex infralímbico após a aquisição de memórias aversivas contextuais.....	44
3.3	Expto. 3: Efeito da inativação do córtex infralímbico após a aquisição de memórias aversivas contextuais sobre comportamentos de tipo-ansiedade.....	46
3.4	Expto. 4: Efeito da inativação do córtex infralímbico após a aquisição de memórias aversivas contextuais de menor intensidade.....	47
3.5	Expto. 5: Efeito da inativação do córtex infralímbico após a aquisição de memórias aversivas contextuais sobre a sua expressão uma semana após o condicionamento.....	48
3.6	Expto. 6: Efeito da inativação do córtex infralímbico após os protocolos de choque imediato e exposição ao contexto isolado sobre os níveis de congelamento nos testes A e b	49
3.7	Expto. 7: Efeito da inativação do córtex infralímbico após a aquisição de memórias aversivas contextuais sobre sua extinção posterior	51
3.8	Expto. 8: Efeito da inibição da síntese proteica no córtex infralímbico após a aquisição de memórias aversivas contextuais	53
3.9	Expto. 9: Efeito da inibição da síntese proteica no córtex infralímbico após a aquisição de memórias aversivas contextuais sobre sua extinção posterior	54
4	DISCUSSÃO	57
4.1	Controle Do Infralímbico Sobre A Generalização E Intensidade Da Memória	57

4.2	Influência Da Atividade E Síntese Proteica No Infralímbico Durante A Consolidação Sobre A Extinção Subsequente.....	60
4.3	Aspectos Translacionais	63
4.4	Conclusões.....	65
5	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICE A (Artigo científico derivado desta dissertação) – Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation	81

A memória não é como deseja o coração. É apenas um espelho, mesmo que seja cristalino como Kheled-zâram.

Pelo menos, é isso que sente o coração de Gimli, o anão.

Tolkien, 1954

1 INTRODUÇÃO

1.1 A HISTÓRIA E CONCEITOS FUNDAMENTAIS NO ESTUDO DA MEMÓRIA

A utilização de informações prévias para o enfrentamento de situações perigosas ou resolução de problemas é o grande benefício obtido pela capacidade de formação de memórias. Para que isso ocorra, é imprescindível que sejam estabelecidos engramas, que são as modificações físicas que ocorrem no cérebro que permitem a posterior evocação da memória (SEMON, 1904). Essas alterações físicas ocorrem paralelamente em diversas regiões encefálicas (LASHLEY, 1950; TONEGAWA *et al.*, 2015), de maneira que as características funcionais destas durante o aprendizado determina a natureza da memória formada. Assim, o padrão de atividade de determinadas regiões durante períodos críticos do processamento de memórias interfere com a natureza da memória, e determinados padrões de atividade estão associados com a formação de memórias disfuncionais, ou traumáticas (PITMAN *et al.*, 2012).

As primeiras definições de memória, como o conceito de engrama mencionado acima, vieram majoritariamente da escola alemã de psicologia experimental, tendo grandes expoentes desde meados do século XIX, como Gustav Flechner, Hermann Ebbinghaus, e Georg Müller. Mas foi no início do século XX, que dois cientistas proeminentes pavimentaram o caminho para o estudo da memória. Apesar de Pavlov ser amplamente conhecido como pioneiro no estudo de aprendizado associativo e reflexos condicionados, o trabalho de todos esses pesquisadores foi essencial para o seu próprio. Richard Semon foi o primeiro cientista a cunhar um termo para o substrato físico da memória (*i.e.* engrama), e se preocupava muito com ponderações filosóficas a respeito dos mecanismos filogenéticos e ontogenéticos da memória. Em sua visão “Lamarckista”, Semon acreditava que aprendizado e memória eram importantes guias da evolução biológica (SEMON, 1904). É interessante mencionar que essa ideia, apesar de descartada durante praticamente um século, possui atualmente algum respaldo experimental, uma vez que existem evidências de que memórias podem ser transmitidas através de gerações em animais (DIAS E RESSLER, 2014; MISKA E RECHAVI, 2021) e plantas (MOLINIER *et al.*, 2006).

Enquanto isso, Pavlov, já havia ganhado até mesmo um prêmio Nobel em 1904 por suas pesquisas envolvendo o sistema gastrointestinal. Mas começou a se interessar pelo tema ao observar que em experimentos que envolviam a entrega de comida a cães, eles começavam a salivar antes mesmo de receber a comida, devido a pistas do ambiente. Com isso, Pavlov

acabou descrevendo um processo que influenciaria praticamente todos os estudos cognitivos sucedentes. Trata-se do condicionamento clássico, que consiste na associação entre estímulos neutros e estímulos biologicamente salientes ou incondicionados (EI), de maneira que o estímulo inicialmente neutro se torna um estímulo condicionado (EC). Com isso, o indivíduo cria uma relação de contingência na qual a apresentação do EC prediz o EI (PAVLOV, 1927). No entanto, é interessante perceber que Pavlov não foi o primeiro cientista a observar isso, mas sim o primeiro a descrever o processo de maneira sistemática e didática. Em seu livro *Die Mneme*, de 1904, o próprio Richard Semon já havia descrito o processo utilizando seus próprios termos, curiosamente, assim como no caso de Pavlov, ele também apresenta um exemplo sobre um cão, porém nesse caso o animal estaria sendo atingido por uma pedra atirada por um garoto. Trata-se de uma descrição completa do processo, onde o “grupo a” de estímulos seria o EC e o “grupo b” o correspondente a EI:

“Two groups of stimuli act upon the creature: (Group "a") the optical stimulus of the boys picking up stones and throwing them, and (Group "b") the tactual stimulus of the stones striking the skin, resulting in pain. Both stimuli groups act engraphically, for after the cessation of the synchronous and the acolutic effects of stimulation, the organism now appears permanently changed in relation to certain stimuli.” (SEMON, 1904)

Outro conceito interessante para o estudo da memória é a euforia, que seria o despertar de um engrama ou memória latente, resultando na sua expressão comportamental (SEMON, 1904). É importante perceber que a única forma de evidenciar a existência de uma memória em um indivíduo alheio ao observador é a partir de sua expressão comportamental. Os estímulos eufóricos (capazes de induzir a euforia) são aqueles que fazem com que o indivíduo evoque determinada memória e altere seu comportamento, sendo então estes necessários para a manifestação mnemônica (SEMON, 1904). Para que um estímulo seja eufórico, deve haver sobreposição entre a sua natureza e aquela dos estímulos que produziram o engrama, mas essa sobreposição raramente é total (SEMON, 1904; GHIRLANDA E ENQUIST, 2003). No entanto, não somente os elementos sensoriais podem disparar a euforia de um traço. Uma das principais contribuições nesse sentido veio de Endel Tulving, que trazendo a noção de memória semântica e euforia sinérgica, foi capaz de elaborar modelos que explicam a evocação de memória a partir de pistas conceituais, e não apenas sensoriais (TULVING E DONALDSON,

1972; TULVING, 1982). No entanto, atualmente o termo é pouco utilizado, sendo o processo normalmente descrito como evocação, apesar dos termos não serem exatamente sinônimos.

Também no início do século XX, havia psicólogos experimentais estudando os processos que sucedem a formação de memórias. Müller e Pilzecker, em um estudo de 1900, demonstraram que se um novo aprendizado é adicionado imediatamente após o aprendizado original, a eficiência na retenção do original é diminuída (MÜLLER E PILZECKER, 1900). Com isso, eles cunharam o termo “consolidirung” (consolidação), que diz respeito ao período subsequente ao aprendizado. Ora, já que um aprendizado adicional prejudica a retenção do inicial, os autores concluíram que deve haver um período após o aprendizado onde a memória fica suscetível a interferências (MÜLLER E PILZECKER 1900; LECHNER *et al.*, 1999). Com o passar do tempo, essa hipótese ganhou muita aceitação da comunidade científica, principalmente após a demonstração de que choques eletroconvulsivos (DUNCAN, 1949) ou lesões hipocampais realizadas após o treino (RUSSEL E NATHAN, 1946) causavam amnésia. De maneira importante, nesses estudos também ficou evidenciado que o grau de amnésia era inversamente proporcional a idade da memória, indicando que a consolidação é de fato um processo temporário.

Ainda na década de 1940, um grande passo para a compreensão da consolidação foi dado quando Donald Hebb introduziu a hipótese de formação da memória em duas etapas, ou “hipótese do duplo-traço”. Esta hipótese sugere que inicialmente o aprendizado gera um padrão de atividade em grupos de neurônios, sendo que a reverberação dessa atividade propicia a formação de memórias de curto prazo, e que se ela for mantida por tempo suficiente, há a consolidação de uma memória de longo prazo (HEBB, 1949; HERNANDEZ E ABEL, 2007). Apesar do grande avanço no entendimento da consolidação na primeira metade do século XX, ela ainda carecia de evidências diretas em termos de mecanismo. Em 1948, em seu livro “Functioning Of The Cytoplasm” (O Funcionamento do Citoplasma), o sueco Ludwik Monné, após ponderar sobre a semelhança da memória em relação à hereditariedade, assim como Semon o fez, sugeriu que o mecanismo comum entre estes dois processos deveria ser a síntese protéica, se tornando assim, o primeiro autor a sugerir a necessidade de síntese protéica para a formação de memórias (HERNANDEZ E ABEL, 2007):

“Thus, it is possible that synthesis of specific proteins is the essential physical phenomenon paralleling memory, fantasy, and intuition. This hypothesis is supported by the fact that protein synthesis occurs in strongly stimulated neurons and that cells are able to

“learn” to synthesize new specific proteins (antibodies, enzymes). Possibly the structure of the proteins constituting the cytoplasmic fibrils is changed during the function of the neurons. Instincts are inherited probably because the specific mode of protein synthesis of the respective neurons is also inherited.” (MONNÉ, 1948)

No entanto, apenas o avanço da farmacologia permitiu que essa hipótese fosse confirmada. Em 1960, Yarmolinsky e De La Haba descobriram que um antibiótico, a puromicina, inibe a síntese proteica em células de mamíferos, e no ano seguinte, Gorski e colaboradores demonstraram que injeções intraperitoneais de puromicina inibem a síntese proteica *in vivo* (YARMOLINSKY E DE LA HABA, 1960; GORSKI *et al.*, 1961). Assim, em 1962, Flexner e colaboradores observaram amnésia retrógrada (sobre um traço pré-estabelecido) após o tratamento com anisomicina, e no ano seguinte demonstraram que infusões intracerebrais (na região parahipocampal) tem efeito similar (FLEXNER *et al.*, 1962; FLEXNER *et al.*, 1963).

Os conceitos e teorias acerca da memória estão em constante “reconsolidação” na comunidade científica. Até hoje muito se discute sobre os conceitos fundamentais da neurobiologia da memória. No entanto, a enorme quantidade de evidências acumuladas por pesquisadores e a variedade de aplicações translacionais que foram frutos desses estudos ilustram a solidez e importância do campo. Todos os estudos subsequentes, como os feitos atualmente, só são possíveis devido aos cientistas do passado, como disse Isaac Newton:

"If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants."

(NEWTON, 1675)

1.2 O CONDICIONAMENTO PAVLOVIANO COMO ABORDAGEM PARA O ESTUDO DE MEMÓRIAS AVERISVAS

Para o estudo de memórias aversivas associativas, um dos protocolos mais amplamente utilizados é o do condicionamento clássico, descrito inicialmente por Ivan Pavlov em 1927, que consiste no pareamento de estímulos neutros ou inócuos com estímulos incondicionados (EI), sendo estes salientes por si só. O condicionamento pavloviano ou “clássico”, como ficou conhecido, é capaz de gerar aprendizado associativo nos mais diversos organismos: há evidências desde artrópodes até vertebrados (LONGO *et al.*, 1962; ZAVALA, 1968;

DAVIDSON E RICHARDSON, 1970 WATANABE E MIZUNAMI, 2007; GALILI *et al.*, 2011; HAWKINS E BYRNE, 2015;), e é claro, existe uma vasta literatura sobre condicionamento clássico em mamíferos. Por essas e outras razões, o condicionamento pavloviano é um método muito utilizado ao redor do mundo para estudar o processamento de memórias aversivas e apetitivas em nível comportamental e neurobiológico.

Há diferentes formas de realizar o condicionamento clássico, sendo que se pode condicionar contextos, quando os indivíduos simplesmente são expostos a um contexto e então recebem estímulos incondicionados, e pode-se também usar condicionamento à pistas específicas, como por exemplo tons sonoros, ou odores específicos. Os dois modos de condicionamento diferem entre si não só no protocolo comportamental, mas também no substrato neural envolvido (MAREN *et al.*, 2001). Além disso, também há uma dissociação entre condicionamentos apetitivos e aversivos, tanto no tipo de associação formada quanto nas bases neurais envolvidas (GOTTFRIED *et al.*, 2002; NASSER E MCNALLY, 2013), sendo os condicionamentos apetitivos aqueles que envolvem recompensas e os aversivos aqueles que envolvem estímulos nocivos.

Quando se estuda memórias aversivas, grande parte dos estudos é realizada utilizando choques nas patas como EI, e sons, odores, luzes ou contextos como EC. A principal avaliação comportamental realizada nos testes é o tempo de congelamento (*freezing*), caracterizado pela imobilidade dos animais quando se deparam com o EC após o condicionamento (BLANCHARD E BLANCHARD, 1969). O protocolo de condicionamento aversivo contextual (CAC), que é utilizado no presente estudo, está exemplificado na Figura 1.

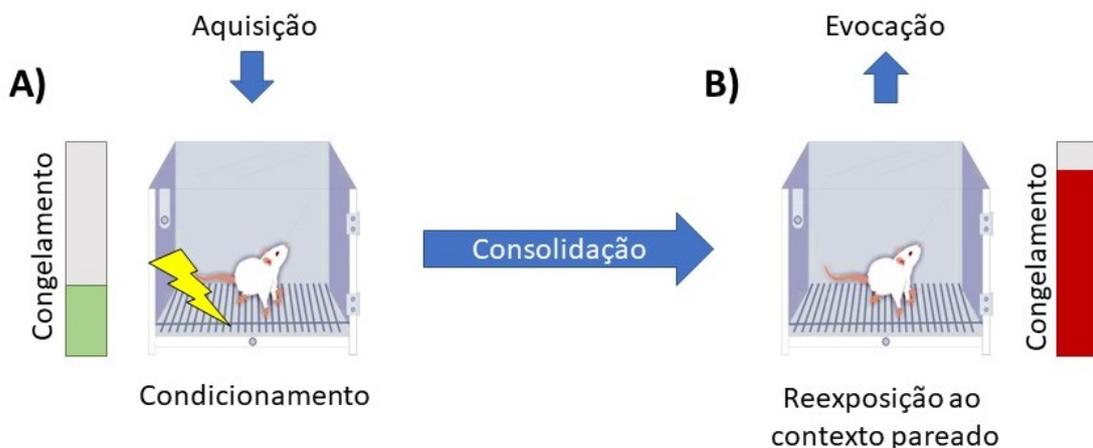


Figura 1. Condicionamento aversivo ao contexto. A) Antes da aquisição, os níveis de congelamento são baixos. Durante a sessão de condicionamento, o estímulo neutro (contexto) é pareado com o estímulo incondicionado (EI,

choques), tornando-se assim, o estímulo condicionado (EC), e passa a evocar respostas condicionadas. **B)** Sessão de evocação, na qual o contexto passa a evocar respostas condicionadas, e mesmo sem a presença do choque se observa níveis elevados de congelamento. Adaptado de Troyner, 2017.

1.3 A NEUROBIOLOGIA DA MEMÓRIA

1.3.1 Fases do processamento mnemônico

Inicialmente, quando uma informação é adquirida, ela fica armazenada em forma de memória de curto prazo. Durante as horas que sucedem o aprendizado, acontece a consolidação, que faz com que o traço se estabilize e promove a manutenção de memórias de longo prazo (LECHNER *et al.*, 1999). Essas fases da memória são bastante estudadas, e sabe-se que uma série de eventos moleculares, celulares, sistêmicos e comportamentais estão envolvidos no mecanismo pelo qual se formam as memórias (Figura 2). Quando consideramos o condicionamento pavloviano, o aprendizado envolve o estabelecimento de relações hierárquicas entre eventos em um dado contexto (RESCORLA, 1988). Do ponto de vista molecular, diferentes tipos de memória compartilham uma mesma lógica: dependem de um estágio inicial que é independente de síntese proteica (memória de curto prazo), e na sequência entram em um estado que só persiste se houver síntese de novas proteínas (KANDEL, 2012). O principal processo que ocorre em nível sináptico e permite esse remodelamento duradouro é conhecido por potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*), que foi descrito inicialmente por Bliss e Lomo, a partir do final da década de 1960 (LOMO, 1966; BLISS E LOMO, 1973). Acredita-se que a LTP é o substrato de diversas formas de memória, incluindo o condicionamento pavloviano ao contexto e a pistas (ROGAN *et al.*, 1997; MAREN, 1999).

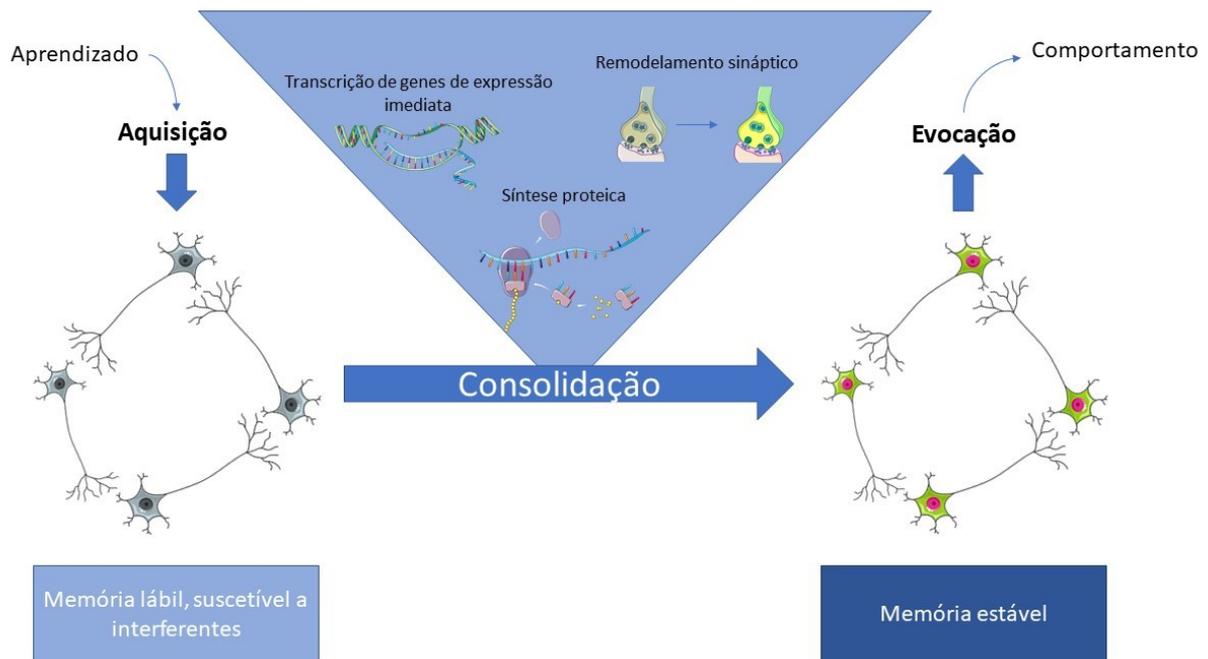


Figura 2. As fases iniciais do processamento mnemônico. Após a aquisição de um traço de memória, é necessária uma intrincada rede de interações que vão do nível genético ao sistêmico para que a memória se torne de longo prazo. Durante o aprendizado, a apresentação concomitante dos estímulos condicionado e incondicionado geram ativação de um conjunto de neurônios. Após a aquisição, a consolidação é necessária para que esses neurônios sofram plasticidade, modifiquem suas conexões, e tornem-se um engrama consolidado. Após a consolidação, as memórias de longo prazo podem ser evocadas e regular o comportamento de maneira duradoura.

Do ponto de vista neuroquímico, sabe-se que os receptores de glutamato do tipo AMPA e NMDA são muito importantes para a LTP e a consolidação. O bloqueio desses receptores no hipocampo impede a consolidação de determinados tipos de memórias aversivas (ABEL E LATTAL, 2001; CAMMAROTA *et al.*, 2004). Sabe-se que a ativação inicial desses receptores em neurônios glutamatérgicos pós-sinápticos leva a um aumento no cálcio intracelular que por sua vez gera ativação da proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMKII), o que gera uma cascata de eventos intracelulares (HERRING E NICOLL, 2016). É importante mencionar que além do glutamato, vários outros neurotransmissores como GABA, noradrenalina, dopamina, acetilcolina e endocanabinóides também tem efeito importante no processo de formação de memórias aversivas (IZQUIERDO *et al.*, 2016).

Essa série de eventos que ocorrem em nível celular durante o aprendizado induz a transcrição e tradução de genes de expressão imediata, conhecidos como IEGs (do inglês, *immediately early genes*). Um dos principais e mais estudados IEGs é o c-Fos, que tem sua expressão estimulada pelo aumento nos níveis de Ca^{2+} e AMP cíclico intracelulares, e é necessário para a formação do fator de transcrição AP-1, que regula uma série de eventos

celulares (CHIU *et al.*, 1988). No entanto, como e porque essa proteína é tão importante para a consolidação ainda não está bem elucidado (GALLO *et al.*, 2018). Outra peça molecular importante para aprendizado e memória é a proteína Arc, sua expressão é aumentada em resposta a uma série de eventos celulares, sendo inclusive promovida por outro IEG, o Egr1 (LI *et al.*, 2005). Ao contrário da c-Fos, sua função celular é diretamente associada com a plasticidade sináptica, sendo necessária para a sinalização envolvendo o BDNF (LEAL *et al.*, 2014), tráfego de receptores AMPA (CHOWDHURY *et al.*, 2006) e outros eventos celulares, assim seu papel na formação de memórias é mais claro (GALLO *et al.*, 2018). Todos esses processos subsidiam a formação do engrama, ou seja, permitem que informações sejam armazenadas em circuitos neuronais específicos e possam futuramente regular o comportamento.

Uma vez consolidadas, as memórias não são imutáveis (Figura 3), podendo sofrer atualizações, como é o caso da reconsolidação, onde após uma exposição curta ao EC, inibidores de síntese proteica são capazes de gerar amnésia retrógrada, assim como ocorre na consolidação (NADER, 2000). Outra maneira pela qual a expressão de uma memória pode ser alterada é através da extinção, que ocorre quando o EC é apresentado sucessivas vezes na ausência do EI (PAVLOV, 1927; MYERS E DAVIS, 2007). Na extinção, é possível perceber a diminuição nas respostas defensivas ao EC. Acredita-se que a extinção envolve a formação de uma nova memória, neutra, que suprime a memória aversiva estabelecida originalmente. Assim, devemos entender as memórias como entidades dinâmicas, que dependem de uma intrincada rede de interações que vão do nível molecular ao comportamental. Contudo, essa rede complexa normalmente culmina em eventos comuns nos neurônios, como é o caso da síntese proteica *de novo* – processo necessário para todas as fases da memória descritas acima: aquisição, consolidação, reconsolidação e extinção (INDA *et al.*, 2005).

Além disso, é importante ter em mente que após a consolidação inicial, por vezes conhecida como “consolidação sináptica”, os processos de remodelamento sináptico continuam ocorrendo, e isso envolve uma mudança nas estruturas encefálicas que subsidiam a memória. Sabe-se que com o passar do tempo, o hipocampo torna-se menos necessário para a evocação, ao contrário do córtex (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). Esse fenômeno é normalmente chamado de “consolidação sistêmica” (DUDAI, 2004), e está correlacionado com a mudança de determinadas características mnemônicas que ocorrem com o passar do tempo, como aumento de generalização (ver seção 1.4; WILTGEN E SILVA, 2007) e maior resistência a

interferências como reconsolidação e extinção (FRANKLAND *et al.*, 2006; TSAI E GRÄFF, 2014).

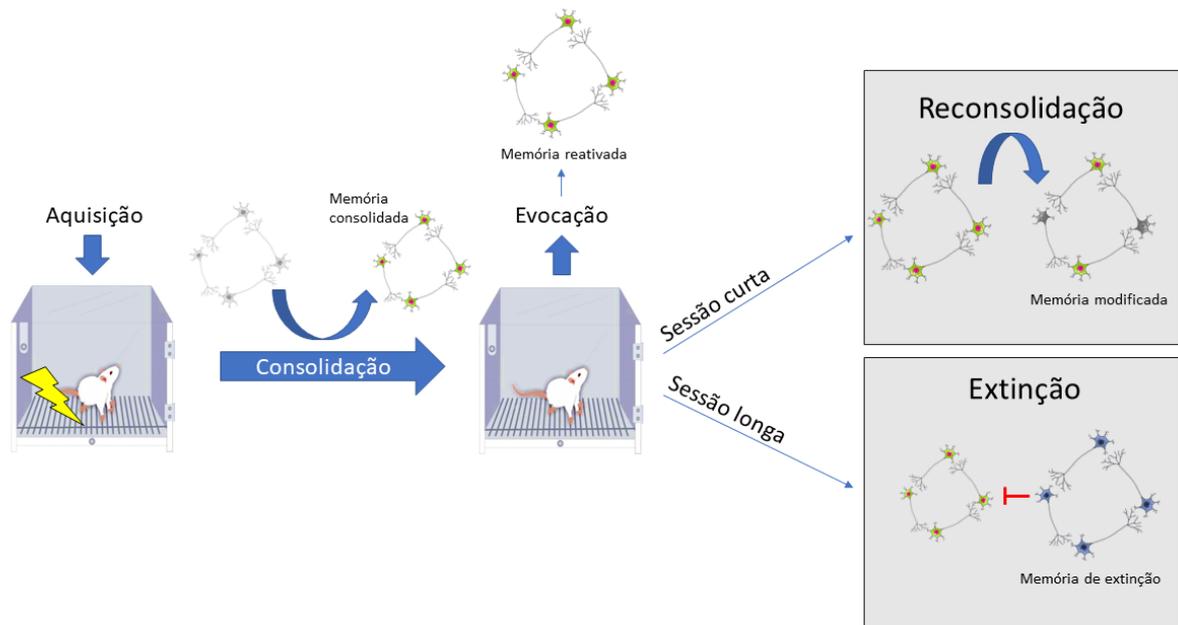


Figura 3. Atualização mnemônica. Uma vez consolidadas, as memórias podem sofrer atualizações, como a reconsolidação e a extinção. Quando a memória é evocada, ela pode ser modificada de acordo com a natureza da sessão de evocação. De maneira geral, sessões curtas induzem a reconsolidação do traço, enquanto longas sessões de exposição ao EC induzem a formação de uma nova memória – a memória de extinção, que suprime a expressão da memória original. Os neurônios verdes na figura ilustram a memória aversiva, o traço vermelho significa inibição, e os neurônios azuis ilustram a memória de extinção.

1.3.2 Principais regiões encefálicas envolvidas no processamento de memórias aversivas e reações de defesa

Quando analisamos o nível molecular/intracelular, assume-se que todos os tipos de memórias devem induzir mecanismos similares, como a LTP (KANDEL, 2012). No entanto, nos níveis celular e sistêmico, diferentes tipos de aprendizado recrutam diferentes regiões e subtipos celulares no cérebro de mamíferos. Apesar de hoje em dia a frenologia ser considerada uma teoria extremamente antiquada e falha, sabe-se que diversas regiões encefálicas possuem funções específicas (GENON *et al.*, 2018). No contexto das respostas defensivas, memórias aversivas e seus substratos encefálicos, alguns conceitos básicos que ainda são válidos hoje foram estabelecidos no início do século passado. Após estudos pioneiros de Claude Bernard, Langley, e vários outros fisiologistas, foi obtido uma noção clara de como funciona o sistema

nervoso simpático, aquele que é ativado em situações aversivas, e iniciarem-se as primeiras especulações de como o córtex cerebral modula esse sistema (BARD, 1929).

Com essa base teórica, Bard conduziu um estudo que teve grande impacto na neurobiologia das emoções – ele demonstrou que cães e gatos que tiveram o córtex desconectado do tronco encefálico apresentavam um estado constante chamado de “ira fictícia” (BARD, 1934). Com isso, em conjunto com o famoso caso de Phineas Gage (ver seção 1.2.3), foi estabelecida a noção que se mantém até hoje de que o córtex cerebral não é uma região crucial para a sobrevivência. No entanto, ele é fundamental para o controle do comportamento, pois age modulando (normalmente de forma inibitória) regiões subcorticais que são responsáveis pela execução de comportamentos de subsistência, como alimentação, luta ou fuga, sexo, etc. É interessante mencionar que a ideia de que as regiões superiores controlam as inferiores de forma inibitória já estava presente nos pensamentos de John Hughlings Jackson, expostos em sua *Croonian Lecture*, em 1884 (YORK E STEINBERG, 2006). Jackson acreditava que as regiões mais ancestrais e basais do cérebro realizavam a primeira representação de estímulos sensoriais, um segundo grupo de regiões intermediárias realizava uma re-representação, e as regiões superiores como o córtex agiam fazendo uma re-re-representação do estímulo (YORK E STEINBERG, 2006). Com isso, surgiram as primeiras noções de processamento sequencial e paralelo e hierarquia entre regiões encefálicas no cérebro, mas até meados do século XX, pouco se avançou sobre as regiões responsáveis pela formação e armazenamento de memórias.

Na década de 1950, um paciente que sofria de epilepsia do lobo temporal teve a formação hipocampal removida e mudou a história da neurobiologia da memória. Ele ficou conhecido como paciente HM, e suas crises epilépticas diminuíram significativamente após a cirurgia, no entanto ele apresentava sérios problemas de memória (CORKIN, 2002). Com isso, os pesquisadores que estudavam este caso clínico concluíram que o hipocampo e/ou regiões adjacentes deveriam ser responsáveis pela formação de novas memórias, uma vez que memórias antigas do sujeito persistiam intocadas (SCOVILLE E MILLNER, 1957; CORKIN, 2002). No contexto da formação de memórias aversivas, porém, existe uma região tão ou mais importante do que o hipocampo: a amígdala. A amígdala não parece ter um papel tão geral na formação de memórias, mas é peça fundamental na formação de memórias com conteúdo emocional (McGAUGH *et al.*, 1996). Esta região parece ser um importante centro de processamento e integração entre estado interno do indivíduo e pistas sensoriais. Na amígdala existe uma grande influência de hormônios relacionados ao estresse, como noradrenalina e

glicocorticoides, e ao mesmo tempo diversos aferentes de regiões sensoriais e associativas, o que subsidia a capacidade da amígdala de codificar relações de contingência entre estímulos (McGAUGH *et al.*, 1996; MAREN, 2001).

Atualmente sabe-se o hipocampo é responsável pela representação contextual, sendo necessário para aprendizados que envolvem relação espacial ou temporal entre eventos ou objetos (HOWARD E EICHENBAUM, 2015). Por outro lado, para aprendizados onde a associação envolve apenas um som e um choque a participação do hipocampo não é imprescindível, sendo a amígdala suficiente (ABEL E LATTAL, 2001). No entanto, a amígdala é necessária tanto para o condicionamento aversivo auditivo (PHILLIPS E LEDOUX, 1992) quanto para o condicionamento aversivo contextual (MAREN E FANSELOW, 1995). Com isso, acredita-se que no condicionamento aversivo contextual, assim como no condicionamento auditivo, é na amígdala que ocorre a associação EC-EI: a amígdala basolateral (BLA, do inglês *basolateral amygdala*) é responsável pela integração de pistas sensoriais e por repassar a informação a amígdala central, que por sua vez promove a ativação do hipotálamo e tronco encefálico para a evocação de respostas defensivas (MAREN, 2001; PELLMAN E KIM, 2016).

Já o papel do hipocampo, como mencionado acima, é mais relacionado com a representação contextual ou da configuração dos elementos presentes no treino, sendo importante no condicionamento aversivo contextual ou naqueles condicionamentos onde o som e o choque são espaçados (ABEL E MATTAL, 2001; MAREN, 2001). Desse modo, o papel do hipocampo no condicionamento aversivo contextual é integrar os elementos contextuais e os converter a um sinal que é enviado para a amígdala como uma representação de um EC (MAREN, 2001). É importante ter em mente que além dessas regiões onde ocorrem as associações entre EC e EI, existem regiões cruciais para a formação de memórias aversivas, como por exemplo a matéria cinzenta periaquedutal (MOTTA *et al.*, 2017), região por onde o sinal aversivo deve ser processado para que alcance as regiões superiores responsáveis pelo armazenamento de memórias em si (PELLMAN E KIM, 2016). Outra região importante nesse contexto é o tálamo, em especial o núcleo reuniens, que é necessário para a comunicação entre o córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (CASSEL *et al.*, 2021), e o núcleo paraventricular, necessário para a evocação de memórias de longo prazo (DO-MONTE *et al.*, 2015). Além destas áreas, diversas outras regiões subcorticais como o núcleo leito da estria terminal (CRESTANI *et al.*, 2013), hipotálamo (SILVA *et al.*, 2016), habênula e área tegmental ventral (LAMMEL *et al.*, 2012) são importantes para a expressão de comportamentos defensivos.

Resumidamente, essas são as regiões responsáveis pela formação de memórias aversivas e execução de comportamentos defensivos. No entanto, elas sofrem importante modulação de regiões superiores e mais recentes na filogenia, como é o caso do CPF, assunto da seção seguinte.

1.3.3 Papel do córtex pré-frontal medial no processamento de memórias aversivas, com enfoque para a porção infralímbica

O CPF de mamíferos é caracterizado como a porção do córtex cerebral que recebe aferentes do tálamo médio dorsal (ROSE E WOOSLEY, 1948; CARLÉN 2017). Estudos iniciais envolvendo lesões desta região do cérebro em roedores já sugeriam que esta não seja uma região imprescindível para a formação de memórias aversivas (LUBAR, 1964), e esta visão persiste até hoje (GILMARTIN *et al.*, 2014). No entanto, sabe-se que lesões no córtex pré-frontal medial (CPFm) podem acarretar em alterações no processamento após o aprendizado inicial, durante a extinção por exemplo (MORGAN *et al.*, 1993). Deste modo, acredita-se que o CPF é uma região prescindível para a aquisição, mas necessária para determinados tipos de modulação que as memórias aversivas normalmente sofrem. Essa ideia faz sentido quando consideramos a noção geral de que o CPF age como um maestro do cérebro, regulando uma infinidade de processos, mas não sendo necessário para a execução de comportamentos básicos de subsistência, como respiração, alimentação, luta ou fuga, entre outros. Isso é ilustrado no caso de Phineas Gage, sujeito que teve uma grande lesão no CPF, mas continuava vivendo e não tinha problema com comportamentos básicos de subsistência. No entanto, após a lesão, Gage apresentou severas mudanças de comportamento, se tornando mais impulsivo e apresentando menor controle inibitório de suas ações (O'DRISCOLL E LEACH, 1998). Assim, a noção predominante na literatura é a de que o CPF é uma região crucial para funções cognitivas como comportamento direcionado a objetivos, flexibilidade comportamental, avaliação contextual, categorização, entre outras (MILLER E COHEN, 2001).

Dentro do CPF, o CPFm parece ser componente crucial para a modulação de memórias aversivas (GIUSTINO E MAREN, 2015). Em roedores, a região é normalmente dividida em três subregiões, sendo elas os córtices cingulado anterior (CCA), prélimbico (PL) e IL (Figura 4), podendo ainda o córtex dorsopeduncular estar incluso como uma quarta subregião do CPFm. CCA e PL são as regiões mais dorsais do CPFm, e o aumento de atividade nestas regiões promove mais respostas defensivas e a formação de memórias aversivas mais robustas e/ou

generalizadas (TANG *et al.*, 2005; JHANG *et al.*, 2018; VANVOSSSEN *et al.*, 2017). Além disso, inibição de síntese protéica destas regiões em momentos cruciais do processamento mnemônico ou expressão de memórias aversivas gera amnésia (EINARSSON E NADER, 2012; RIZZO *et al.*, 2017). O IL, por sua vez, atua de maneira antagônica, ou seja, maior atividade na região está associada com diminuição da expressão de respostas defensivas condicionadas, e maior especificidade mnemônica (DO-MONTE *et al.*, 2015; SCARLATA *et al.*, 2019).

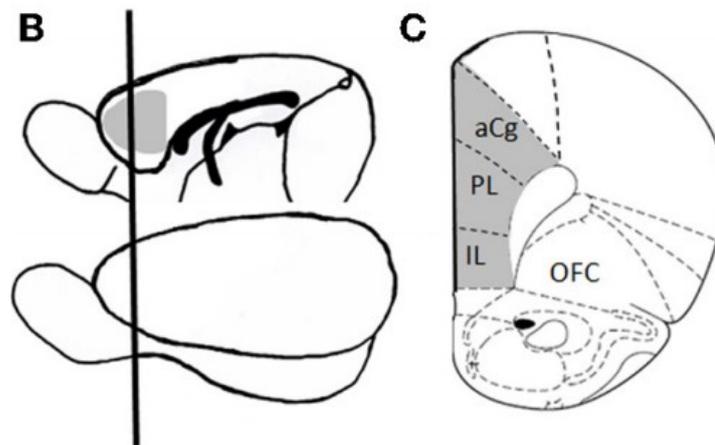


Figura 4. O córtex pré-frontal medial do rato. A) visão lateral do encéfalo de rato, com o CPFm em cinza B) visão coronal do CPFm de ratos. aCg: córtex cingulado anterior; PL: prélimbico; IL: infralimbico. Adaptado de Bizon *et al.*, 2012.

Inicialmente, o IL foi descrito por Rose e Woosley, em 1948 como “*area infralimbica*”, que seria a “faixa estreita localizada ventralmente em relação a área precentral agranular do córtex pré-frontal”, que corresponde atualmente ao CCA e PL (ROSE E WOOSLEY, 1948). Nos trinta anos seguintes a descrição da região, pouco aumentou o conhecimento acerca de sua função. Estudos de lesão na década de 1960 trazem as primeiras elocubrações sobre um possível envolvimento em memórias aversivas e espaciais, mas como as lesões não apresentavam precisão espacial, não se pode correlacionar os efeitos comportamentais nem mesmo ao CPFm especificamente, pois as lesões englobavam grandes áreas corticais (LUBAR, 1964; AIN *et al.*, 1969). Mas foi na década de 1980 que a região começou a ser amplamente estudada, e lesões mais restritas ao ACC, PL ou IL demonstraram que o CPFm é importante para reconhecimento de objetos (BECKER E OLTON, 1980) e memória espacial (BECKER *et al.*, 1980), além disso suas projeções aferentes foram descritas, inicialmente em gatos (ROOM *et al.*, 1985). Mais tarde foi demonstrado que a porção ventral

do CPFm (incluindo PL e IL) é necessária para extinção de memórias aversivas no protocolo de condicionamento pavloviano (MORGAN *et al.*, 1993).

Desde então, a relação entre CPFm (em especial a sua porção infralímbica) e extinção de memórias aversivas vem sendo estudada extensivamente. Em um importante trabalho, Milad e Quirk demonstraram que a evocação da memória de extinção está correlacionada com aumento no disparo de neurônios do IL e que a estimulação desta região em animais que não passaram por extinção também é capaz de induzir diminuição de respostas defensivas (MILAD E QUIRK, 2002). Esses resultados foram replicados e a questão foi aprofundada em diversos estudos, incluindo ativação e inativação optogenética durante o treino e evocação da extinção (DO-MONTE *et al.*, 2015). Mais especificamente, a inativação optogenética desta região durante o treino de extinção não afeta o comportamento agudamente, mas impede a formação de memórias de extinção, e quando a mesma inativação é realizada durante o teste de evocação após a extinção, não há efeito (DO-MONTE *et al.*, 2015). Quando o IL é inativado farmacologicamente, ou a síntese proteica na região é inibida após a sessão de extinção (durante sua consolidação) também há prejuízo no aprendizado (LAURENT E WESTBROOK, 2009; AWAD *et al.*, 2015). Sabe-se também que lesões restritas ao IL também impedem o aprendizado de extinção (QUIRK *et al.*, 2000), assim como observado inicialmente por Morgan e colaboradores em estudos usando lesões no CPFm como um todo (MORGAN *et al.*, 1993). Existem até mesmo evidências de que a infusão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no IL, mesmo na ausência da sessão de extinção, produz efeito similar a ela (PETERS *et al.*, 2010, ROSAS-VIDAL *et al.*, 2014). Assim, está bastante solidificada na literatura a visão de que o IL é necessário e suficiente para a extinção de memórias aversivas (ROSAS-VIDAL *et al.*, 2014; GIUSTINO E MAREN, 2015).

Acredita-se, ainda, que o substrato neural pelo qual o IL contribui para o aprendizado de extinção seja a presença de conexões monossinápticas com as células intercalares (ITC, do inglês *intercalated cells*) da amígdala (AMIR *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011; SIERRA-MERCADO *et al.*, 2011). As ITCs são um grupo de neurônios GABAérgicos que inibem a amígdala central, e conseqüentemente as respostas defensivas (AMIR *et al.*, 2011; BLOODGOOD *et al.*, 2018; MAREK *et al.*, 2018). Ademais, a amígdala basolateral (BLA) também possui dois grupos funcionalmente distintos de neurônios: os que projetam para o PL, que têm sua atividade aumentada durante o condicionamento, e outros que projetam para o IL, que têm sua atividade aumentada durante a extinção (KRABBE *et al.*, 2018). Desse modo, a “conversa” entre IL e amígdala parece ser crucial para que a extinção ocorra de maneira adequada. Apesar da enorme

quantidade de estudos correlacionando IL e extinção, uma quantidade menor de estudos se dedicou a entender o papel desta região durante o aprendizado aversivo original, talvez pelo fato de que lesões na região não impedem a formação da memória e pouco alteram o comportamento antes da extinção do traço. A seção a seguir se dedica a explorar o que a literatura da área considera sobre o tema.

1.3.4 Evidências da participação do córtex infralímbico nos processos iniciais de formação de memórias aversivas

Como já mencionado, o IL é uma região prescindível para que a aquisição de memórias aversivas ocorra. No entanto, é necessário para a modulação destas após a sua consolidação. Uma quantidade relativamente menor (em relação aqueles que estudaram extinção) de estudos se dedicou a explorar o papel do IL especificamente durante a aquisição/consolidação de memórias aversivas.

Nesse sentido, sabe-se que o condicionamento aversivo ao contexto induz uma redução na excitabilidade de neurônios do IL, o que é revertido pelo aprendizado de extinção (SANTINI *et al.*, 2008). Esse resultado, que foi posteriormente replicado (SOLAR-CEDEÑO *et al.*, 2016), sugere que a redução na excitabilidade de neurônios do IL pode ser um dos mecanismos que subsidiam a consolidação de memórias aversivas. Ainda, o fato de que a redução na excitabilidade é revertida após a extinção sugere que o IL pode ter um papel regulatório desde a aquisição até a extinção do traço (RABINAK *et al.*, 2008). Essa capacidade plástica apresentada pelo IL, onde sua atividade pode ser modulada de maneira bidirecional, pode ser um dos substratos neurais que permitem que indivíduos tenham flexibilidade ao se deparar com pistas de perigo (SOTRES-BAYON E QUIRK, 2010).

Além de registros eletrofisiológicos, existem mais evidências que indicam que o IL pode de alguma maneira modular a consolidação da memória. Um estudo que avaliou o efeito de radiação gama durante a consolidação de memórias aversivas contextuais observou que a radiação aumentou os níveis de congelamento. Isso está correlacionado com uma diminuição da expressão de c-Fos no IL (KUGELMAN *et al.*, 2016). Além disso, existem evidências de que a Arc (outra proteína importante na plasticidade sináptica) tem sua expressão aumentada no IL após o condicionamento de medo contextual ou esquiva inibitória (ZHANG *et al.*, 2011; TROYNER *et al.*, 2018). Torres-Garcia e colaboradores também demonstraram que a

inativação do IL com tetrodotoxina durante a consolidação do treino de esquiva inibitória gera prejuízo na retenção do traço (TORRES-GARCIA *et al.*, 2017).

Para a discriminação entre contextos, o IL também parece ser importante. Estudos analisando a generalização contextual (sobre generalização, ver seção a seguir) apresentam resultados interessantes: lesão ou inativação permanente do IL realizadas antes do treino geram aumento de generalização contextual (ZELIKOWSKY *et al.*, 2013; XU E SÜDHOF, 2013). É claro que, como já mencionado, estudos de lesão carecem de precisão temporal, pois pode ser que o efeito observado seja devido a alterações tanto na aquisição/consolidação como na expressão da memória. Ainda assim, os importantes estudo de Zelikowsky e colaboradores, e Xu e Südhof são uns dos primeiros a chamar atenção sobre a possibilidade de o IL modular a generalização de memórias aversivas. Existem também evidências de que a ativação do IL durante a consolidação de memórias apetitivas contextuais prejudica a discriminação contextual (RIAZ *et al.*, 2019). Outro estudo que indica que o IL pode ser importante na diferenciação entre contextos seguros e perigosos é o de Sangha e colaboradores, onde foi demonstrado que a inativação do IL gera prejuízo na discriminação entre pistas de segurança e perigo (SANGHA *et al.*, 2014). No entanto, este último estudo não revela nada sobre o papel do IL nos períodos iniciais de formação da memória, uma vez que os tratamentos foram realizados imediatamente antes do teste, quando a memória já estava consolidada. Ainda assim, é importante pois é mais um indicativo do papel do IL na regulação da generalização de memórias.

Existem também evidências de que a atividade do IL durante os períodos iniciais de formação da memória possa ser importante para garantir que as memórias aversivas possam ser futuramente extintas. Utilizando o condicionamento do piscar de olhos em coelhos, Oswald e colaboradores demonstraram que a inativação do IL durante a aquisição prejudica a extinção futuramente (OSWALD *et al.*, 2015). Além desse resultado, foi demonstrado que o bloqueio da expressão de c-Fos no IL, ou das conexões IL-PL 12 h após a aquisição, durante uma fase tardia da consolidação, também impede que as memórias sejam extintas apropriadamente (MUKHERJEE E CARONI, 2018). Os autores desse estudo sugerem, com isso, que o engajamento do IL na extinção começa 12 h após o aprendizado original. Assim, há uma série de estudos que apontam a possibilidade de o IL estar envolvido nas fases iniciais de processamento de memórias aversivas.

1.4 CARACTERÍSTICAS NEUROBIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS DE MEMÓRIAS TRAUMÁTICAS

O valor adaptativo das memórias aversivas é incontestável, sendo elas necessárias para a manutenção da vida animal na terra (MAREN, 2001). No entanto, muitas vezes na natureza os animais expressam reações defensivas com alta intensidade e frequência, o que os impede de realizar comportamentos básicos como o forrageamento, que é a busca por recursos (BROWN *et al.*, 1999). Assim, o medo de predadores ou ambientes ameaçadores impõe uma forte restrição sobre a dinâmica do forrageamento ótimo em ambiente ecológico (BROWN *et al.*, 1999). Com isso, existem duas relações de *trade-off* importantes nesse sentido: a relação entre iminência de perigo e a necessidade alimentar (SEARLE *et al.*, 2008), e a relação entre exploração de ambientes já conhecidos e a busca de novos ambientes (ADDICOTT *et al.*, 2017). Ora, ambas as relações ilustram o fato de que o medo excessivo, mesmo em ambiente ecológico, é um fator que impõe restrições para a adaptação ao meio – em humanos isso toma proporções ainda maiores.

As memórias traumáticas estão no cerne do desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (PITMAN *et al.*, 2012). Estas memórias impõe uma séria restrição sobre a qualidade de vida, uma vez que imprimem um padrão de comportamento totalmente enviesado para maior evitação de situações perfeitamente seguras. No entanto, é importante perceber que mesmo em humanos as memórias aversivas tem papel fundamental para a manutenção da vida – são elas que fazem com que não tomemos atitudes que nos coloquem em perigo. Existe um limiar entre as memórias aversivas adaptativas e aquelas disfuncionais, e apesar de não haver um modo quantitativo de avaliar esse ponto de corte, alguns fatores marcantes indicam quando uma memória passa a ser traumática. Talvez os principais marcadores nesse sentido sejam a generalização e “rigidez” (resistência à extinção ou reconsolidação) excessivas (PITMAN *et al.*, 2012; MAREN E HOLMES, 2015; MOREY *et al.*, 2015).

A generalização é a capacidade de um indivíduo responder para estímulos diferentes do condicionado (GHIRLANDA E ENQUIST, 2003). Assim como as memórias aversivas, a generalização também tem papel adaptativo fundamental, pois permitem que animais usem informações prévias para situações similares em um mundo onde raramente uma mesma situação ocorre duas vezes de maneira idêntica (GHIRLANDA E ENQUIST, 2003). No entanto, também há um nível ótimo de generalização, e quando este é excedido, o indivíduo

passa a expressar respostas defensivas perante situações muito diferentes da original. Essa é uma característica central no TEPT: evitação e sensibilidade excessiva em relação a quaisquer contextos ou pistas que remetam, mesmo que de maneira distante, à memória traumática (MOREY *et al.*, 2015). Com isso, a generalização excessiva de memórias traumáticas impõe uma séria restrição para a tomada de decisões cotidianas e impede que pacientes com TEPT realizem diversas atividades básicas do dia-a-dia.

Como mencionado acima, outro fator marcante do TEPT é a rigidez excessiva das memórias traumáticas. Trata-se de uma falta de flexibilidade comportamental em relação a estas memórias, pois as respostas condicionadas dificilmente são extintas e os traços apresentam resistência a reconsolidação (PITMAN, 2011; MAREN E HOLMES, 2015). Esse fato gera uma séria dificuldade no tratamento destes pacientes, uma vez que psicólogos e psiquiatras que atuam junto a estes pacientes tem um trabalho difícil ao tentar atualizar as memórias dos pacientes. Na verdade, não existe protocolo padrão para o tratamento do TEPT que seja capaz de extinguir ou apagar totalmente o trauma com larga eficácia, apesar de terapias baseadas em exposição induzirem uma melhora significativa em pacientes (WATKINS *et al.*, 2018). Muitas vezes, os tratamentos que incluem fármacos empregam o uso de antidepressivos e ansiolíticos para amenizar os sintomas do TEPT, mas ainda são necessários tratamentos que atuem no cerne do problema: a memória.

Assim, é essencial entender o que leva à formação de memórias traumáticas. Apenas uma fração (<25%) das pessoas expostas a um evento traumático desenvolvem TEPT (YEHUDA E LEDOUX, 2007). O que esses sujeitos possuem em comum? Seriam características genótípicas ou alguma atividade aberrante em alguma região encefálica? Sobre isso, sabe-se que gêmeos monozigóticos tem maior concordância em relação ao risco de TEPT do que gêmeos dizigóticos (STEIN *et al.*, 2002). No entanto pouco se sabe sobre como, e quais fatores genéticos podem levar a uma maior pré disposição ao TEPT (CORNELIS *et al.*, 2010). A neurobiologia do TEPT, por sua vez, é mais conhecida, e sabe-se que pacientes com TEPT apresentam maior atividade na amígdala e hipoatividade no hipocampo e CPFm (PITMAN *et al.*, 2012), além de um menor índice de correlação na atividade entre amígdala e CPFm, o que pode indicar uma desconexão da modulação da amígdala pelo CPFm (SHIN *et al.*, 2005). Contudo, há grande dificuldade para determinar se esses são fatores de risco ou consequências do TEPT (YEHUDA E LEDOUX, 2007).

No que diz respeito ao infralímbico, sabe-se que seu homólogo humano é a área 25 do mapa de Brodmann, conhecida como córtex cingulado anterior subgenuar posterior (ÖNGÜR

et al., 2003; DREVETS *et al.*, 2008). No entanto, em muitos estudos, se faz a correlação mais geral entre IL e córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm), que é uma região que contempla a área 25 e outras, como a 32, homóloga ao PL (MYERS-SCHULZ E KOENIGS, 2012). Isso dificulta a translação direta dos dados entre roedores e humanos. Contudo, sabe-se que o CPFvm, em especial a área 25 está afetada no TEPT, apresentando hipoatividade (BREMNER *et al.*, 1999) e até mesmo redução no volume (RAUCH *et al.*, 2003), o que está correlacionado com hiperatividade da amígdala e sugere que um fator importante no desenvolvimento do TEPT seja um menor controle da amígdala pelo CPFvm (KOENIGS *et al.*, 2007). Entretanto, utilizando uma amostra única de pacientes com TEPT que apresentam lesões no CPFvm, um estudo demonstrou que estas lesões diminuem sintomas de TEPT (KOENIGS *et al.*, 2007). Esses resultados conflitantes podem ser devido a especificidade do local da lesão, uma vez que diferentes regiões do CPFvm apresentam diferenças no que diz respeito ao controle da amígdala e de outras regiões. Assim, para o melhor entendimento do envolvimento do IL/área 25 na patofisiologia do TEPT, são necessários estudos longitudinais com precisão temporal e espacial.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é investigar qual o papel do córtex infralímbico de ratos na consolidação de memórias aversivas contextuais.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de inativação temporária do IL com muscimol antes do condicionamento aversivo contextual;
- Avaliar o efeito de inativação temporária do IL com muscimol durante a consolidação sobre a intensidade e generalização contextual de memórias aversivas;
- Avaliar o efeito da inativação temporária do IL após o condicionamento sobre comportamentos de tipo-ansiedade;
- Avaliar se os possíveis efeitos observados dependem de aprendizado associativo;
- Avaliar o efeito de inativação temporária do IL com muscimol durante a consolidação sobre a susceptibilidade à extinção;
- Avaliar o efeito do bloqueio da síntese proteica no IL com anisomicina durante a consolidação sobre a intensidade e generalização contextual de memórias aversivas;
- Avaliar o efeito do bloqueio da síntese proteica no IL com anisomicina durante a consolidação sobre a susceptibilidade à extinção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram incluídos no estudo 213 ratos Wistar machos, com idade de 90 a 130 dias e pesando 250-400 gramas durante os experimentos. As caixas-moradia onde os animais permaneceram contém serragem comum e abriga 3-5 animais cada, tendo as seguintes dimensões: (36 x 30 x 15). Os ratos receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período em que estiveram no biotério, foram mantidos num ciclo claro/escuro de 12 h começando as 7:00 h, a temperatura ambiente foi mantida em 21 ± 2 °C. Este estudo faz parte do projeto de número 9263110516, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC.

2.2 DROGAS

Muscimol (MUS; 0,46 µg/µl; Sigma-Aldrich, EUA), um agonista GABA_A, foi dissolvido em PBS 0,1M. O MUS é uma droga muito utilizada como ferramenta na pesquisa básica em neurobiologia pois possui a capacidade de reduzir de maneira rápida e eficaz a atividade neuronal da região encefálica onde é injetado. A literatura que relata que o MUS é capaz de reduzir a atividade neuronal em mais de 80% a partir de 2 minutos após a infusão, atinge seu pico de efeito aos 25 minutos, e mantém as células inativadas por pelo menos 2 horas (EDELIN *et al.*, 2002). A dose utilizada neste trabalho foi baseada em estudos prévios publicados pelo nosso laboratório (STERN *et al.*, 2014; TROYNER *et al.*, 2018).

Anisomicina (ANI; 100 µg/µl; Sigma-Aldrich, EUA), um inibidor de síntese proteica, foi inicialmente dissolvido em HCl 1M, teve seu pH ajustado para 7,2 com auxílio de NaOH, e foi então levado a concentração final de 100 µg/µl em PBS 0,1M. Inibidores de síntese proteica são uma ferramenta clássica para o estudo da consolidação de memórias, e a ANI é uma das drogas mais utilizadas nesse sentido. Sabe-se que depois de poucos minutos após a infusão intracerebral de ANI a síntese proteica é fortemente reduzida localmente, e esse efeito perdura até pelo menos 3 horas (WANISCH E WOTJAK, 2007). A dose utilizada neste estudo foi baseada em estudos que utilizaram infusão de ANI no IL (SANTINI *et al.*, 2004; AWAD *et al.*, 2015) e em experimentos piloto realizados no laboratório.

Como ambas as drogas foram dissolvidas em PBS, este foi usado como veículo em todos os experimentos.

2.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a cirurgia estereotáxica, os ratos foram anestesiados com uma solução contendo xilazina (10mg/ml/kg) e ketamina (100mg/ml/kg). Uma vez anestesiados, os animais tiveram os pêlos da região dorsal da cabeça cortados e foram posicionados no centro do aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA), fixados em barras auriculares. A assepsia do campo cirúrgico foi realizada com solução de álcool iodado 2%, e uma solução contendo lidocaína 3% e adrenalina 1:50000 (Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea no local antes da realização da incisão. Duas cânulas-guia de aço foram implantadas, visando o IL, nas seguintes coordenadas a partir do Bregma: AP + 3,2 mm ; ML \pm 0,5 mm ; DV - 2,1 mm, obtidas a partir de consulta ao atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2007) e experimentos piloto do laboratório. As cânulas possuíam 11 mm de comprimento e foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22G; 25,0 x 7,0 mm). Ambas são fixadas no crânio com o auxílio de parafusos de aço e acrílico autopolimerizante e foram obstruídas com um mandril removível para evitar entupimento. Após a cirurgia os animais receberam o anti-inflamatório e analgésico Banamine® (2,5 mg/ml/kg), permaneceram numa cama aquecida por pelo menos 30 minutos após a cirurgia e então passaram por um período de recuperação de pelo menos 10 dias antes da utilização das cânulas para infusões.

2.4 MICROINJEÇÃO CENTRAL

A microinjeção de drogas ou veículo no córtex IL foi realizada através de agulhas de 14 mm de comprimento, confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30G, 31 mm) conectadas a um tubo de polietileno acoplado a uma microsseringa (Hamilton, EUA) preenchida com água destilada. Uma bolha de ar foi mantida entre a água e a solução a ser injetada, permitindo a visualização do deslocamento da solução a ser injetada durante as infusões.

No momento da microinjeção os animais foram imobilizados, o mandril foi removido e a cânula foi desobstruída com uma lima odontológica de no máximo 11 mm (Dentsply Ltda., Brasil). A agulha foi introduzida na cânula e a infusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), programada para injetar o volume de 0,2 μ L durante 60 segundos. Após a injeção, a agulha foi mantida em posição por mais 60 segundos para assegurar a infusão total da droga e reduzir o fluxo retrógrado.

2.5 CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL

2.5.1 Contextos utilizados

O condicionamento aversivo contextual (CAC) foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais de alumínio e parede frontal e tampa de acrílico, o que permite a visualização dos animais durante os testes. O piso gradeado, feito com barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, com 9 mm de espaçamento) é conectado a um gerador digital de choques elétricos (Insight, Brasil). Esta caixa foi denominada de contexto pareado ou contexto A. Uma segunda caixa quadrada (30 x 30 x 30 cm) feita inteiramente de vidro transparente e com uma tampa gradeada foi utilizada como contexto não pareado ou contexto B. Esse contexto apresenta pistas sensoriais diferentes daquelas apresentadas no contexto A e foi usado para medir o grau de generalização.

2.5.2 Procedimentos comportamentais

Os experimentos comportamentais foram realizados sob condições de luminosidade controlada (70 lux) e ocorreram entre 10:00 e 17:00 h. Cada animal passou por uma sessão de familiarização, na qual foi permitido explorar o contexto A livremente por 3 minutos. No dia seguinte, ocorreu a sessão de CAC, durante a qual os animais receberam, após 30s de livre exploração, 3 choques elétricos nas patas (1,0 mA por 3 s), com intervalo de 30 segundos entre cada choque, e então permaneceram na caixa por mais 30 s após o último choque, totalizando uma sessão de 2 minutos. No experimento em que os animais receberam um treino de menor intensidade, apenas 1 choque (de mesma intensidade) foi aplicado após os 30 segundos iniciais de exploração, sendo os animais retirados do contexto 30 segundos depois deste único choque, totalizando uma sessão de 1 minuto. Este condicionamento de menor intensidade será chamado neste trabalho de treino fraco, por gerar respostas defensivas menos intensas. Ambos os protocolos foram padronizados em estudos prévios do laboratório (STERN *et al.*, 2014; TROYNER, 2017).

O único experimento que envolveu protocolos alternativos ao descrito acima foi o Experimento 6, onde ao invés de passarem pelo CAC, quatro grupos foram submetidos a dois protocolos diferentes. Um deles foi o chamado choque imediato (CI), onde os animais, sem ter passado por uma sessão de familiarização prévia, tinham uma sessão de pseudo-condicionamento, onde em apenas 20 segundos os animais recebiam 3 choques (1,0 mA por 3s) espaçados em 5 segundos cada. Sabe-se que esse tipo de abordagem não gera memórias

aversivas contextuais, pois se acredita que os roedores precisam de um tempo inicial de reconhecimento contextual para poder criar associações com o contexto em questão (Wiltgen et al., 2001). O outro protocolo foi denominado exposição ao contexto isolado (CTX), no qual os animais, depois de terem passado por uma sessão de familiarização como no CAC, foram expostos novamente ao contexto A por 2 minutos, sem a apresentação de choques. Esse grupo foi adicionado para avaliar se a inativação do IL per se poderia gerar algum tipo de aversividade e funcionar como um EI. Esse experimento foi realizado como uma forma de descartar a possibilidade de os efeitos observados com inativação do IL serem devido a fatores inespecíficos, e para assegurar que os efeitos são sobre a consolidação da memória.

Em todos os experimentos que visaram interferir na consolidação da memória recém-adquirida, os tratamentos foram feitos imediatamente após o condicionamento. Já no experimento que visou interferir com a aquisição da memória, a manipulação farmacológica foi realizada 20 minutos antes da sessão de condicionamento, para que o MUS atingisse seu pico de efeito durante o treino (EDELIN *et al.*, 2002).

Um dia após o CAC, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (contexto A) durante 3 minutos, sem a apresentação de choques, para a evocação e avaliação comportamental da memória aversiva contextual (Teste A). Um dia depois, os animais foram expostos ao contexto não pareado (contexto B) durante 3 minutos, a fim de avaliar os níveis de congelamento perante um novo contexto, como um correlato da generalização da memória. Para as sessões de extinção, os animais foram reexpostos ao contexto A por um período de 15 minutos, que posteriormente foi analisado em 5 blocos de 3 minutos cada. O protocolo geral está ilustrado na Figura 5.

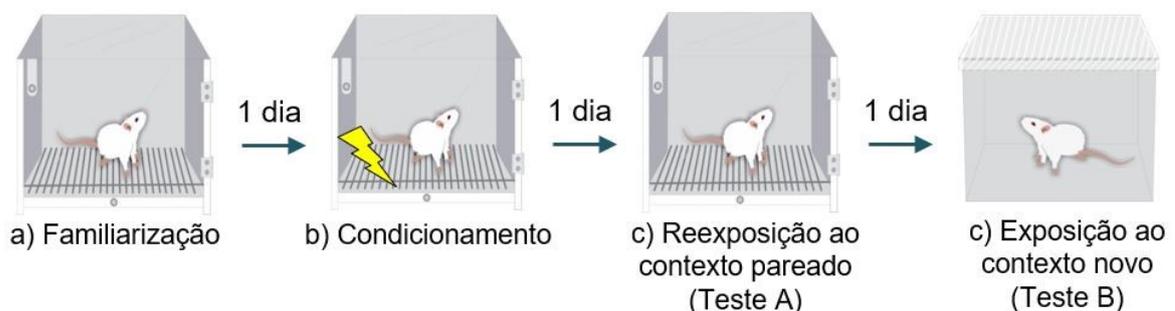


Figura 5. Protocolo básico de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) utilizado neste trabalho. A) 24h antes das sessões de condicionamento, os animais foram familiarizados ao contexto que foi posteriormente pareado, sendo permitida sua exploração por 3 minutos. **B)** A sessão de CAC foi realizada com 1 (treino moderado) ou 3 choques (treino forte). **C)** A reexposição ao contexto pareado visou observar a retenção da memória, como uma medida de sua robustez, e a **D)** a exposição ao contexto não pareado 24h depois visou a observação do nível de congelamento perante um contexto não pareado, permitindo a verificação do grau de generalização da memória.

Modificações nesse protocolo foram realizadas quando necessário para atingir o objetivo do experimento em questão e são apontadas no decorrer da descrição de resultados. Retirado de Troyner, 2017.

O tempo relativo de comportamento de congelamento (freezing) é comumente utilizado como uma medida das respostas defensivas em roedores, é um comportamento inato e pode ser definido como a ausência total de movimentos, exceto aqueles necessários para a respiração e vocalização do animal. Assim, o tempo de congelamento dos animais foi quantificado, em segundos, a cada minuto das sessões de evocação e testes, sendo expresso em porcentagem do tempo total de cada sessão ou bloco (em experimentos que envolvem extinção).

Todos os experimentos comportamentais foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a posterior avaliação dos comportamentos de maneira cega. A limpeza das caixas, após o uso com cada animal, foi realizada com solução de etanol a 10% (v/v). Um limite mínimo de 35% de congelamento no Teste A ou primeiro bloco da sessão de extinção foi estabelecido como uma forma de garantir que os sujeitos experimentais apresentavam memórias aversivas de fato. Isso foi feito em todos os experimentos exceto aquele que envolve um treino fraco, onde os animais naturalmente apresentam menores níveis de congelamento.

2.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Para garantir que os efeitos cognitivos observados não foram decorrentes de algum tipo de aumento generalizado no comportamento de tipo-ansiedade dos animais, foi realizado um experimento envolvendo o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Imediatamente após o condicionamento, os animais receberam infusões de MUS ou veículo e 45 minutos depois tiveram o comportamento de tipo-ansiedade avaliado no LCE. O labirinto (Insight, Brasil), fica elevado a 55 cm do chão, cada braço mede 50 cm de comprimento e 10 de largura. Os braços fechados possuem paredes de 40 cm, enquanto os braços abertos possuem uma borda de 0,7 cm. A área central do aparato possui 10 x 10 cm. O aparato é todo feito de madeira coberta por lâminas de fórmica, exceto as bordas dos braços abertos, que são feitas de acrílico transparente.

Para o teste, os animais foram colocados no centro do aparato, e todo o teste, que durou 5 minutos, foi filmado. Um observador treinado e cego aos tratamentos avaliou as seguintes medidas comportamentais: número de entradas com as quatro patas nos braços abertos e fechados (EA e EF), e o tempo de permanência nos braços abertos (TA), e quantidade de avaliações de risco (AR; definida pela postura na qual o animal se projeta para frente e depois

retorna para sua posição original, executada a partir da região central ou braços fechados em direção aos braços abertos).

Os dados obtidos foram então utilizados para calcular o percentual de entradas nos braços abertos $\{\% EA; [EA/(EA+EF)] \times 100\}$ e o tempo de permanência neles $\{\%TA; [(TA/300) \times 100]\}$. Sabe-se que o nível de comportamento de tipo-ansiedade dos ratos pode ser avaliado a partir do grau de evitação do braço aberto ($\%TA$ e $\%EA$) e quantidade de ARs, e o número de EFs pode ser considerado um índice de atividade exploratória (Carobrez e Bertoglio, 2005).

2.7 HISTOLOGIA

Ao término dos experimentos, os animais receberam uma solução anestésica de quetamina (100 mg/ml/kg) e xilazina (10 mg/ml/kg) por via intraperitoneal. Após atingirem o plano anestésico adequado, os animais receberam uma solução contendo cloral hidratado (30% p/v; 2 ml/animal; Vetec, Brasil) através de injeção intraperitoneal. Quando constatada a morte, foi realizada a microinjeção central de corante azul de Evans (0,2 μ l), utilizando os mesmos parâmetros da infusão das drogas descrito acima, para verificar o sítio de infusão. Os animais tiveram seus encéfalos removidos e conservados individualmente em solução de formalina 10% por 48 h, sendo posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% por, no mínimo, 48 h antes da realização dos cortes histológicos. Para a verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais de 10 μ m de espessura foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -25 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Os cortes foram comparados a diagramas do cérebro de ratos (Paxinos e Watson, 2007) e apenas os animais com histologia confirmada para o IL foram incluídos na análise estatística dos dados (Figura 6).

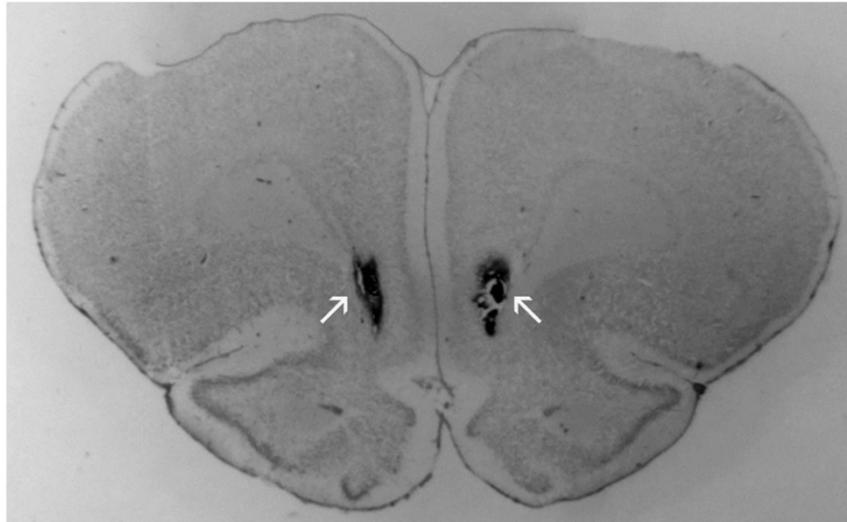


Figura 6. Corte histológico demonstrando o sítio de infusão. A imagem foi obtida a partir de um corte coronal do cérebro de um dos ratos utilizados no estudo. AP aproximado = + 3,2. As setas indicam o sítio de infusão, evidenciado pela presença do corante azul de Evans.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após ter sido assegurada a distribuição normal dos dados e a homogeneidade de variância, os tempos de congelamento dos animais nos Testes A e B foram submetidos a análises de variância (ANOVA, do inglês *analysis of variance*) mista, onde os fatores independentes foram o tratamento e a sessão e os fatores dependentes foram os níveis médios de congelamento nos Testes A e B. A mesma abordagem foi utilizada para comparar o tempo de congelamento no primeiro bloco da extinção com aquele expresso durante o Teste A. Para os dados da sessão de extinção, foi utilizada a ANOVA mista, onde os fatores independentes eram tratamento e bloco de extinção, e os fatores dependentes foram os níveis médios de congelamento ao longo da sessão de extinção. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi utilizado para fazer comparações múltiplas nas situações descritas acima.

As comparações de (i) índice de discriminação (diferença entre o percentual de congelamento nos Testes A e B dividida pela soma dos percentuais), (ii) dos dados de labirinto em cruz elevado, e (iii) do delta de tempo de congelamento (diferença entre o percentual de congelamento durante o primeiro bloco da extinção e aquele apresentado no Teste A), foram realizadas utilizando o teste *t* de Student. O limiar de significância estatística utilizado foi de um valor de *p* menor do que 0,05. Para essas análises estatísticas, o software Statistica 13.5 (StatSoft, EUA) foi utilizado, e para a confecção dos gráficos, utilizou-se o software GraphPad Prism 8.02 (GraphPad Prism, EUA).

O tamanho de efeito foi calculado utilizando o índice g de Hedges para refletir a diferença média entre grupos ($n \leq 20$ por grupo) que podiam apresentar n amostral diferente. Valores de g maiores ou iguais do que 0,8 foram considerados com um tamanho de efeito grande (ELLIS, 2010). O tamanho de amostra foi determinado pelo cálculo de poder estatístico foi de 8 animais por grupo ($\alpha = 0,05$; $\beta = 0,20$ e tamanho padronizado de efeito ou d de Cohen = 1,0). O planejamento experimental considerou que todos os grupos teriam o mesmo n amostral, mas devido a perdas experimentais (infusão fora do IL, ou animais que não apresentaram níveis mínimos de congelamento), em alguns casos o N dos grupos foi levemente desigual.

3 RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA INATIVAÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO DURANTE A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS

Neste experimento, 17 animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos, de acordo com o tratamento (veículo, N = 9; muscimol, N = 8), que foi realizado 20 minutos antes da sessão de CAC (Figura 6). Nos dias subsequentes, os animais foram expostos ao contexto pareado (Teste A), e a um contexto novo e neutro (Teste B). Além das comparações entre os níveis de congelamento durante os Testes A e B, o índice de discriminação de cada grupo foi comparado para aprofundar a análise sobre os efeitos do tratamento nos níveis de generalização contextual.

A ANOVA mista não revelou efeitos significativos do tratamento ($F_{1,15} = 2,6$; $p = 0,13$), ou da interação ($F_{1,15} = 3,4$; $p = 0,08$), apenas da sessão de teste ($F_{1,15} = 225,4$; $p < 0,001$). Isso ilustra que independente do tratamento, os animais apresentam maior congelamento no Teste A. Um teste *post-hoc* de Newman-Keuls confirmou que não há diferenças significativas entre os grupos nos Testes A ($p = 0,71$) e B ($p = 0,08$). A única diferença significativa observada foi na comparação entre os índices de discriminação dos grupos. Como visto na Figura 7, o teste t de Student revelou que houve efeito do tratamento sobre o índice de discriminação ($t_{1,15} = 2,67$; $p = 0,02$), e que o grupo tratado apresentou um índice de discriminação significativamente menor que o grupo controle ($p = 0,02$; $g = 1,3$).

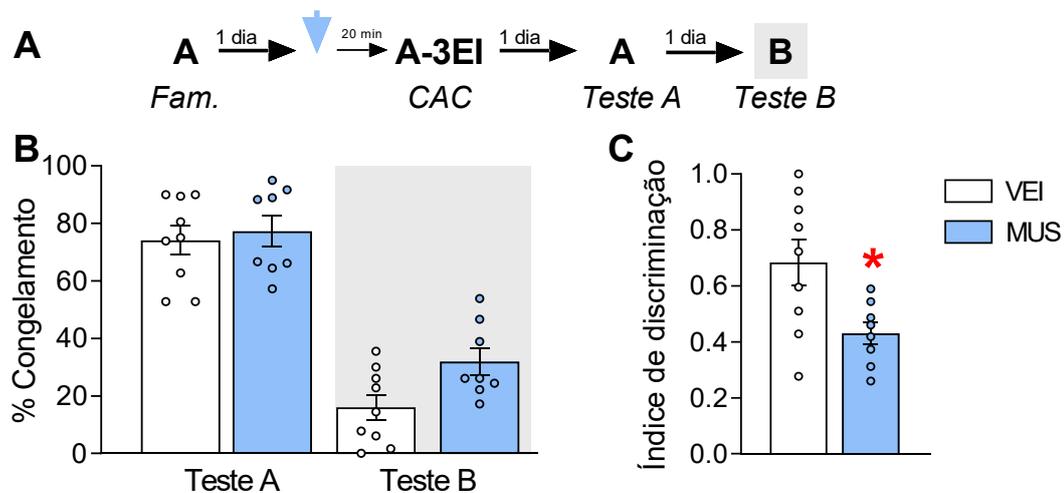


Figura 7. Experimento 1: Efeito da inativação do IL com MUS 20 minutos antes do CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B. A) Desenho experimental. B) Não houve diferenças significativas entre os

grupos nos Testes A e B. C) Quando o índice de discriminação entre os grupos foi comparado, o valor médio do grupo tratado foi significativamente inferior ($p = 0,02$). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 8-9). O asterisco (*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t de Student). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: *Fam.* = Familiarização; *CAC* = Condicionamento Aversivo Contextual; *EI* = Estímulo incondicionado; *VEI* = Veículo; *MUS* = Muscimol.

3.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA INATIVAÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO APÓS A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS

3.2.1 Experimento 2.1: Efeito da Inativação do IL imediatamente após o CAC

Para este experimento, 30 animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos, de acordo com o tratamento (veículo, $N = 15$; muscimol, $N = 15$), que foi realizado imediatamente após o CAC. Nos dias seguintes, os animais passaram pelos Testes A e B de forma contrabalanceada, de maneira que metade dos animais em cada grupo passou pelo Teste B antes do Teste A. Como não houve diferenças qualitativas entre as duas sequências de testes, os dados foram agrupados para a análise estatística. Além das comparações entre valores de tempo médio de congelamento, o índice de discriminação dos grupos foi comparado para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a generalização da memória.

A ANOVA mista demonstrou efeitos significativos do tratamento ($F_{1,28} = 4,2$; $p = 0,04$), sessão de teste ($F_{1,28} = 166,1$; $p < 0,001$), e interação entre esses fatores ($F_{1,28} = 4,5$; $p = 0,04$) sobre o tempo de congelamento. Como mostrado na Figura 8, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que os grupos se comportaram de maneira similar no Teste A ($p = 0,61$; $g = 0,25$), mas no Teste B os tratamentos geraram aumento na média de congelamento ($p = 0,02$; $g = 0,94$). Além disso, houve efeito significativo do tratamento sobre o índice de discriminação ($t_{1,28} = 8,1$; $p = 0,008$), onde o valor do grupo tratado foi significativamente maior que aquele do grupo controle ($p = 0,008$; $g = 1,04$).

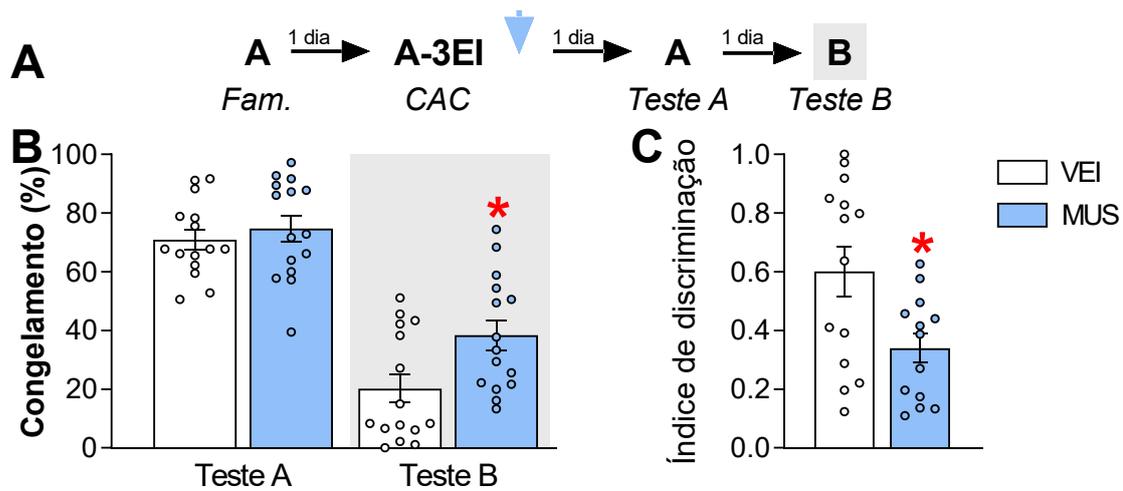


Figura 8. Experimento 2.1: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B. **A)** Desenho experimental. **B)** Não houve diferenças significativas entre os grupos no Teste A. No entanto, o grupo tratado apresentou níveis médios de congelamento significativamente superiores no Teste B ($p = 0,02$). **C)** Os animais tratados também apresentaram um nível médio de discriminação inferior aquele dos que receberam veículo ($p = 0,008$). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 15). O asterisco (*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA mista ou teste t de Student). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: *Fam.* = Familiarização; *CAC* = Condicionamento Aversivo Contextual; EI = Estímulo incondicionado; VEI = Veículo; MUS = Muscimol.

3.2.2 Experimento 2.2: Efeito da Inativação do IL 6 horas após o CAC

Para verificar se o efeito observado anteriormente é tempo-dependente, 18 animais foram alocados aleatoriamente em 2 grupos de acordo com o tratamento (veículo, $N = 9$; muscimol, $N = 9$), realizado 6 horas após o CAC. Os animais passaram pelos Testes A e B nos dias seguintes e os valores obtidos nesses testes foram usados para calcular o índice de discriminação.

A ANOVA mista demonstrou que houve efeito significativo da sessão de teste ($F_{1,16} = 211,47$; $p < 0,001$), mas sem efeitos do tratamento ($F_{1,16} = 0,10$; $p = 0,75$) e da interação entre esses fatores ($F_{1,16} = 0,05$; $p = 0,81$) sobre os níveis médios de congelamento. Como demonstrado na Figura 9, não houve diferenças significativas durante os Testes A e B e na comparação entre os índices de discriminação.

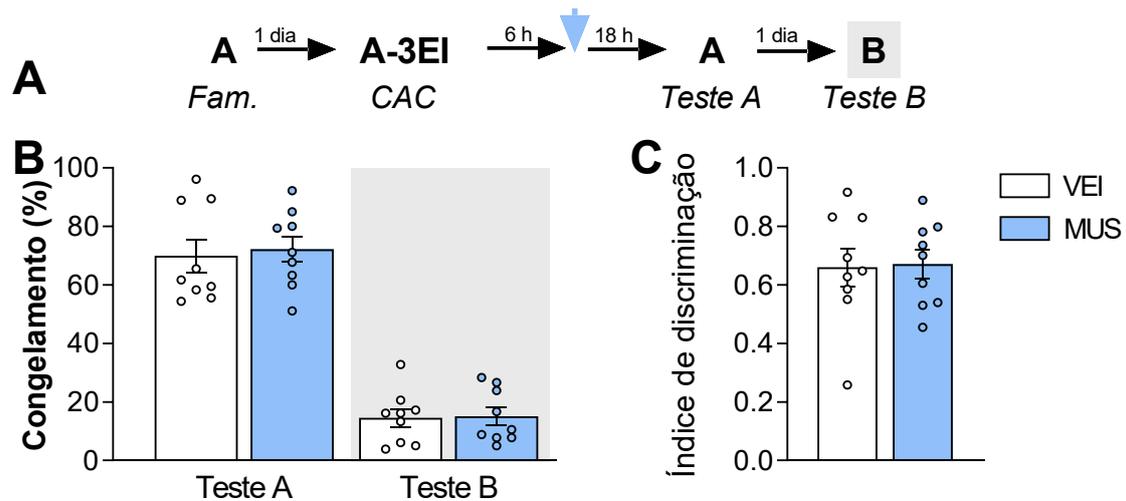


Figura 9. Experimento 2.2: Efeito da inativação do IL com MUS 6 horas após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B. A) Desenho experimental. **B)** Não houve diferenças significativas entre os grupos nos Testes A e B. **C)** Não houve diferenças significativas entre os índices médios de discriminação entre os grupos. Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 9). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: Fam. = Familiarização; CAC = Condicionamento Aversivo Contextual; EI = Estímulo incondicionado; VEI = Veículo; MUS = Muscimol.

3.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA INATIVAÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO APÓS A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS SOBRE COMPORTAMENTOS DE TIPO-ANSIEDADE

É possível que os efeitos observados nos experimentos anteriores sejam devido a aumentos geral nos comportamentos de tipo-ansiedade dos animais após as infusões de muscimol. Para avaliar essa possibilidade, 11 animais foram divididos em dois grupos de acordo com o tratamento (veículo, N = 6; muscimol, N = 5) realizado imediatamente após o CAC. Ambos os grupos foram submetidos ao teste do LCE 45 minutos após o término das infusões.

Os testes *t* de Student realizados demonstraram que não houve efeitos significativos do tratamento sobre o tempo de permanência e a quantidade média de entradas nos braços abertos (%TA: $t_9 = 0,70$, $p = 0,50$; %EA: $t_9 = 0,58$, $p = 0,57$), comportamento de avaliação de risco (ARs: $t_9 = 1,2$; $p = 0,25$), ou atividade exploratória geral (EF: $t_9 = 0,31$, $p = 0,76$) no LCE. Como ilustrado na Figura 10, animais tratados não apresentaram diferenças significativas em nenhuma dessas medidas comportamentais quando comparados com o grupo controle. Isso indica que os efeitos observados anteriormente não são devido a alterações gerais nos níveis de comportamentos de tipo-ansiedade durante a consolidação.

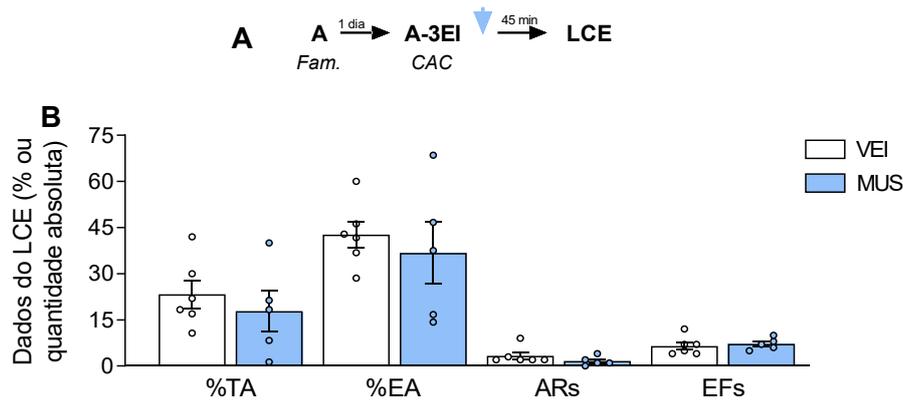


Figura 10. Experimento 3: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a expressão de comportamentos de tipo-ansiedade. A) Desenho experimental. B) Não houve diferenças significativas entre os grupos no tempo de permanência nos braços abertos (%TA), taxa de entrada nos braços abertos (%EA), comportamento de avaliação de risco (ARs), e na quantidade de entradas nos braços fechados (EFs). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 5-6). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: *Fam.* = Familiarização; *CAC* = Condicionamento Aversivo Contextual; *EI* = Estímulo Incodicionado; *LCE* = Labirinto em Cruz Elevado; *TA* = Tempo nos Braços Abertos; *EA* = Entrada nos Braços Abertos; *ARs* = Avaliações de Risco; *EFs* = Entradas nos Braços Fechados; *VEI* = Veículo; *MUS* = Muscimol.

3.4 EXPERIMENTO 4: EFEITO DA INATIVAÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO APÓS A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS DE MENOR INTENSIDADE

Existe a possibilidade de que a ausência de efeito nos Testes A ilustrada nos experimentos anteriores seja devido a um efeito “teto”, onde os grupos controle já apresentavam elevados níveis de congelamento no Teste A. Para avaliar essa possibilidade, 20 animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos de acordo com o tratamento (veículo, N = 10; muscimol, N = 10) realizado imediatamente após o treino fraco (CAC com apenas um choque). Os Testes A e B foram realizados nos dias seguintes, e os dados obtidos nestes testes foram utilizados para calcular o índice de discriminação em ambos os grupos.

A ANOVA mista revelou efeitos significativos do tratamento ($F_{1,18} = 6,5; p = 0,02$), sessão de teste ($F_{1,18} = 106,6; p < 0,001$), mas não da interação entre estes fatores ($F_{1,18} = 1,5; p = 0,23$) sobre o tempo de congelamento. Ainda assim, foi realizado um teste *post-hoc* de Newman-Keuls “desprotegido” (quando não há efeito da interação), que demonstrou que os grupos não apresentaram diferenças significativas no Teste A ($p = 0,21; g = 0,54$), mas, como demonstrado na Figura 11 B no Teste B o grupo tratado apresentou níveis de congelamento significativamente maiores ($p = 0,03; g = 2,16$). Além disso, houve efeito

significativo do tratamento sobre o índice de discriminação ($t_{1,18} = 16,3; p = 0,001$), onde o grupo tratado apresentou valores significativamente menores do que aqueles do grupo controle, demonstrado na Figura 11 C ($p = 0,001; g = 1,8$).

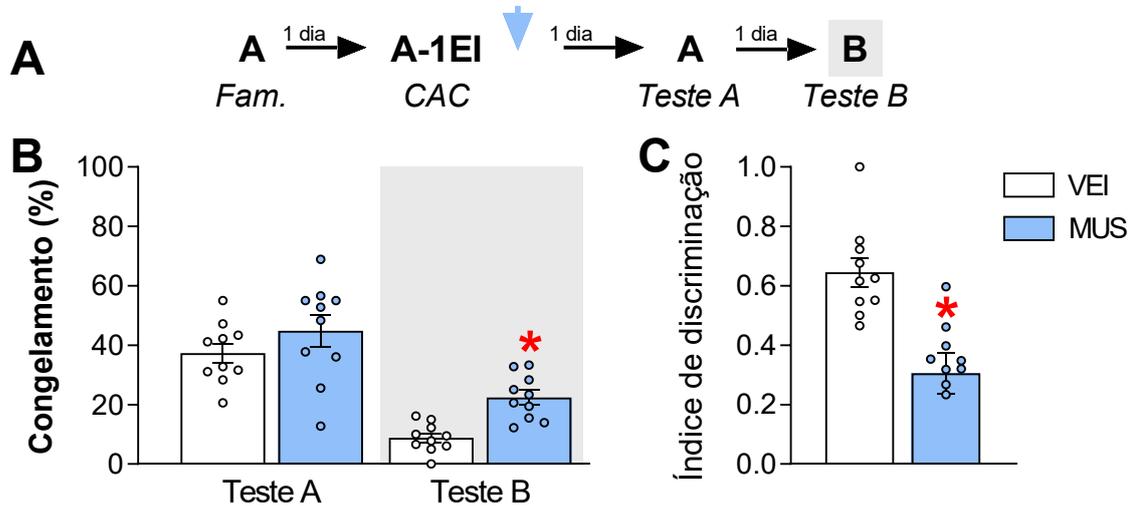


Figura 11. Experimento 4: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC de menor intensidade sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B. A) Desenho experimental. **B)** Não houve diferenças significativas entre os grupos no Teste A. No entanto, o grupo tratado apresentou níveis médios de congelamento significativamente superiores no Teste B ($p = 0,03$). **C)** Os animais tratados também apresentaram um nível médio de discriminação inferior aquele dos que receberam veículo ($p = 0,001$). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 10). O asterisco (*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA mista ou teste t de Student). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: Fam. = Familiarização; CAC = Condicionamento Aversivo Contextual; EI = Estímulo incondicionado; VEI = Veículo; MUS = Muscimol.

3.5 EXPERIMENTO 5: EFEITO DA INATIVAÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO APÓS A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS SOBRE A SUA EXPRESSÃO UMA SEMANA APÓS O CONDICIONAMENTO

Para verificar se a inativação do IL com muscimol gera efeitos persistentes, 23 animais foram aleatoriamente alocados em 2 grupos de acordo com o tratamento (veículo, N = 12; muscimol, N = 13), realizado imediatamente após o CAC. Os animais passaram pelos Testes A e B 7 e 8 dias após o CAC, respectivamente.

A ANOVA mista revelou efeitos significativos do tratamento ($F_{1,21} = 10,9; p = 0,003$), sessão de teste ($F_{1,21} = 450,2; p < 0,001$), mas não da interação entre os fatores ($F_{1,21} = 2,1; p = 0,17$) sobre o tempo médio de congelamento. Como mostrado na Figura 12, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls (desprotegido) demonstrou que não houve diferença nos níveis de congelamento no Teste A ($p = 0,12; g = 0,63$), mas que os animais tratados

apresentaram níveis maiores de congelamento no Teste B ($p = 0,006$; $g = 2,21$). Além disso, houve efeito significativo do tratamento sobre o índice de discriminação ($t_{1,21} = 28,8$; $p < 0,001$), no qual o grupo tratado apresentou níveis inferiores aos do grupo controle ($p = 0,0001$; $g = 2,23$).

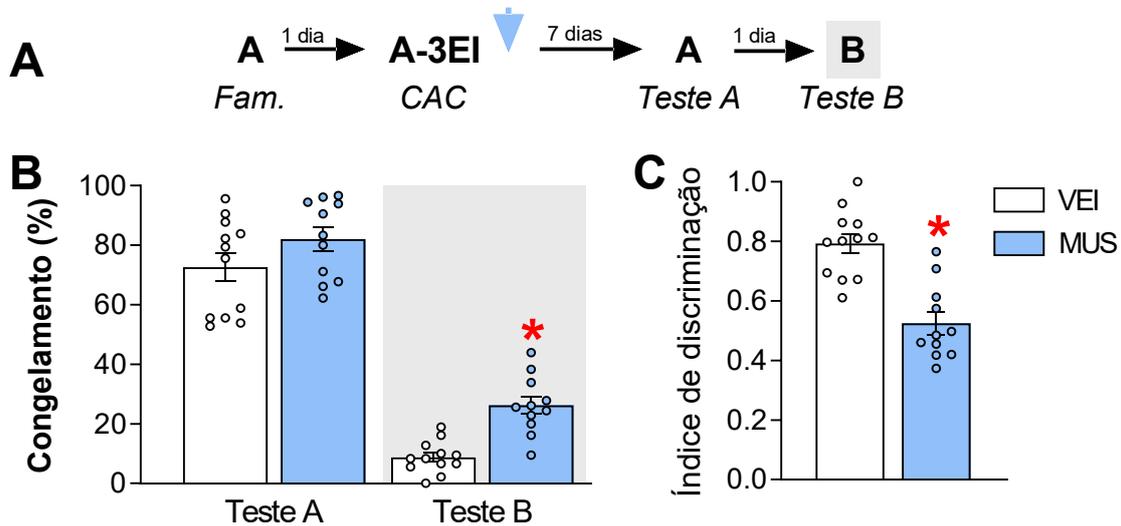


Figura 12. Experimento 5: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B uma semana depois. A) Desenho experimental. B) Não houve diferenças significativas entre os grupos no Teste A. No entanto, o grupo tratado apresentou níveis médios de congelamento significativamente superiores no Teste B ($p = 0,006$). C) Os animais tratados também apresentaram um nível médio de discriminação inferior aquele dos que receberam veículo ($p = 0,0001$). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 10). O asterisco (*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA mista ou teste t de Student). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: Fam. = Familiarização; CAC = Condicionamento Aversivo Contextual; EI = Estímulo incondicionado; VEI = Veículo; MUS = Muscimol.

3.6 EXPERIMENTO 6: EFEITO DA INATIVAÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO APÓS OS PROTOCOLOS DE CHOQUE IMEDIATO E EXPOSIÇÃO AO CONTEXTO ISOLADO SOBRE OS NÍVEIS DE CONGELAMENTO NOS TESTES A E B

Para determinar se os efeitos observados nos experimentos anteriores eram dependentes de aprendizado associativo (i.e., se os efeitos do muscimol não são associados a uma sensibilização ao contexto B ou a efeitos da droga *per se*), 41 animais foram alocados aleatoriamente em 6 grupos. Os grupos foram divididos de acordo com o procedimento realizado no dia 2 (CAC, Choque Imediato = CI ou Exposição ao Contexto Isolado = CTX), e com o tratamento realizado imediatamente após (veículo ou muscimol). Os grupos experimentais e seu tamanho amostral foram os seguintes: CAC-VEI (N = 7); CAC-MUS (N =

7); CI-VEI (N = 7); CI-MUS (N = 6); CTX-VEI (N = 7); CTX-MUS (N = 7). Nos dias 3 e 4, os animais passaram pelos Testes A e B.

A ANOVA mista mostrou um efeito significativo da interação entre procedimento realizado no dia 2, tratamento e sessão de teste ($F_{2,35} = 4,8; p = 0,01$) sobre o tempo de congelamento. Como demonstrado pela Figura 13, os grupos CAC-VEI e CAC-MUS se comportaram de maneira similar no Teste A ($p = 0,67; g = 0,16$), mas apresentaram níveis maiores de congelamento do que todos os outros grupos ($p \leq 0,0001; g \geq 4,38$), que entre si não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,89; g \leq 0,03$). Durante o Teste B, o grupo CAC-MUS apresentou níveis de congelamento superiores aqueles de todos os outros grupos ($p \leq 0,009; g \geq 2,07$). Esses resultados indicam que os procedimentos empregados de fato não geraram memórias aversivas contextuais e confirmam que os efeitos observados anteriormente são dependentes de aprendizado associativo.

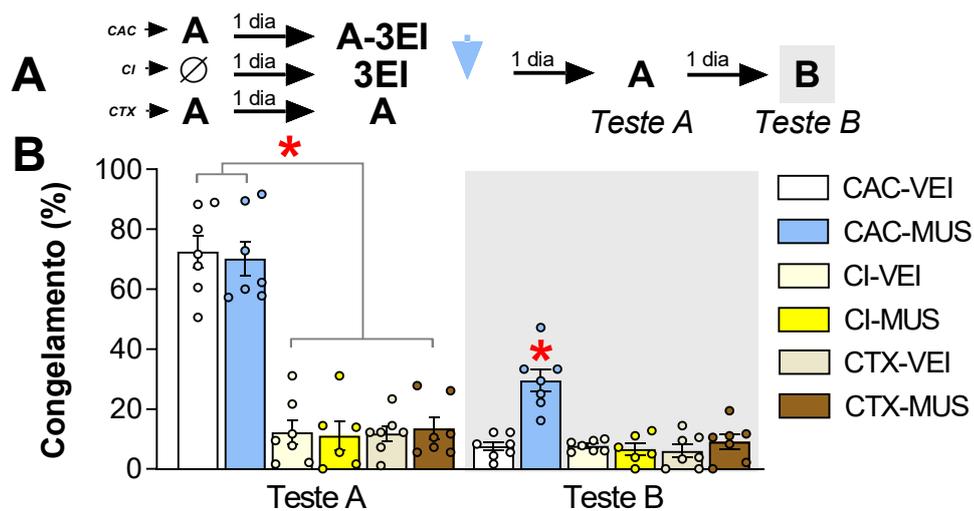


Figura 13. Experimento 6: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC, CI ou CTX sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B. A) Desenho experimental. B) Os grupos CAC-VEI e CAC-MUS apresentaram níveis de congelamento maiores do que todos os outros grupos no Teste A ($p \leq 0,0001$). No Testes B, o grupo tratado apresentou níveis médios de congelamento significativamente superiores em relação a todos os outros grupos ($p \leq 0,009$). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 10). O asterisco (*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA mista ou teste t de Student). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: CAC = Condicionamento Aversivo Contextual; CI = Choque Imediato; CTX = Exposição ao Contexto Isolado; EI = Estímulo incondicionado; VEI = Veículo; MUS = Muscimol.

3.7 EXPERIMENTO 7: EFEITO DA INATIVAÇÃO DO CÓRTEX INFRALÍMBICO APÓS A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS SOBRE SUA EXTINÇÃO POSTERIOR

Para avaliar se a inativação do IL após o CAC interfere com um aprendizado de extinção subsequente, 16 animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos de acordo com o tratamento (veículo, N = 8; muscimol, N = 8), realizado imediatamente após o CAC. No dia seguinte os animais passaram por uma sessão de extinção de 15 minutos (reexposição ao contexto A sem apresentação de choques). Os Testes A (realizado para avaliar a expressão da memória de extinção) e B (realizado para avaliar como a extinção interfere com a expressão generalizada de congelamento no contexto B) foram realizados 6 e 7 dias depois da extinção, respectivamente.

Para a análise estatística dos dados da sessão de extinção, esta foi dividida em 5 blocos de 3 minutos cada. A ANOVA mista mostrou efeitos significativos do bloco da extinção ($F_{4,56} = 52,7; p < 0,001$), interação entre bloco e tratamento ($F_{4,56} = 2,7; p = 0,04$), mas sem efeito do tratamento ($F_{1,14} = 1,0; p = 0,32$) sobre os níveis de congelamento durante a sessão de extinção. Como demonstrado na Figura 14 B, enquanto o grupo controle apresentou redução significativa nos níveis de congelamento desde o segundo bloco da sessão (em relação ao primeiro bloco; $p \leq 0,0001; g \geq 4,71$), o grupo tratado apresentou reduções significativas a partir do terceiro bloco ($p \leq 0,0001; g \geq 2,81$). Não houve diferenças significativas entre os dois grupos durante toda a sessão ($p \geq 0,11; g \leq 1,56$).

Durante os Testes A e B, a ANOVA mista denotou um efeito significativo do tratamento ($F_{1,14} = 15,7; p = 0,004$), da sessão de teste ($F_{1,14} = 45,5; p < 0,001$), mas sem efeito da interação entre os fatores ($F_{1,14} = 15,7; p = 0,004$) sobre os níveis de congelamento. Como demonstrado na Figura 14 C, um teste *post-hoc* de Newman-Keuls (desprotegido) revelou que o grupo tratado apresentou maiores níveis de congelamento em relação ao controle nos Testes A ($p = 0,005; g = 1,54$) e B ($p = 0,05; g = 1,49$).

Para estimar a eficiência da sessão de extinção, o tempo de congelamento no primeiro bloco da extinção foi comparado com aquele do Teste A. A ANOVA mista revelou que houve efeito significativo do tratamento ($F_{1,14} = 10,2; p = 0,01$), da sessão ($F_{1,14} = 15,0; p = 0,02$), e da interação entre os fatores ($F_{1,14} = 7,0; p = 0,02$) sobre os níveis de congelamento. Como mostrado na Figura 14 D, o grupo controle apresentou níveis de congelamento significativamente menores no Teste A quando comparado com o primeiro bloco da extinção

($p = 0,001$; $g = 1,89$), mas o mesmo não ocorreu no grupo tratado ($p = 0,67$; $g = 0,60$). Consequentemente, como mostrado pela Figura 14 E, o delta do tempo de congelamento foi inferior no grupo tratado quando comparado com o grupo controle ($t_{1,14} = 6,9$; $p = 0,02$).

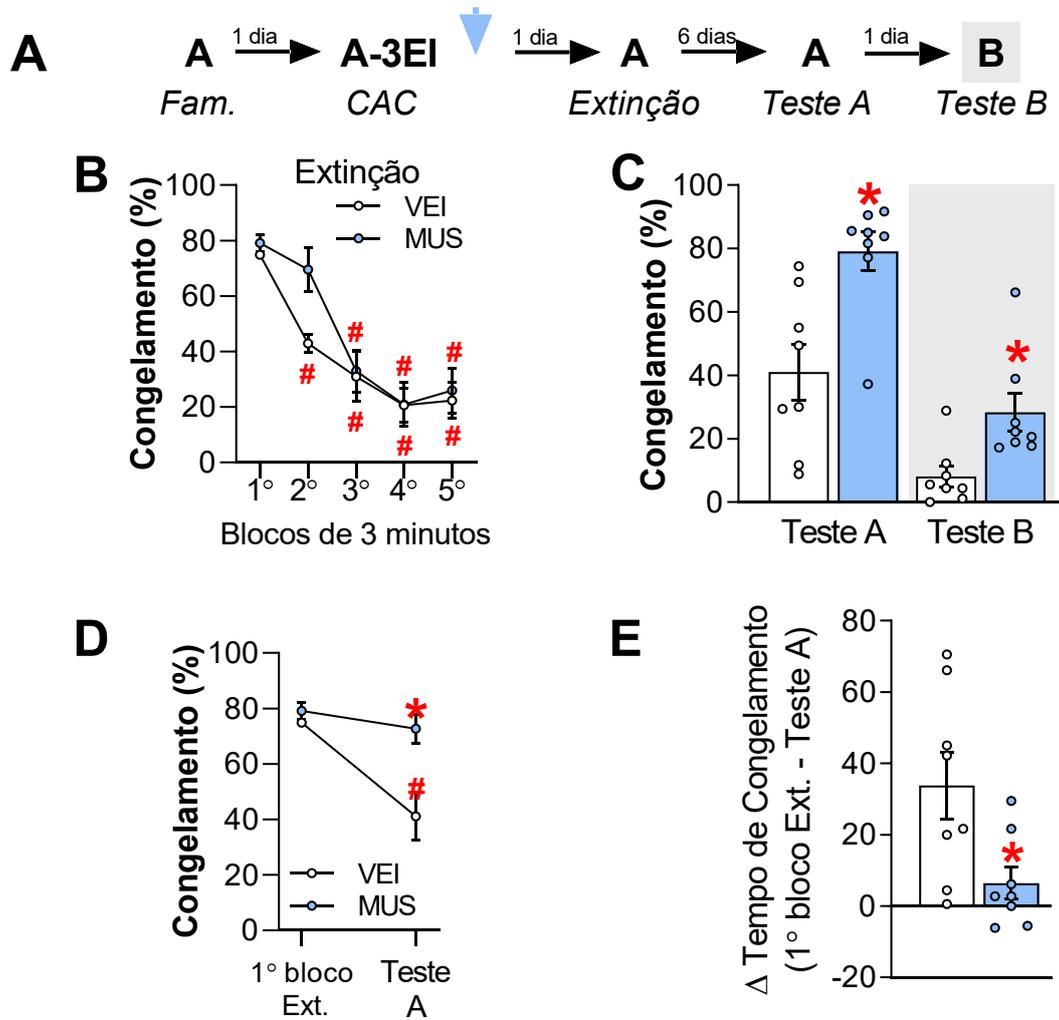


Figura 14. Experimento 7: Efeito da inativação do IL com MUS imediatamente após o CAC sobre a extinção realizada no dia seguinte. **A)** Desenho experimental. **B)** A redução no tempo de congelamento ao longo da sessão de extinção foi similar entre os grupos, apesar do grupo controle apresentar redução significativa desde o segundo bloco, enquanto o grupo tratado a apresentou a partir do terceiro. **C)** Animais tratados com muscimol não apresentaram uma retenção da memória de extinção tão eficaz quanto o grupo controle, como observado no Teste A ($p = 0,005$). A sessão de extinção não foi capaz de impedir o aumento na expressão de congelamento no grupo tratado no Teste B quando comparado ao grupo controle ($p = 0,05$). **D)** Para estimar a eficiência da sessão de extinção, também foi realizada uma comparação entre o nível de congelamento do primeiro bloco de extinção e aquele do Teste A. Houve uma redução significativa nos animais do grupo controle ($p = 0,001$), mas não no grupo tratado ($p = 0,67$). Como consequência, o delta do tempo de congelamento entre o primeiro bloco da extinção e o Teste A foi menor no grupo tratado ($p = 0,02$; 12 **E**). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 8). A cerquilha (#) indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao primeiro bloco de extinção daquele mesmo grupo (ANOVA mista seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). O asterisco (*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA mista ou teste *t* de Student). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: *Fam.* = Familiarização; *CAC* = Condicionamento Aversivo Contextual; *EI* = Estímulo incondicionado; *VEI* = Veículo; *MUS* = Muscimol; *Ext.* = Extinção.

3.8 EXPERIMENTO 8: EFEITO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA NO CÓRTEX INFRA-LÍMBICO APÓS A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS

Para determinar se a influência do IL na consolidação também depende de síntese proteica, 16 animais foram aleatoriamente alocados em dois grupos de acordo com o tratamento (veículo, N = 8; anisomicina, N = 8), realizado imediatamente após o CAC. Nos dias seguintes, os animais foram submetidos aos Testes A e B.

A ANOVA mista revelou efeitos significativos da sessão de teste ($F_{1,14} = 177,3; p < 0,001$), mas sem efeito do tratamento ($F_{1,14} = 1,1; p = 0,31$) ou interação entre os fatores ($F_{1,14} = 1,8; p = 0,20$) sobre o tempo de congelamento. Como mostrado na Figura 15 B, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls (desprotegido) demonstrou que ambos os grupos se comportaram de maneira semelhante nos Testes A ($p = 0,93; g = 0,03$) e B ($p = 0,14; g = 1,65$). Houve efeito significativo do tratamento sobre o índice de discriminação ($t_{1,14} = 10,3; p = 0,006$). Como mostrado pela Figura 15 C, o grupo tratado apresentou valores menores do que os do grupo controle ($p = 0,006; g = 1,60$).

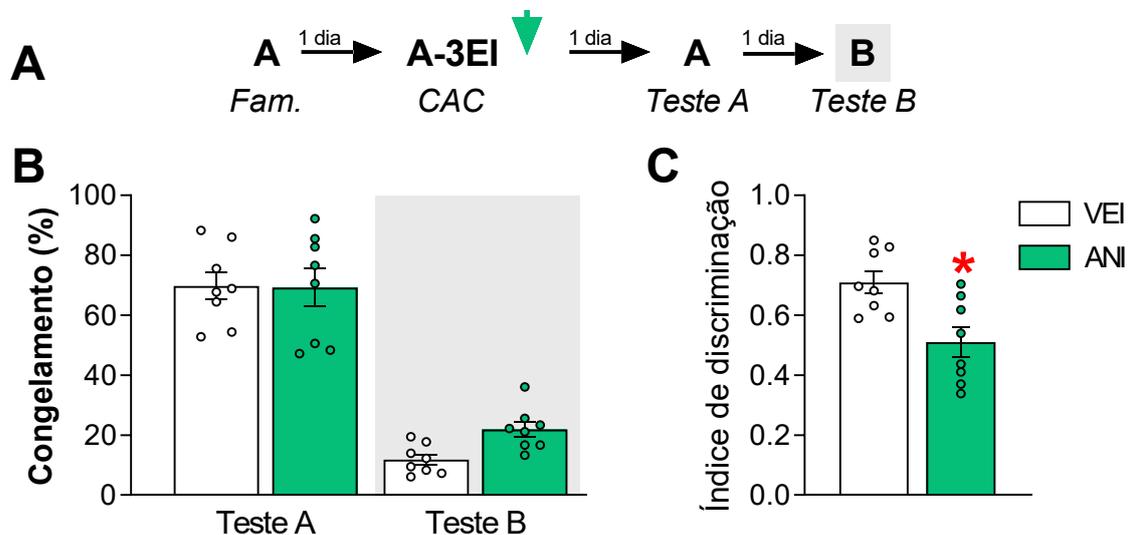


Figura 15. Experimento 8: Efeito da inibição da síntese proteica no IL com ANI imediatamente após o CAC sobre a expressão de congelamento nos Testes A e B. A) Desenho experimental. B) Não houve diferenças significativas entre os grupos no Testes A e B. C) Os animais tratados apresentaram um nível médio de discriminação inferior aquele dos que receberam veículo ($p = 0,006$). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 15). O asterisco (*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (teste *t* de Student). A seta verde-clara indica o momento do tratamento. Siglas: *Fam.* = Familiarização; *CAC* = Condicionamento Aversivo Contextual; *EI* = Estímulo incondicionado; *VEI* = Veículo; *MUS* = Muscimol.

3.9 EXPERIMENTO 9: EFEITO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA NO CÓRTEX INFRALÍMBICO APÓS A AQUISIÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS SOBRE SUA EXTINÇÃO POSTERIOR

Para avaliar a contribuição da síntese proteica do IL durante a consolidação para a formação de memórias aversivas contextuais sensíveis a extinção, este experimento foi realizado. Para isso, 20 animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos de acordo com o tratamento (veículo, $N = 10$; anisomicina, $N = 10$), realizado imediatamente após o CAC. No dia seguinte, os animais passaram por uma sessão de extinção de 15 minutos (reexposição ao contexto A sem apresentação de choques). Os Testes A (realizado para avaliar a expressão da memória de extinção) e B (realizado para avaliar como a extinção interfere com a expressão generalizada de congelamento no contexto B) foram realizados 6 e 7 dias depois da extinção, respectivamente.

Para a análise estatística dos dados da sessão de extinção, esta foi dividida em 5 blocos de 3 minutos cada. A ANOVA mista revelou efeitos significativos do bloco da extinção ($F_{4,72} = 30,67$; $p < 0,001$), mas não do tratamento ($F_{1,18} = 1,36$; $p = 0,25$) ou da interação destes fatores ($F_{4,72} = 0,76$; $p = 0,55$) sobre os níveis de congelamento apresentados durante a sessão de extinção. Como demonstrado na Figura 16 B, ambos os grupos apresentaram níveis de congelamento menores do que aqueles do primeiro bloco de extinção a partir do segundo bloco ($p \leq 0,0008$; $g \geq 1,08$). Não houveram diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos blocos da sessão de extinção ($p \geq 0,47$; $g \leq 0,32$).

Durante os Testes A e B, a ANOVA mista demonstrou efeitos significativos da sessão de teste ($F_{1,18} = 120,2$; $p < 0,001$), tratamento ($F_{1,18} = 21,7$; $p = 0,0002$), e interação entre os fatores ($F_{1,18} = 7,4$; $p = 0,01$) sobre os níveis de congelamento. Como mostrado na Figura 16 C, o grupo tratado com anisomicina apresentou níveis maiores de congelamento quando comparado ao grupo controle durante o Teste A ($p = 0,0003$; $g = 2,20$), mas não no Teste B ($p = 0,09$; $g = 0,99$).

Para estimar o grau de eficiência da sessão de extinção em reduzir os níveis de congelamento perante o contexto condicionado, o tempo de congelamento no primeiro bloco da extinção foi comparado com aquele do Teste A. A ANOVA mista revelou que houve efeito significativo do tratamento ($F_{1,18} = 6,6$; $p = 0,02$), sessão ($F_{1,18} = 38,9$; $p < 0,001$), e da interação entre os fatores ($F_{1,18} = 21,5$; $p < 0,001$) sobre os níveis de congelamento. Como demonstrado na Figura 16 D, o grupo controle apresentou redução significativa no Teste A

($p = 0,0001$; $g = 3,37$), mas o grupo tratado não apresentou redução ($p = 0,27$; $g = 0,36$). Conseqüentemente, como ilustrado pela Figura 16 E, houve efeito significativo do tratamento sobre o delta do tempo de congelamento ($t_{1,18} = 21,5$; $p < 0,001$).

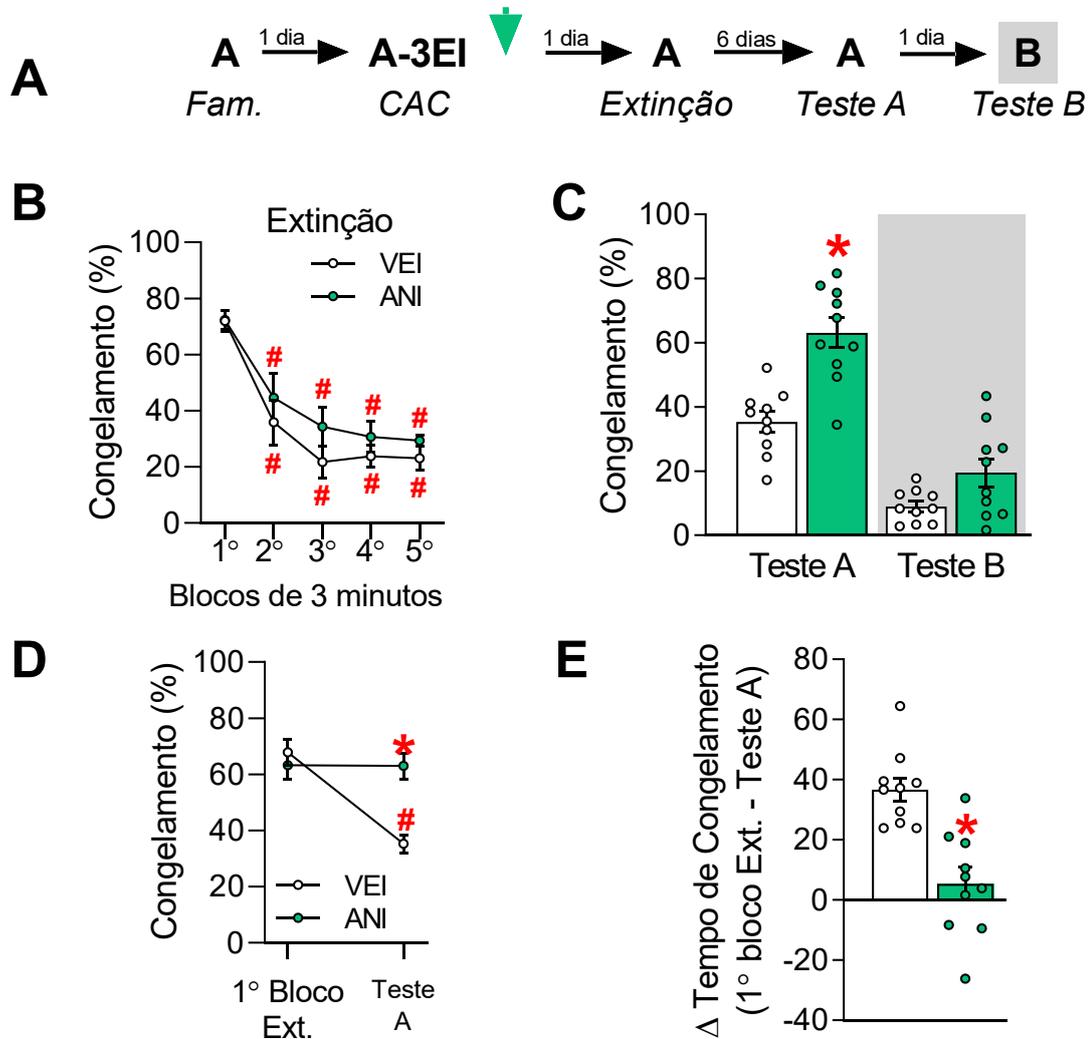


Figura 16. Experimento 9: Efeito da inibição da síntese proteica no IL com ANI imediatamente após o CAC sobre a extinção realizada no dia seguinte. **A)** Desenho experimental. **B)** A redução no tempo de congelamento ao longo da sessão de extinção foi similar entre os grupos. **C)** Animais tratados com anisomicina não apresentaram uma retenção da memória de extinção tão eficaz quanto o grupo controle, como observado no Teste A ($p = 0,0003$). Não houve diferenças significativas no Teste B ($p = 0,09$). **D)** Para estimar a eficiência da sessão de extinção, também foi realizada uma comparação entre o nível de congelamento do primeiro bloco de extinção e aquele do Teste A. Houve uma redução significativa nos animais do grupo controle ($p = 0,001$), mas não no grupo tratado ($p = 0,27$). Como consequência, o delta do tempo de congelamento entre o primeiro bloco da extinção e o Teste A foi menor no grupo tratado ($p = 0,0002$; **E**). Os valores no gráfico expressam os valores individuais e a média \pm EPM (N por grupo = 8). A cerquilha (#) indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao primeiro bloco de extinção daquele mesmo grupo (ANOVA mista seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). O asterisco

(*) denota uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA mista ou teste t de Student). A seta azul-clara indica o momento do tratamento. Siglas: *Fam.* = Familiarização; *CAC* = Condicionamento Aversivo Contextual; *EI* = Estímulo incondicionado; *VEI* = Veículo; *MUS* = Muscimol; *Ext.* = Extinção.

4 DISCUSSÃO

O papel do IL no processamento de memórias de extinção é amplamente conhecido. No entanto, como a atividade desta região durante as etapas iniciais (i.e., aquisição e consolidação) da formação de memórias aversivas influencia o processo não é algo bem estabelecido. No presente estudo, demonstramos que a atividade e a síntese de novas proteínas no IL durante a consolidação de memórias aversivas contextuais são necessárias para a posterior extinção destas, e para o controle da generalização contextual.

4.1 CONTROLE DO INFRALÍMBICO SOBRE A GENERALIZAÇÃO E INTENSIDADE DA MEMÓRIA

A inativação do IL com muscimol antes do CAC não gerou efeitos significativos sobre os níveis de congelamento nos Testes A e B, mas reduziu o índice de discriminação, indicando que a atividade desta região durante a aquisição de memórias de medo contextual pode estar relacionada ao controle da generalização. Quando o mesmo procedimento foi realizado imediatamente após o CAC (mas não 6 horas após), foi observado o aumento nos níveis de congelamento no Teste B e a diminuição no índice de discriminação no grupo muscimol, sem efeitos no Teste A. Esses resultados se repetiram quando se utilizou um treino de menor intensidade e também quando a memória foi testada uma semana após o condicionamento. Esses dados sugerem que o processamento ou passagem de informação pelo IL, ou ainda, o controle que o IL realiza sobre outras regiões, durante a consolidação, influencia a especificidade mnemônica.

Essa visão vai ao encontro de resultados obtidos por Zelikowsky e colaboradores, que lesionaram o IL antes do condicionamento e observaram aumento na generalização contextual (ZELIKOWSKY *et al.*, 2013). De maneira similar, o estudo de Xu e Südhof demonstrou que a inativação permanente do mPFC (englobando PL+IL) é capaz de aumentar a generalização contextual (XU E SÜDHOF, 2013). Além disso, os resultados de Xu e Südhof sugerem que existe um circuito para controle de especificidade e generalização onde PL e IL modulam a representação hipocampal dos traços de memória através do núcleo reuniens do tálamo (XU E SÜDHOF, 2013). Existem ainda evidências de que a ativação do IL no momento do teste de generalização pode suprimir os níveis de congelamento (SCARLATA *et al.*, 2019). Com base nesses dados, é provável que os resultados obtidos a partir da inativação do IL em nossos

experimentos sejam devido a alterações funcionais do circuito encefálico que governa a consolidação, ou devido a um efeito direto do IL sobre a memória, ou ainda devido a estes dois fatores em conjunto.

Além disso, como salientado por Zelikowsky e colaboradores, o IL pode fazer parte de um sistema importante para aprendizados dependentes de contexto, ao invés de ser responsável apenas pela inibição do medo na extinção (ZELIKOWSKY *et al.*, 2013). Essa visão onde o CPFm seria responsável pelo processamento contextual faz sentido de acordo com o papel do CPFm na evocação de memórias aversivas contextuais remotas (QUINN *et al.*, 2008), e com o fato de que o CPFm e o hipocampo estão em constante comunicação para garantir a consolidação sistêmica de memórias durante a transição entre curto e longo prazo (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). A noção de que o IL faz parte de um sistema importante para o processamento de informações contextuais também vai ao encontro de resultados que demonstram que o padrão de atividade no IL está relacionado com a renovação do medo após a extinção, quando a memória de extinção não apresenta generalização para outros contextos (KNAPSKA E MAREN, 2009; MAREK *et al.*, 2018).

De maneira importante, os resultados acima, obtidos em roedores, estão de acordo com estudos conduzidos em humanos, que demonstram que a hipoatividade do CPFvm está associada a maior generalização (GREENBERG *et al.*, 2013; CHA *et al.*, 2014). Além disso, em experimentos envolvendo a discriminação entre pistas seguras e aquelas que predizem perigo, há evidências de que o IL também é importante nesse tipo de distinção contextual (SANGHA *et al.*, 2014). Assim, o IL parece ser uma importante peça no circuito de controle da generalização de memórias aversivas contextuais (SPALDING, 2018), sendo que a região adjacente (PL) normalmente tem papel oposto nesse sentido: enquanto a ativação do IL durante o teste suprime a generalização (SCARLATA *et al.*, 2019), a ativação do PL durante a consolidação gera o efeito oposto (VANVOSSSEN *et al.*, 2017). Possivelmente a atividade resultante do CPFm como um todo determina como este influencia a especificidade mnemônica, sendo que essa resultante deve depender diretamente dos níveis de atividade nos córtices PL e IL.

Já no experimento 8, que envolveu a infusão de anisomicina no IL após a consolidação, não foram observadas diferenças no Teste B. Apesar disso, houve redução significativa no índice de discriminação. Esse resultado sugere que a inibição da síntese proteica no IL durante a consolidação tem um efeito moderado sobre a generalização das memórias, quando comparado com o efeito observado na extinção (ver próxima seção). É interessante observar

que a inibição da síntese proteica com anisomicina e a inativação temporária com muscimol geraram efeitos diferentes, o que sugere que a atividade da região e a síntese de novas proteínas estão engajadas em processos diferentes durante a consolidação. É provável que intervenções que diminuem a atividade da região alcancem seus efeitos impedindo que ela receba e envie informações para outras regiões, enquanto a inibição da síntese proteica impede o estabelecimento de plasticidade relacionada ao aprendizado no local. Um estudo utilizando uma abordagem similar (i.e., lidocaína para inativar o IL e anisomicina para inibir sua síntese proteica) também encontrou diferenças entre os dois tipos de intervenção farmacológica sobre a aquisição e consolidação da extinção (AWAD *et al.*, 2015).

Uma explicação alternativa para a ausência de efeito da anisomicina nos Testes B é a concentração utilizada (20 µg/hemisfério). No entanto, a faixa de concentração de anisomicina que produz efeitos significativos quando infundida no PL ou IL varia de 12,5 a 62,5 µg/hemisfério (SANTINI *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2011; MOSCARELLO E LEDOUX, 2013; AWAD *et al.*, 2015; RIZZO *et al.*, 2017). Essa possibilidade é pouco provável, uma vez que a mesma dose produziu efeitos significativos no experimento que envolveu uma sessão de extinção. Vale mencionar também que apesar de considerarmos que nossos resultados em experimentos envolvendo tratamentos com anisomicina são decorrentes de uma inibição da síntese proteica, sabe-se que infusões de anisomicina geram efeitos secundários, como alterações nos níveis de monoaminas (CANAL *et al.*, 2007) e atividade neuronal (SHARMA *et al.*, 2012).

Ao contrário das diferenças observadas nos Testes B, não houve diferenças em nenhum dos Testes A realizados neste estudo (exceto aqueles realizados após a extinção, ver próxima seção). Esses resultados indicam que a atividade e síntese proteica do IL durante aquisição e consolidação de memórias aversivas contextuais não são importantes para a formação do traço mnemônico. Essa visão está de acordo com resultados obtidos utilizando lesões antes do condicionamento a pistas (MORGAN *et al.*, 1993), ao contexto (ZELIKOWSKY *et al.*, 2013) e inativação durante a consolidação de memórias de esQUIVA inibitória (WANG *et al.*, 2013). Por outro lado, um estudo utilizando inativação do IL com tetrodotoxina 25 minutos após a aquisição de memórias de esQUIVA inibitória demonstrou redução nas respostas condicionadas (TORRES-GARCÍA *et al.*, 2017). Diferenças na duração da intervenção farmacológica e o momento do tratamento podem explicar a discrepância nos resultados. Além disso, o substrato neural que regula a formação de memórias aversivas contextuais e aquele que regula a formação de memórias de esQUIVA inibitória é parcialmente

sobreposto, porém distinto em vários aspectos (MAREN, 2001; IZQUIERDO *et al.*, 2016), portanto, a influência do IL nestes processos pode variar.

Como previamente mencionado, existem mudanças no padrão de expressão gênica, atividade, e plasticidade no IL durante a consolidação (ZHANG *et al.*, 2011; SOLAR-CEDEÑO *et al.*, 2016; TROYNER *et al.*, 2018). No entanto, essas alterações não parecem influenciar a intensidade das memórias. Ao invés disso, pode ser que essas alterações permitam ajustes na memória aversiva original e as tornem susceptíveis a extinção. Por exemplo, sabe-se que o IL tem sua atividade regulada de maneira bidirecional durante aquisição e extinção de memórias aversivas (SANTINI *et al.*, 2008; RABINAK *et al.*, 2008) e que a atividade e síntese proteica no IL são necessárias para a consolidação da extinção (SANTINI *et al.*, 2004; BURGOS-ROBLES *et al.*, 2007). Assim, apesar de não influenciar a intensidade de memórias aversivas, a atividade do IL durante a consolidação inicial pode ser importante para a formação de memórias aversivas com especificidade contextual.

É importante salientar que nossos resultados não se devem a alterações no comportamento de tipo-ansiedade dos animais durante a inativação do IL, nem a processos não-associativos, como demonstrado nos experimentos 3 e 6. Esse ponto é fundamental pois sabe-se que o IL está envolvido no controle de respostas cardiovasculares, componente importante nas respostas defensivas (RESSEL E CORRÊA 2006; TAVARES *et al.*, 2009), e sua atividade parece ser importante para o controle de comportamentos de tipo-ansiedade (BERG *et al.*, 2019). No entanto, como em nosso estudo não foram observados efeitos significativos do tratamento no LCE, é pouco provável que esse tipo de alteração tenha sido responsável pelos resultados obtidos.

4.2 INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE E SÍNTESE PROTEICA NO INFRALÍMBICO DURANTE A CONSOLIDAÇÃO SOBRE A EXTINÇÃO SUBSEQUENTE

Nos experimentos envolvendo inativação ou inibição da síntese proteica no IL durante a consolidação, ambos os tratamentos prejudicaram a eficiência do treino de extinção. No experimento envolvendo inativação do IL com muscimol, o grupo tratado não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle durante a sessão de extinção, mas apresentou maiores níveis de congelamento no Teste A após a extinção. Esse resultado indica que a atividade do IL durante a consolidação não interfere na aquisição da memória de extinção, já que os animais foram capazes de reduzir seu nível de congelamento durante a sessão. No

entanto, como houve diferenças no Teste A posterior, a atividade do IL durante a consolidação parece ser importante para a consolidação ou retenção da memória de extinção.

Na prática, o padrão de resultados mencionado acima é muito similar ao obtido em estudos onde o IL foi lesionado antes da aquisição, onde a aquisição da memória de extinção não foi afetada, mas sim sua expressão posterior (QUIRK *et al.*, 2000). No entanto, a maior precisão temporal obtida utilizando uma inativação temporária com muscimol permite concluir que a atividade do IL, especificamente durante a consolidação, é necessária para a formação de memórias aversivas contextuais sensíveis a extinção. De modo similar, o estudo de Do-Monte e colaboradores demonstrou que a inibição optogenética do IL durante a sessão de extinção não impede sua aquisição, mas prejudica sua expressão no dia seguinte (DO-MONTE *et al.*, 2015). Assim, uma possibilidade é que a inativação com muscimol tenha impedido o recrutamento do IL durante a extinção e, portanto, gerado um efeito idêntico ao mencionado acima: sem efeitos na sessão de extinção e prejuízo na evocação da extinção. Ora, sabe-se que o IL é necessário para aquisição e consolidação da extinção (LAURENT E WESTBROOK, 2009; DO-MONTE *et al.*, 2015), portanto se um tratamento é inibe a atividade do IL durante ou após a sessão de extinção, o resultado esperado é um prejuízo na evocação da extinção. Assim, é fundamental entender como a inativação do IL durante a consolidação afeta a atividade do mesmo durante o treino de extinção.

É interessante mencionar que alguns estudos sugerem que o papel do IL na extinção é garantir o processamento do contexto onde ela se dá (QUIRK *et al.*, 2000; ZELIKOWSKY *et al.*, 2013; GIUSTINO E MAREN, 2015). Como o aprendizado de extinção é contexto dependente, existe ainda a possibilidade de que a inativação do IL durante a consolidação prejudicou a extinção pelo fato de ter induzido a formação de memórias com pobre representação contextual. No entanto, existem mais evidências para a possibilidade de que o tratamento gerou ausência de recrutamento do IL durante a aquisição e/ou consolidação da extinção. Sabe-se que a redução de respostas defensivas gerada pelo contato social está relacionada com a reativação dos mesmos neurônios do IL que foram recrutados durante a formação das memórias de contato social (GUTZEIT *et al.*, 2019). Além disso, foi demonstrado que os mesmos neurônios do IL recrutados numa sessão de evocação prévia são reativados durante a sessão de extinção (KHALAF E GRÄFF, 2019). Desse modo, faz sentido acreditar que os resultados observados em nosso estudo indicam que algo dessa natureza ocorra, ou seja, que durante a consolidação, neurônios específicos do IL são marcados para serem

posteriormente reativados durante a extinção, e que o tratamento com muscimol impediu este processo.

De maneira similar ao que foi observado após a inativação com muscimol durante a consolidação, a infusão de anisomicina no IL no mesmo momento foi capaz de gerar efeitos sobre o aprendizado de extinção. Também não houve diferenças intra-sessão, indicando que a síntese proteica no IL durante a consolidação não é necessária para a aquisição de memórias de extinção. No entanto, assim como ocorreu no experimento envolvendo inativação, o grupo tratado com anisomicina após o CAC apresentou um prejuízo na evocação da memória de extinção, como observado no Teste A que sucedeu a sessão de extinção. Já era estabelecido que a síntese de novas proteínas no IL é necessária para a consolidação de memórias de extinção (SANTINI *et al.*, 2004; LAURENT E WESTBROOK, 2009; AWAD *et al.*, 2015), mas nossos resultados demonstram que esse processo também é importante durante a consolidação de memórias aversivas, para garantir a consolidação de memórias aversivas sensíveis a extinção.

Em conjunto com o resultado do experimento com muscimol e os estudos que demonstraram que a reativação de neurônios específicos no IL é importante para a atenuação do medo (GUTZEIT *et al.*, 2019; KHALAF E GRÄFF, 2019), os resultados obtidos com anisomicina sugerem que a plasticidade no IL é importante para a consolidação de memórias passíveis de atenuação via extinção. De fato, sabe-se que neurônios que fazem parte do engrama original devem ser reativados para que a extinção do medo possa ocorrer (KHALAF *et al.*, 2018), o que está de acordo com estudos envolvendo psicoterapia, que sugerem que a memória original precisa ser reativada para que terapias baseadas em exposição sejam efetivas (FOA E KOZAK, 1986; NEMEROFF *et al.*, 2006). No entanto, nossos resultados e vários outros mencionados previamente indicam que o IL não está engajado na formação da memória original e, portanto, não seria necessário para a expressão desta durante a extinção. Nesse sentido, uma explicação plausível seria que o recrutamento de neurônios do IL durante a consolidação e sua reativação durante a sessão de extinção permita que os neurônios que de fato subsidiam o engrama sejam reativados e que a memória possa então sofrer extinção. Assim, a aparente aquisição, mas não consolidação da memória de extinção em nossos experimentos podem refletir a ausência de engajamento do IL durante a consolidação da extinção.

É possível que a consolidação envolva a formação de um engrama no IL, que age de forma inibitória sobre os traços que estimulam a generalização e resistência à extinção. Essa visão estaria, em certo nível, de acordo com a teoria de dominância de traço (EISENBERG *et al.*, 2003). Além disso, Mukherjee e Caroni demonstraram que enquanto o PL é necessário para

fazer associações causais iniciais, quando as contingências mudam, o IL é necessário para o estabelecimento de um traço alternativo para garantir o sucesso na tarefa perante as novas condições (MUKHERJEE E CARONI, 2018). Desse modo, faz sentido considerar que os nossos dados sugerem que o traço estabelecido no IL durante a consolidação é necessário para a posterior atenuação da memória recém-consolidada (Figura 17), uma vez que os traços estariam funcionalmente relacionados. No entanto, a confirmação dessa possibilidade depende de estudos futuros, que possam utilizar a marcação de neurônios específicos do IL.

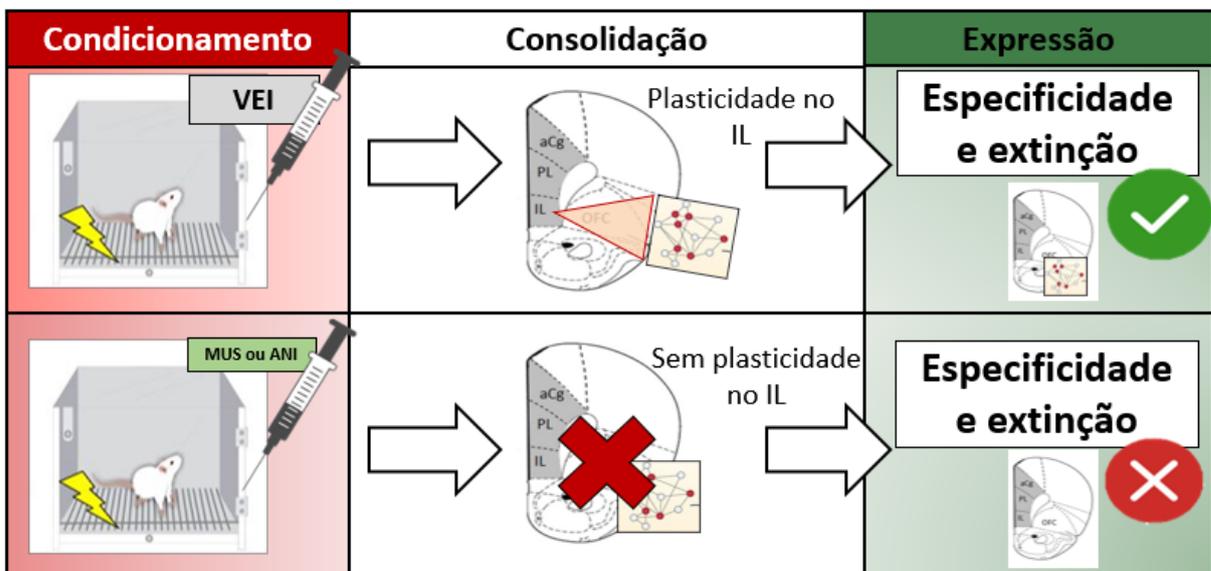


Figura 17. Esquema ilustrando as conclusões do estudo. A linha superior ilustra o que ocorre em situações normais (infusão de VEI): a plasticidade que ocorre no IL durante a consolidação é importante para a especificidade e extinção da memória recém consolidada. Na linha inferior está representada a situação onde imediatamente após o condicionamento é realizado tratamento com MUS ou ANI no IL, a consolidação é afetada e as memórias tornam-se mais generalizadas e resistentes à extinção. Siglas: VEI = veículo; IL = córtex infralímbico; MUS = muscimol; ANI = anisomicina.

4.3 ASPECTOS TRANSLACIONAIS

Nossos resultados ilustram a possibilidade de que a baixa atividade do IL (ou região homóloga no humano – área 25) durante a consolidação de memórias aversivas pode contribuir para a formação de memórias mais resistentes à extinção. Esse tipo de memória é justamente aquele que normalmente está presente em pacientes que sofrem de TEPT. Além disso, foi observado um aumento na generalização decorrente da inativação do IL. Na clínica, uma maior generalização está associada à evitação excessiva de contextos que remetem ao trauma, o que representa um fator preponderante na etiologia do TEPT.

Como já mencionado anteriormente, alguns estudos discutem a possibilidade de a redução na atividade do IL e seu homólogo humano ser um fator de risco ou uma consequência

do TEPT (BREMNER *et al.*, 1999; RAUCH *et al.*, 2003; KOENINGS *et al.*, 2007; YEHUDA E LEDOUX, 2007). No entanto, poucos estudos até o momento foram capazes de determinar o momento em que se iniciou o déficit funcional da região. Sabe-se, a partir de estudos em roedores, que se há uma lesão ou inativação permanente da região antes da aquisição do traço de memória original as memórias se tornam mais resistentes a extinção e generalizadas (MORGAN *et al.*, 1993; XU E SÜDHOF, 2013; ZELIKOWSKY *et al.*, 2013). No entanto, ao utilizar estes protocolos, a região permanece inativada após o aprendizado, durante a extinção, e posterior expressão destas memórias. Assim, nossos resultados aumentam o entendimento longitudinal acerca dos efeitos de inativações no IL, demonstrando que a redução na sua atividade durante a consolidação está associada com a formação de memórias de característica traumática (maior generalização e maior resistência a extinção).

Em conjunto, os dados presentes na literatura indicam que o IL e seu homólogo humano é um alvo a ser atingido em tratamentos farmacológicos e comportamentais. Existe a possibilidade de que um menor grau de ativação da região antes do trauma pode representar um fator de risco em relação ao desenvolvimento do TEPT (PITMAN *et al.*, 2012). A confirmação dessa hipótese em estudos translacionais com humanos seria importante para a maior compreensão da etiologia da doença. No futuro, quando compreendermos melhor os fatores de risco para o TEPT, existe até mesmo a possibilidade de identificá-los na população e evitar a exposição de sujeitos que os apresentem a situações potencialmente traumáticas (serviço militar e policial, por exemplo), além de realizar terapias preventivas nesses casos (PITMAN *et al.*, 2012). Além disso, existem evidências na literatura pré-clínica que a ativação do IL durante a extinção pode melhorar a eficiência de terapias baseadas em exposição. Desse modo, uma outra possibilidade terapêutica é utilizar a estimulação magnética transcraniana para estimular a região homóloga ao IL durante terapias de exposição (como a extinção). Em conjunto, os dados e visões mencionadas acima demonstram o papel crucial do IL no desenvolvimento e remodelamento de memórias traumáticas, e, portanto, tratamentos que possam aumentar a atividade da região podem se mostrar úteis no tratamento do TEPT.

4.4 CONCLUSÕES

O IL é uma região necessária para aprendizados alternativos e atenuação de memórias aversivas através da extinção. Nossos dados demonstram que a atividade e síntese proteica no IL são importantes para a consolidação de memórias aversivas contextualmente específicas e sensíveis à extinção, embora não interfiram com a intensidade da memória original. O estudo esclarece questões longitudinais, adicionando resolução temporal ao que se sabe sobre o papel do IL durante as fases da memória. O maior entendimento sobre os aspectos neurobiológicos envolvidos na formação de memórias generalizadas e resistentes à extinção permite uma melhor avaliação de terapias preventivas e tratamentos a serem desenvolvidos para pacientes com TEPT.

5 REFERÊNCIAS

- ABEL, Ted; LATTAL, K. Matthew. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion In Neurobiology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 180-187, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00194-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00194-x).
- ADDICOTT, M; PEARSON, J M; SWEITZER, M M; BARACK, D L; PLATT, M L. A Primer on Foraging and the Explore/Exploit Trade-Off for Psychiatry Research. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 1931-1939, 29 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2017.108>.
- AIN, Brent R.; LUBAR, Joel F.; MOON, Richard D.; KULIG, Beverly M. Effect of septal and neocortical damage on complex maze learning. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 235-238, mar. 1969. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(69\)90085-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(69)90085-7).
- AMIR, Alon; AMANO, Taiju; PARE, Denis. Physiological identification and infralimbic responsiveness of rat intercalated amygdala neurons. **Journal Of Neurophysiology**, [S.L.], v. 105, n. 6, p. 3054-3066, jun. 2011. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00136.2011>.
- AWAD, Walaa; FERREIRA, Guillaume; MAROUN, Mouna. Dissociation of the Role of Infralimbic Cortex in Learning and Consolidation of Extinction of Recent and Remote Aversion Memory. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 2566-2575, 15 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.103>.
- BARD, Philip. THE CENTRAL REPRESENTATION OF THE SYMPATHETIC SYSTEM. **Archives Of Neurology & Psychiatry**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 230, 1 ago. 1929. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archneurpsyc.1929.02220020046002>.
- BARD, Philip. On emotional expression after decortication with some remarks on certain theoretical views: part ii.. **Psychological Review**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 424-449, 1934. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0071731>.
- BECKER, James T.; OLTON, David S.. Object discrimination by rats: the role of frontal and hippocampal systems in retention and reversal. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 33-38, jan. 1980. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(80\)90010-4](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(80)90010-4).
- BECKER, James T.; WALKER, John A.; OLTON, David S.. Neuroanatomical bases of spatial memory. **Brain Research**, [S.L.], v. 200, n. 2, p. 307-320, nov. 1980. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90922-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(80)90922-1).
- BERG, Laura; ECKARDT, Josephine; MASSECK, Olivia Andrea. Enhanced activity of pyramidal neurons in the infralimbic cortex drives anxiety behavior. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 1, e0210949, 24 jan. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0210949>.
- BIZON, Jennifer L.; FOSTER, Thomas C.; ALEXANDER, Gene E.; GLISKY, Elizabeth L. Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models.

Frontiers In Aging Neuroscience, [S.L.], v. 4, np., 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2012.00019>.

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline. Crouching as an index of fear. **Journal Of Comparative And Physiological Psychology**, [S.L.], v. 67, n. 3, p. 370-375, 1969. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0026779>.

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**, [S.L.], v. 232, n. 2, p. 331-356, 1 jul. 1973. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>.

BLOODGOOD, Daniel W.; SUGAM, Jonathan A.; HOLMES, Andrew; KASH, Thomas L.. Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 8, n. 1, np., 6 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-018-0106-x>.

BREMNER, J. Douglas; STAIB, Lawrence H; KALOUPEK, Danny; SOUTHWICK, Steven M; SOUFER, Robert; CHARNEY, Dennis s. Neural correlates of exposure to traumatic pictures and sound in Vietnam combat veterans with and without posttraumatic stress disorder: a positron emission tomography study. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 45, n. 7, p. 806-816, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00297-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00297-2).

BROWN, J. S.; LAUNDRE, J. W.; GURUNG, M.. The Ecology of Fear: optimal foraging, game theory, and trophic interactions. **Journal Of Mammalogy**, [S.L.], v. 80, n. 2, p. 385-399, 20 maio 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2307/1383287>.

BURGOS-ROBLES, Anthony; VIDAL-GONZALEZ, Ivan; SANTINI, Edwin; QUIRK, Gregory J. Consolidation of Fear Extinction Requires NMDA Receptor-Dependent Bursting in the Ventromedial Prefrontal Cortex. **Neuron**, [S.L.], v. 53, n. 6, p. 871-880, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.021>.

CAMMAROTA, Martín; BEVILAQUA, Lia R. M.; BONINI, Juliana S.; ROSSATTO, Janine I.; MEDINA, Jorge H.; IZQUIERDO, N. Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. **Neurotoxicity Research**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 205-211, jan. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03033222>.

CANAL, C. E.; CHANG, Q.; GOLD, P. E.. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 30, p. 12500-12505, 18 jul. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0705195104>.

CARLÉN, Marie. What constitutes the prefrontal cortex? **Science**, [S.L.], v. 358, n. 6362, p. 478-482, 26 out. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aan8868>.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J.. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**,

[S.L.], v. 29, n. 8, p. 1193-1205, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>.

CASSEL, Jean-Christophe; FERRARIS, Maëva; QUILICHINI, Pascale; CHOLVIN, Thibault; BOCH, Laurine; STEPHAN, Aline; VASCONCELOS, Anne Pereira de. The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: a crossroads for cognition-relevant information processing?. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 126, p. 338-360, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.023>.

CHA, J.; GREENBERG, T.; CARLSON, J. M.; DEDORA, D. J.; HAJCAK, G.; MUJICA-PARODI, L. R.. Circuit-Wide Structural and Functional Measures Predict Ventromedial Prefrontal Cortex Fear Generalization: implications for generalized anxiety disorder. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 34, n. 11, p. 4043-4053, 12 mar. 2014. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3372-13.2014>.

CHIU, Robert; BOYLE, William J.; MEEK, Jennifer; SMEAL, Tod; HUNTER, Tony; KARIN, Michael. The c-fos protein interacts with c-JunAP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. **Cell**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 541-552, ago. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90076-1](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90076-1).

CHOWDHURY, Shoaib; SHEPHERD, Jason D.; OKUNO, Hiroyuki; LYFORD, Gregory; PETRALIA, Ronald S.; PLATH, Niels; KUHL, Dietmar; HUGANIR, Richard L.; WORLEY, Paul F.. Arc/Arg3.1 Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. **Neuron**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 445-459, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033>.

CORNELIS, Marilyn C.; NUGENT, Nicole R.; AMSTADTER, Ananda B.; KOENEN, Karestan C.. Genetics of Post-Traumatic Stress Disorder: review and recommendations for genome-wide association studies. **Current Psychiatry Reports**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 313-326, 12 jun. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11920-010-0126-6>.

CORKIN, Suzanne. What's new with the amnesic patient H.M.? **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 153-160, fev. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn726>.

CRESTANI, Carlos; ALVES, Fernando; GOMES, Felipe; RESSTEL, Leonardo; CORREA, Fernando; HERMAN, James. Mechanisms in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Involved in Control of Autonomic and Neuroendocrine Functions: a review. **Current Neuropharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 141-159, 1 mar. 2013. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x11311020002>.

DAVIDSON, Ruth E.; RICHARDSON, Ann M.. Classical conditioning of skeletal and autonomic responses in the Lizard (*Crotaphytus collaris*). **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 589-594, maio 1970. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(70\)90085-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(70)90085-5).

DIAS, Brian G; RESSLER, Kerry J. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 89-96, 1 dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3594>.

DO-MONTE, Fabricio H.; QUIÑONES-LARACUENTE, Kelvin; QUIRK, Gregory J.. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. **Nature**, [S.L.], v. 519, n. 7544, p. 460-463, 19 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14030>.

DO-MONTE, F. H.; MANZANO-NIEVES, G.; QUINONES-LARACUENTE, K.; RAMOS-MEDINA, L.; QUIRK, G. J.. Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 3607-3615, 25 fev. 2015. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3137-14.2015>.

DREVETS, Wayne C.; SAVITZ, Jonathan; TRIMBLE, Michael. The Subgenual Anterior Cingulate Cortex in Mood Disorders. **CNS Spectrums**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 663-681, ago. 2008. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1092852900013754>.

DUDAI, Yadin. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review Of Psychology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 51-86, fev. 2004. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>.

DUNCAN, Carl P.. The retroactive effect of electroshock on learning. **Journal Of Comparative And Physiological Psychology**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 32-44, 1949. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0058173>.

EDELIN, Jean-Marc; HARS, Bernard; HENNEVIN, Elizabeth; COTILLON, Nathalie. Muscimol Diffusion after Intracerebral Microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. **Neurobiology Of Learning And Memory**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 100-124, jul. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.2001.4035>.

EINARSSON, E. O.; NADER, K. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 449-452, 14 set. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.027227.112>.

EISENBERG, M. Stability of Retrieved Memory: inverse correlation with trace dominance. **Science**, [S.L.], v. 301, n. 5636, p. 1102-1104, 22 ago. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1086881>.

ELLIS, Paul. **The essential guide to effect sizes: Statistical power, meta-analysis, and the interpretation of research results**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

FLEXNER, J. B.; FLEXNER, L. B.; STELLAR, E.; LAHABA, G. de; ROBERTS, R. B.. Inhibition of protein synthesis in brain and learning and memory following puromycin. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 595-605, nov. 1962. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1962.tb04216.x>.

FLEXNER, J. B.; FLEXNER, L. B.; STELLAR, E.. Memory in Mice as Affected by Intracerebral Puromycin. **Science**, [S.L.], v. 141, n. 3575, p. 57-59, 5 jul. 1963. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.141.3575.57>.

FOA, Edna B.; KOZAK, Michael J.. Emotional processing of fear: exposure to corrective information. **Psychological Bulletin**, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 20-35, jan. 1986. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0033-2909.99.1.20>.

FRANKLAND, Paul W.; BONTEMPI, Bruno. The organization of recent and remote memories. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 119-130, fev. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1607>.

FRANKLAND, P. W. Stability of recent and remote contextual fear memory. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 451-457, 1 jul. 2006. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.183406>.

GALILI, D. S.; LUDKE, A.; GALIZIA, C. G.; SZYSZKA, P.; TANIMOTO, H.. Olfactory Trace Conditioning in Drosophila. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 31, n. 20, p. 7240-7248, 18 maio 2011. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.6667-10.2011>.

GALLO, Francisco T.; KATCHE, Cynthia; MORICI, Juan F.; MEDINA, Jorge H.; WEISSTAUB, Noelia V.. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: focus on c-fos, egr1 and arc. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 12, np., 25 abr. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00079>.

GENON, Sarah; REID, Andrew; LANGNER, Robert; AMUNTS, Katrin; EICKHOFF, Simon B.. How to Characterize the Function of a Brain Region. **Trends In Cognitive Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 350-364, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2018.01.010>.

GHIRLANDA, Stefano; ENQUIST, Magnus. A century of generalization. **Animal Behaviour**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 15-36, jul. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/anbe.2003.2174>.

GILMARTIN, Marieke R.; BALDERSTON, Nicholas L.; HELMSTETTER, Fred J.. Prefrontal cortical regulation of fear learning. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 37, n. 8, p. 455-464, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.05.004>.

GIUSTINO, Thomas F.; MAREN, Stephen. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 9, n. 1, np., 9 nov. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>.

GORSKI, John; AIZAWA, Yoshio; MUELLER, Gerald C.. Effect of puromycin in vivo on the synthesis of protein, RNA and phospholipids in rat tissues. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 95, n. 3, p. 508-511, dez. 1961. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90183-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(61)90183-7).

GOTTFRIED, Jay A.; O'DOHERTY, John; DOLAN, Raymond J.. Appetitive and Aversive Olfactory Learning in Humans Studied Using Event-Related Functional Magnetic Resonance Imaging. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 22, n. 24, p. 10829-10837, 15 dez. 2002. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.22-24-10829.2002>.

GREENBERG, Tsafirir; CARLSON, Joshua M.; CHA, Jiok; HAJCAK, Greg; MUJICA-PARODI, Lilianne R.. Ventromedial prefrontal cortex reactivity is altered in generalized

anxiety disorder during fear generalization. **Depression And Anxiety**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 242-250, 8 nov. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/da.22016>.

GUTZEIT, Vanessa A.; AHUNA, Kyliya; SANTOS, Tabia L.; CUNNINGHAM, Ashley M.; ROONEY, Meghan Sadsad; ZAMORA, Andrea Muñoz; DENNY, Christine A.; DONALDSON, Zoe R. Optogenetic reactivation of prefrontal social neural ensembles mimics social buffering of fear. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 1068-1077, 8 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-020-0631-1>.

HAWKINS, Robert D.; BYRNE, John H.. Associative Learning in Invertebrates. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 7, n. 5, np., a021709, 15 abr. 2015. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021709>.

HEBB, Donald Olding. **The organization of behavior; a neuropsychological theory**. Vol. 1, Hoboken: Wiley Press, 1949.

HERRING, Bruce E.; NICOLL, Roger A.. Long-Term Potentiation: from camkii to ampa receptor trafficking. **Annual Review Of Physiology**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 351-365, 10 fev. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071753>.

HERNANDEZ, Pepe J.; ABEL, Ted. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. **Neurobiology Of Learning And Memory**, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 293-311, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2007.09.010>.

HOWARD, Marc W.; EICHENBAUM, Howard. Time and space in the hippocampus. **Brain Research**, [S.L.], v. 1621, p. 345-354, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.069>.

INDA, M. C.. Acquisition, Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Eyelid Conditioning Responses Require De Novo Protein Synthesis. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 25, n. 8, p. 2070-2080, 23 fev. 2005. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4163-04.2005>.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane R. G.; MYSKIW, Jociane C.. Fear Memory. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 695-750, abr. 2016. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>.

JHANG, Jinho; LEE, Hyoeun; KANG, Min Soo; LEE, Han-Sol; PARK, Hyungju; HAN, Jin-Hee. Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, np., 16 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05090-y>.

KANDEL, Eric R. The molecular biology of memory: camp, pka, cre, creb-1, creb-2, and cpeb. **Molecular Brain**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 14-25, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-6606-5-14>.

KHALAF, Ossama; RESCH, Siegfried; DIXSAUT, Lucie; GORDEN, Victoire; GLAUSER, Liliane; GRÄFF, Johannes. Reactivation of recall-induced neurons contributes to remote fear memory attenuation. **Science**, [S.L.], v. 360, n. 6394, p. 1239-1242, 14 jun. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aas9875>.

KHALAF, Ossama; GRÄFF, Johannes. Reactivation of Recall-Induced Neurons in the Infralimbic Cortex and the Basolateral Amygdala After Remote Fear Memory Attenuation. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, [S.L.], v. 12, n. 1, np., 17 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2019.00070>.

KOENIGS, Michael; HUEY, Edward D; RAYMONT, Vanessa; CHEON, Bobby; SOLOMON, Jeffrey; WASSERMANN, Eric M; GRAFMAN, Jordan. Focal brain damage protects against post-traumatic stress disorder in combat veterans. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 232-237, 23 dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn2032>.

KNAPSKA, E.; MAREN, S.. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 486-493, 24 jul. 2009. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.1463909>.

KRABBE, Sabine; GRÜNDEMANN, Jan; LÜTHI, Andreas. Amygdala Inhibitory Circuits Regulate Associative Fear Conditioning. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 83, n. 10, p. 800-809, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.006>.

KUGELMAN, Tara; ZULOAGA, Damian G.; WEBER, Sydney; RABER, Jacob. Post-training gamma irradiation-enhanced contextual fear memory associated with reduced neuronal activation of the infralimbic cortex. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 298, p. 1-11, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.050>.

LAMMEL, Stephan; LIM, Byung Kook; RAN, Chen; HUANG, Kee Wui; BETLEY, Michael J.; TYE, Kay M.; DEISSEROTH, Karl; MALENKA, Robert C.. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. **Nature**, [S.L.], v. 491, n. 7423, p. 212-217, 14 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11527>.

LASHLEY, K. S. **In search of the engram**. In Society for Experimental Biology, Physiological mechanisms in animal behavior. (Society's Symposium IV.) (p. 454–482). Academic Press, 1950.

LAURENT, V.; WESTBROOK, R. F.. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 520-529, 25 ago. 2009. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.1474609>.

LEAL, Graciano; COMPRIDO, Diogo; DUARTE, Carlos B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 76, p. 639-656, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>.

LECHNER, H. A., SQUIRE, L. R., e BYRNE, J. H. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. **Learning & memory**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 77–87, mar. 1999. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/lm.6.2.77>

LI, Lin; CARTER, John; GAO, Xiaoguang; WHITEHEAD, Jennifer; TOURTELLOTTE, Warren G.. The Neuroplasticity-Associated Arc Gene Is a Direct Transcriptional Target of Early Growth Response (Egr) Transcription Factors. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 25, n. 23, p. 10286-10300, 1 dez. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.25.23.10286-10300.2005>.

LI, G.; AMANO, T.; PARE, D.; NAIR, S. S.. Impact of infralimbic inputs on intercalated amygdala neurons: a biophysical modeling study. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 226-240, 24 mar. 2011. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.1938011>.

LOMO, T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in dentate area of hippocampal formation. **Acta Physiologica Scandinavica**, [S.L.], v. 1, p. 128, jan. 1966. PO BOX 88, OSNEY MEAD, OXFORD, OXON, ENGLAND: Blackwell Science Ltd.

LONGO, Nicholas; MILSTEIN, Sandra; BITTERMAN, M. E.. Classical conditioning in the pigeon: exploratory studies of partial reinforcement.. **Journal Of Comparative And Physiological Psychology**, [S.L.], v. 55, n. 6, p. 983-986, 1962. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0049161>.

LUBAR, Joel F.. Effect of medial cortical lesions on the avoidance behavior of the cat. **Journal Of Comparative And Physiological Psychology**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 38-46, 1964. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0041014>.

MAREN, S; FANSELOW, Ms. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 7548-7564, 1 nov. 1995. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.15-11-07548.1995>.

MAREN, Stephen. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 561-567, dez. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01465-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01465-4).

MAREN, Stephen. Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. **Annual Review Of Neuroscience**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 897-931, mar. 2001. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>.

MAREN, Stephen; HOLMES, Andrew. Stress and Fear Extinction. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 58-79, 24 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.180>.

MAREK, Roger; JIN, Jingji; GOODE, Travis D.; GIUSTINO, Thomas F.; WANG, Qian; ACCA, Gillian M.; HOLEHONNUR, Roopashri; PLOSKI, Jonathan E.; FITZGERALD, Paul J.; LYNAGH, Timothy. Hippocampus-driven feed-forward inhibition of the prefrontal cortex mediates relapse of extinguished fear. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 384-392, 5

fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0073-9>.

MCGAUGH, J. L.; CAHILL, L.; ROOZENDAAL, B.. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 93, n. 24, p. 13508-13514, 26 nov. 1996. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.24.13508>.

MILAD, Mohammed R.; QUIRK, Gregory J.. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, [S.L.], v. 420, n. 6911, p. 70-74, nov. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01138>.

MILLER, Earl K.; COHEN, Jonathan D.. An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. **Annual Review Of Neuroscience**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 167-202, mar. 2001. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>.

MISKA, Eric A.; RECHAVI, Oded. Can brain activity transmit transgenerationally? **Current Topics In Developmental Biology**, [S.L.], p. 1-18, 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2021.03.001>.

MOLINIER, Jean; RIES, Gerhard; ZIPFEL, Cyril; HOHN, Barbara. Transgeneration memory of stress in plants. **Nature**, [S.L.], v. 442, n. 7106, p. 1046-1049, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05022>.

MONNÉ, Ludwik. Functioning of the Cytoplasm. **Advances In Enzymology - And Related Areas Of Molecular Biology**, [S.L.], p. 1-69, nov. 1949. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470122532.ch1>.

A MOREY, R; DUNSMOOR, J e; HASWELL, C C; BROWN, V M; A VORA,; WEINER, J; STJEPANOVIC, D; WAGNER, H R; LABAR, K s. Fear learning circuitry is biased toward generalization of fear associations in posttraumatic stress disorder. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 5, n. 12, p. e700, dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2015.196>.

MORGAN, Maria A.; ROMANSKI, Lizabeth M.; LEDOUX, Joseph E.. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 163, n. 1, p. 109-113, nov. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90241-c](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(93)90241-c).

MOSCARELLO, J. M.; LEDOUX, J. E.. Active Avoidance Learning Requires Prefrontal Suppression of Amygdala-Mediated Defensive Reactions. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 3815-3823, 27 fev. 2013. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2596-12.2013>.

MOTTA, Simone C.; CAROBREZ, Antônio P.; CANTERAS, Newton S.. The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 76, p. 39-47, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.012>.

MUKHERJEE, Arghya; CARONI, Pico. Infralimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 2727, 13 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05318-x>.

MÜLLER, G. E., E PILZECKER, A. **Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis**. Vol. 1, Leipzig: JA Barth, 1900.

MYERS, K M; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 120-150, 12 dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001939>.

MYERS-SCHULZ, B; KOENIGS, M. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 132-141, 26 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2011.88>.

NADER, Karim; SCHAFE, Glenn E.; LEDOUX, Joseph E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, [S.L.], v. 406, n. 6797, p. 722-726, ago. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35021052>.

NASSER, H. M.; MCNALLY, G. P.. Neural correlates of appetitive-aversive interactions in Pavlovian fear conditioning. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 220-228, 19 mar. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.029744.112>.

NEMEROFF, Charles B.; BREMNER, J. Douglas; FOA, Edna B.; MAYBERG, Helen S.; NORTH, Carol S.; STEIN, Murray B.. Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. **Journal Of Psychiatric Research**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1-21, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2005.07.005>.

O'DRISCOLL, K.; LEACH, J. P.. "No longer Gage": an iron bar through the head. Early observations of personality change after injury to the prefrontal cortex. **BMJ**, [S.L.], v. 317, n. 7174, p. 1673-1674, 19 dez. 1998. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.317.7174.1673a>.

ÖNGÜR, Dost; FERRY, Amon T.; PRICE, Joseph L.. Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. **The Journal Of Comparative Neurology**, [S.L.], v. 460, n. 3, p. 425-449, 2 jun. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10609>.

OSWALD, Barbara B.; MADDOX, Stephanie A.; HERBST, Matthew R.; POWELL, Donald A. Muscimol infusions to infralimbic cortex impair extinction but not acquisition of a trace eyeblink conditioned response in rabbits. **Psychology & Neuroscience**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 114-129, mar. 2015. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0100355>.

PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes**. Vol. 1, London: Oxford, 1927.

PAXINOS, G., E WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Vol. 1, Amsterdam: Elsevier, 2007.

PELLMAN, Blake A.; KIM, Jeansok J.. What Can Ethobehavioral Studies Tell Us about the Brain's Fear System? **Trends In Neurosciences**, [S.L.], v. 39, n. 6, p. 420-431, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.001>.

PETERS, J.; DIEPPA-PEREA, L. M.; MELENDEZ, L. M.; QUIRK, G. J.. Induction of Fear Extinction with Hippocampal-Infralimbic BDNF. **Science**, [S.L.], v. 328, n. 5983, p. 1288-1290, 3 jun. 2010. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1186909>.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E.. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 106, n. 2, p. 274-285, 1992. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.274>.

PITMAN, Roger K.. Will Reconsolidation Blockade Offer a Novel Treatment for Posttraumatic Stress Disorder? **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 5, p. 1-11, 2011. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00011>.

PITMAN, Roger K.; RASMUSSEN, Ann M.; KOENEN, Karestan C.; SHIN, Lisa M.; ORR, Scott P.; GILBERTSON, Mark W.; MILAD, Mohammed R.; LIBERZON, Israel. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 769-787, 10 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3339>.

QUINN, J. J.; MA, Q. D.; TINSLEY, M. R.; KOCH, C.; FANSELOW, M. S.. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 368-372, 25 abr. 2008. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.813608>.

QUIRK, Gregory J.; RUSSO, Gregory K.; BARRON, Jill L.; LEBRON, Kelimer. The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 20, n. 16, p. 6225-6231, 15 ago. 2000. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.20-16-06225.2000>.

RABINAK, C. A.; ZIMMERMAN, J. M.; CHANG, C.-H.; ORSINI, C. A.. Bidirectional Changes in the Intrinsic Excitability of Infralimbic Neurons Reflect a Possible Regulatory Role in the Acquisition and Extinction of Pavlovian Conditioned Fear. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 28, n. 29, p. 7245-7247, 16 jul. 2008. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2130-08.2008>

RAUCH, Scott L.; SHIN, Lisa M.; SEGAL, Ethan; PITMAN, Roger K.; CARSON, Margaret A.; MCMULLIN, Katherine; WHALEN, Paul J.; MAKRIS, Nikos. Selectively reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder. **Neuroreport**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 913-916, 23 maio 2003. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.wnr.0000071767.24455.10>.

RESCORLA, Robert A.. Pavlovian conditioning: it's not what you think it is.. *American Psychologist*, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 151-160, 1988. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0003-066x.43.3.151>.

RESSTEL, L.B.M.; CORRÊA, F.M.A.. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. *Autonomic Neuroscience*, [S.L.], v. 126-127, p. 130-138, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2006.02.022>.

RIAZ, Sadia; PUVENDRAKUMARAN, Pugaliya; KHAN, Dinat; YOON, Sharon; HAMEL, Laurie; ITO, Rutsuko. Prelimbic and infralimbic cortical inactivations attenuate contextually driven discriminative responding for reward. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 9, n. 1, n. 3982, 8 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40532-7>.

RIZZO, Valerio; TOUZANI, Khalid; RAVEENDRA, Bindu L.; SWARNKAR, Supriya; LORA, Joan; KADAKKUZHA, Beena M.; LIU, Xin-An; ZHANG, Chao; BETEL, Doron; STACKMAN, Robert W.. Encoding of Contextual Fear Memory Requires De Novo Proteins in the Prelimbic Cortex. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 158-169, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpsc.2016.10.002>.

ROGAN, Michael T.; STÄUBLI, Ursula V.; LEDOUX, Joseph E.. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, [S.L.], v. 390, n. 6660, p. 604-607, 1 dez. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/37601>.

ROOM, Peter; RUSSCHEN, Fokje T.; GROENEWEGEN, Henk J.; LOHMAN, Anthony H. M.. Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *The Journal Of Comparative Neurology*, [S.L.], v. 242, n. 1, p. 40-55, 1 dez. 1985. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902420104>.

ROSAS-VIDAL, Luis e; DO-MONTE, Fabricio H; SOTRES-BAYON, Francisco; QUIRK, Gregory J. Hippocampal–Prefrontal BDNF and Memory for Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology*, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 2161-2169, 14 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.64>.

ROSE, Jerzy E.; WOOLSEY, Clinton N.. Structure and relations of limbic cortex and anterior thalamic nuclei in rabbit and cat. *The Journal Of Comparative Neurology*, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 279-347, dez. 1948. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.900890307>.

RUSSELL, W. Ritchie; NATHAN, P. W.. Traumatic amnesia. *Brain*, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 280-300, 1946. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/brain/69.4.280>.

SANGHA, Susan; ROBINSON, Paul D; GREBA, Quentin; A DAVIES, Don; HOWLAND, John G. Alterations in Reward, Fear and Safety Cue Discrimination after Inactivation of the Rat Prelimbic and Infralimbic Cortices. *Neuropsychopharmacology*, [S.L.], v. 39, n. 10, p. 2405-2413, 14 abr. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.89>.

SANTINI, E.. Consolidation of Fear Extinction Requires Protein Synthesis in the Medial Prefrontal Cortex. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 24, n. 25, p. 5704-5710, 23 jun. 2004. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0786-04.2004>.

SANTINI, E.; QUIRK, G. J.; PORTER, J. T.. Fear Conditioning and Extinction Differentially Modify the Intrinsic Excitability of Infralimbic Neurons. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 28, n. 15, p. 4028-4036, 9 abr. 2008. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2623-07.2008>.

SCARLATA, M. J.; LEE, S. H.; LEE, D.; KANDIGIAN, S. E.; HILLER, A. J.; DISHART, J. G.; MINTZ, G. E.; WANG, Z.; COSTE, G. I.; MOUSLEY, A. L.. Chemogenetic stimulation of the infralimbic cortex reverses alcohol-induced fear memory overgeneralization. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, n. 6730, 30 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-43159-w>.

NEYLAN, Thomas C.. Memory and the Medial Temporal Lobe. **The Journal Of Neuropsychiatry And Clinical Neurosciences**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 103-103, fev. 2000. American Psychiatric Association Publishing. <http://dx.doi.org/10.1176/jnp.12.1.103>.

SEARLE, Kate R.; STOKES, Chris J.; GORDON, Iain J.. When foraging and fear meet: using foraging hierarchies to inform assessments of landscapes of fear. **Behavioral Ecology**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 475-482, 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arn004>.

SEMON, R. (1904). *Die Mneme*. Vol. 1, London: George Allen e Unwin.

SHARMA, A. V.; NARGANG, F. E.; DICKSON, C. T.. Neurosilence: profound suppression of neural activity following intracerebral administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 32, n. 7, p. 2377-2387, 15 fev. 2012. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3543-11.2012>.

SHIN, Lisa M.; WRIGHT, Christopher I.; CANNISTRARO, Paul A.; WEDIG, Michelle M.; MCMULLIN, Katherine; MARTIS, Brian; MACKLIN, Michael L.; LASKO, Natasha B.; CAVANAGH, Sarah R.; KRANGEL, Terri S.. A Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Amygdala and Medial Prefrontal Cortex Responses to Overtly Presented Fearful Faces in Posttraumatic Stress Disorder. **Archives Of General Psychiatry**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 273, 1 mar. 2005. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.62.3.273>.

SIERRA-MERCADO, Demetrio; PADILLA-COREANO, Nancy; QUIRK, Gregory J. Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 529-538, 20 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2010.184>.

SILVA, Bianca A.; MATTUCCI, Camilla; KRZYWKOWSKI, Piotr; CUOZZO, Rachel; CARBONARI, Laura; GROSS, Cornelius T.. The ventromedial hypothalamus mediates predator fear memory. **European Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 43, n. 11, p. 1431-1439, 29 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.13239>.

SOLER-CEDENO, Omar; CRUZ, Emmanuel; CRIADO-MARRERO, Marangelie; PORTER, James T.. Contextual fear conditioning depresses infralimbic excitability. **Neurobiology Of Learning And Memory**, [S.L.], v. 130, p. 77-82, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.015>.

SOTRES-BAYON, Francisco; QUIRK, Gregory J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion In Neurobiology**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 231-235, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2010.02.005>.

SPALDING, Kelsey N.. The role of the medial prefrontal cortex in the generalization of conditioned fear. **Neuropsychology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 1-17, jan. 2018. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/neu0000384>.

STEIN, Murray B.; JANG, Kerry L.; TAYLOR, Steven; VERNON, Philip A.; LIVESLEY, W. John. Genetic and Environmental Influences on Trauma Exposure and Posttraumatic Stress Disorder Symptoms: a twin study. **American Journal Of Psychiatry**, [S.L.], v. 159, n. 10, p. 1675-1681, out. 2002. American Psychiatric Association Publishing. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.159.10.1675>.

STERN, C. A. J.; GAZARINI, L.; VANVOSSSEN, A. C.; HAMES, M. S.; BERTOGLIO, L. J.. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 753-759, 16 dez. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.032631.113>.

TANG, Jianrong; KO, Shanellie; DING, Hoi-Ki; QIU, Chang-Shen; A CALEJESAN, Amelita; ZHUO, Min. Pavlovian Fear Memory Induced by Activation in the Anterior Cingulate Cortex. **Molecular Pain**, [S.L.], v. 1, p. 1744-8069, 1 jan. 2005. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-1-6>.

TAVARES, R.F.; CORRÊA, F.M.A.; RESSTEL, L.B.M.. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. **Journal Of Neuroscience Research**, [S.L.], v. 87, n. 11, p. 2601-2607, 15 ago. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22070>.

TORRES-GARCÍA, María E.; MEDINA, Andrea C.; QUIRARTE, Gina L.; PRADO-ALCALÁ, Roberto A.. Differential Effects of Inactivation of Discrete Regions of Medial Prefrontal Cortex on Memory Consolidation of Moderate and Intense Inhibitory Avoidance Training. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 8, 17 nov. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00842>.

TSAI, Li-Huei; GRÄFF, Johannes. On the resilience of remote traumatic memories against exposure therapy-mediated attenuation. **Embo Reports**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 853-861, 16 jul. 2014. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/embr.201438913>.

TROYNER, F. Papel do núcleo reuniens do tálamo na consolidação de memórias aversivas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, 2017. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/176922>

TROYNER, Fernanda; BICCA, Máira A.; BERTOGLIO, Leandro J.. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. **Hippocampus**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 602-616, ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22964>.

TULVING, Endel. 12. **Episodic and Semantic Memory**. Organization of memory/Eds E. Tulving, W. Donaldson, NY: Academic Press, p. 381-403, 1972.

TULVING, Endel. Synergistic ephory in recall and recognition. **Canadian Journal Of Psychology/Revue Canadienne de Psychologie**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 130-147, 1982. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0080641>.

TONEGAWA, Susumu; LIU, Xu; RAMIREZ, Steve; REDONDO, Roger. Memory Engram Cells Have Come of Age. **Neuron**, [S.L.], v. 87, n. 5, p. 918-931, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>.

VANVOSSSEN, Ana C.; PORTES, Marina A.M.; SCOZ-SILVA, Rafael; REICHMANN, Hugo B.; STERN, Cristina A.J.; BERTOGLIO, Leandro J.. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. **Neurobiology Of Learning And Memory**, [S.L.], v. 137, p. 154-162, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.002>.

WANISCH, Klaus; WOTJAK, Carsten T.. Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. **Neurobiology Of Learning And Memory**, [S.L.], v. 90, n. 3, p. 485-494, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.02.007>.

WANG, X. Q., LI, X. L., E WANG, G. W. Effect of prefrontal infralimbic cortex GABA-A receptor agitating on passive avoidance memory consolidation in rats. **Dongwuxue yanjiu = Zoological research**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 589-595, nov. 2013. SCI-E. <https://doi.org/10.11813/j.issn.0254-5853.2013.6.0589>

WATANABE, Hidehiro; MIZUNAMI, Makoto. Pavlov's Cockroach: classical conditioning of salivation in an insect. **Plos One**, [S.L.], v. 2, n. 6, e529, 13 jun. 2007. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000529>.

WATKINS, Laura E.; SPRANG, Kelsey R.; ROTHBAUM, Barbara O.. Treating PTSD: a review of evidence-based psychotherapy interventions. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 12, 2 nov. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00258>.

WILTGEN, Brian J.; SANDERS, Matthew J.; BEHNE, Nicholas S.; FANSELOW, Michael S.. Sex differences, context preexposure, and the immediate shock deficit in Pavlovian context conditioning with mice. **Behavioral Neuroscience**, [S.L.], v. 115, n. 1, p. 26-32, 2001. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.115.1.26>.

WILTGEN, B. J.; SILVA, A. J.. Memory for context becomes less specific with time. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 313-317, 1 abr. 2007. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.430907>.

XXU, W.; SUDHOF, T. C.. A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. **Science**, [S.L.], v. 339, n. 6125, p. 1290-1295, 14 mar. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1229534>.

YARMOLINSKY, M. B.; HABA, G. L. D. L.. Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 45, n. 12, p. 1721-1729, 1 dez. 1959. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.45.12.1721>.

YEHUDA, Rachel; LEDOUX, Joseph. Response Variation following Trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. **Neuron**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 19-32, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.006>.

YORK, G. K.; STEINBERG, D. A. **An introduction to the life and work of John Hughlings Jackson with a catalogue raisonné of his writings**. Medical history. Vol. 51, Supplement 26, 3–157, Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

ZAVALA, Albert. Classical Conditioning in Frogs (*Rana pipiens*). **Journal Of Herpetology**, [S.L.], v. 1, n. 1/4, p. 83, 29 mar. 1968. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/1563265>.

ZELIKOWSKY, M.; BISSIERE, S.; HAST, T. A.; BENNETT, R. Z.; ABDIPRANOTO, A.; VISSSEL, B.; FANSELOW, M. S.. Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 24, p. 9938-9943, 15 maio 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1301691110>.

ZHANG, Yue; FUKUSHIMA, Hotaka; KIDA, Satoshi. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. **Molecular Brain**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 4, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-6606-4-4>.

APÊNDICE A – Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation



OPEN

Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation

Hugo Bayer & Leandro Jose Bertoglio

Lesioning or inactivating the infralimbic (IL) subregion of the medial prefrontal cortex before acquisition produces more generalized and extinction-resistant fear memories. However, whether and how it modulates memory specificity and extinction susceptibility while consolidation takes place is still unknown. The present study aims to investigate these questions using muscimol-induced temporary inactivation and anisomycin-induced protein synthesis inhibition in the rat IL following contextual fear conditioning. Results indicate that the IL activity immediately after acquisition, but not six hours later, controls memory generalization over a week, regardless of its strength. Such IL function depends on the context-shock pairing since muscimol induced no changes in animals exposed to immediate shocks or the conditioning context only. Animals in which the IL was inactivated during consolidation extinguished similarly to controls within the session but were unable to recall the extinction memory the following day. Noteworthy, these post-acquisition IL inactivation-induced effects were not associated with changes in anxiety, as assessed in the elevated plus-maze test. Anisomycin results indicate that the IL protein synthesis during consolidation contributes more to producing extinction-sensitive fear memories than memory specificity. Collectively, present results provide evidence for the IL's role in controlling generalization and susceptibility to extinction during fear memory consolidation.

To cope with life-threatening events, most animals rely on aversive memories and, thus, the appropriate formation of them are essential and conserved across species^{1,2}. Aversive memories may vary according to quantitative (e.g., intensity) and qualitative (e.g., specificity) aspects³. The study of when, how, and where into the brain such features are established is scientifically relevant, and contributes to discovering/developing better interventions that could have therapeutic value to tackle traumatic memories^{4,5}, which are commonly overgeneralized and more resistant to extinction^{6,7}.

Newly acquired aversive memories require a gradual consolidation to become stable and long-lasting⁸. This process involves the activity and plasticity in several interconnected brain regions, including the hippocampus, amygdala, and medial prefrontal cortex⁹. Interventions aiming at temporarily inactivating their activity or inhibiting their consolidation-associated protein synthesis carried out immediately after acquisition have been shown by many to affect memory intensity¹⁰. On the other hand, how specific (or generalized) and prone to extinction is the aversive memory when these experimental approaches are performed during consolidation have been less addressed.

The rodent infralimbic (IL) subregion of the medial prefrontal cortex has been shown to modulate the specificity and generalization attributes of cued and contextual fear memories at the acquisition stage: pre-training damage to the IL¹¹ or inactivation of both IL and prelimbic (PL)¹² was sufficient to produce memory overgeneralization. Similarly, lesioning or inactivating the IL before cued or contextual fear memory acquisition induced a relative resistance to extinction^{11,13,14}. The IL has also been associated with aversive memory consolidation. Zhang et al.¹⁵ reported an increase in the induction of c-fos and Arc expression in IL during inhibitory avoidance memory consolidation. Torres-García et al.¹⁶ reported that temporary IL inactivation with tetrodotoxin impaired the consolidation of inhibitory avoidance training. In contrast, there were no effects of temporary IL

Departamento de Farmacologia, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário s/n, Florianópolis, SC 88049-900, Brazil. email: leandro.bertoglio@ufsc.br

inactivation with muscimol on inhibitory avoidance memory consolidation¹⁷. Studies focusing on cued or contextual fear memory consolidation have also reported changes in the IL, including depressed intrinsic neuronal excitability^{18,19} and increased Arc expression²⁰, but not c-fos induction or histone acetylation^{21,22}. Post-acquisition gamma irradiation potentiated the consolidation of a contextual fear memory trace, an effect associated with reduced IL neuronal activation²³. Together, these findings suggest that associative learning of aversive events induces complex patterns of IL activation and plasticity. However, whether IL influences memory specificity/generalization and extinction susceptibility while consolidation occurs is yet to be investigated.

Based on the above, the present study sought to investigate the effects of muscimol-induced temporary inactivation and anisomycin-induced protein synthesis inhibition in the rat IL during the consolidation of contextual fear memory on its intensity, specificity, and subsequent extinction. The working hypothesis was that the memory would become more intense, generalized, and less prone to extinction following these interventions. Since either lesioning or inactivating the rat IL has occasionally been reported to interfere with anxiety^{24,25}, we investigated whether anxiety-related changes could contribute to post-acquisition IL inactivation effects on contextual fear memory intensity, generalization, and susceptibility to extinction. To this aim, animals were tested in the elevated plus-maze shortly after contextual fear conditioning and IL infusion of muscimol or vehicle.

Materials and methods

Animals. A total of 196 male Wistar rats aged 13–15 weeks was used in the present study. Animals were obtained from local breeding facilities, kept in groups of 3–4 in polypropylene cages (50 × 30 × 15 cm) on a 12 h light/dark cycle, with lights on at 7 AM, and had free access to water and standard laboratory chow. The Institutional Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals from our University approved this study in compliance with Brazilian legislation and the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

IL stereotaxic surgery. Animals were deeply anesthetized using 1.0 ml/kg of a solution of xylazine (10 mg/ml; Syntec, Brazil) and ketamine (100 mg/ml; Syntec, Brazil), placed in a stereotaxic frame, then local anesthesia with lidocaine 3.0% and epinephrine 1:50,000 (Dentsply, Brazil) was applied. Two stainless steel guide cannulae (22 G, 11 mm) were implanted aimed at the IL cortex following coordinates (AP: +3.2 mm from Bregma, ML: +0.6 mm, DV: –2.1 mm) from the rat brain atlas by Paxinos and Watson²⁶, and fixed to the skull using acrylic resin and two stainless steel screws. An obturator (30G) was inserted inside each guide cannula to reduce possible occlusion. For post-surgery analgesia, anti-inflammatory, and antipyretic actions, animals received an intramuscular injection of flunixin meglumine (2.5 mg/kg; Schering-Plough, Brazil). Animals were given at least ten days of recovery before behavioral testing.

Drugs and infusion procedure. The GABA_A receptor agonist muscimol (MUS; Tocris, USA), which suppresses the neurophysiologic activity within 0.5–1.0 mm of the infusion site²⁷, was brought to a final concentration of 0.46 µg/µl using phosphate-buffered saline (PBS) 0.1 M. The protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI; Sigma-Aldrich, USA), which inhibits most of de novo protein synthesis for at least 3 h²⁸, was dissolved in PBS 0.1 M to obtain a final concentration of 100 µg/µl. PBS 0.1 M served as the vehicle for both drugs.

On the day of intra-IL infusion, obturators were removed, and the treatment was delivered using two 14 mm dental needles (30G) connected to microsyringes of 5.0 µl by polyethylene tubing (PE10) inserted into the guide cannulae while the animal was gently restrained with a towel. Either 0.2 µl of drug or vehicle solution was given bilaterally for one min using an infusion pump. The needles remained inside guide-cannulae for one min after the end of injections to reduce possible drug backflow.

Contextual fear conditioning and elevated plus-maze apparatuses, behavioral procedures, and data collection.

Most aspects mentioned in this section were conducted as fully described elsewhere^{20,29,30}. Briefly, contextual fear conditioning was performed in a rectangular chamber (35 × 20 × 30 cm), with aluminum sidewalls and a front wall and ceiling-door made of Plexiglas, designated herein as context A. Its grid floor, made of stainless steel bars, was connected to a circuit board and a shock generator (Insight, Brazil) to enable the delivery of controlled electrical shocks, as subsequently detailed. The elevated plus-maze was made of wood and consisted of two opposite open-arms (50 × 10 cm) surrounded by a 1.0 cm high Plexiglas edge and two enclosed-arms (50 × 10 × 40 cm), set up 50 cm above the floor. The junction area of the four arms (central platform) measured 10 × 10 cm.

Behavioral procedures were conducted in rooms under the illumination of 70 lx, from 9 AM to 5 PM. Unless otherwise specified (experiment 6), on day 1 each animal was placed alone in context A and allowed to explore it freely for 3 min, as a familiarization session, and then returned to its home cage.

On day 2, each animal was again placed in context A for fear conditioning, during which it received, after an initial 30 s delay, the unconditioned stimulus (US), which consisted of 3 electrical shocks of 1.0 mA for 3 s, with a 30 s inter-trial interval. The animal remained in this chamber for another 30 s before returning to its home cage. The treatment was given immediately after this session, except in experiment 2, where it was given six hours later as a control since most interventions no longer influence memory consolidation when given at this time-point⁸.

In experiment 6, to investigate whether drug-induced effects depend on the shock-context pairing, the day 2 procedure also included either animals merely exposed to the context A (the CTX only group) or animals not familiarized with context A in which three electrical shocks (1.0 mA for 3 s, with a 5 s inter-trial interval) were delivered in a 20 s pseudo-conditioning session (the US only group). Of note, neither fear conditioning³¹ nor learning-related changes in the IL excitability¹⁹ were induced by similar pseudo-conditioning procedures.

To assess the treatment effects on memory intensity and specificity, in the following days, animals were exposed for 3 min to the conditioned context A (Test A) and the novel, unpaired context B (Test B), which consisted of a square chamber (30 × 30 × 30 cm) with glass sidewalls and floor, and a white grid lid. In experiment 4, Tests A and B were performed seven and eight days after contextual fear conditioning, respectively.

To assess the treatment effects on memory extinction, in experiments 7 and 9, animals underwent a 15-min session (further divided into five blocks of 3 min) of exposure to the conditioned context A without US presentation one day after contextual fear conditioning. Tests A and B were performed 6 and 7 days later, respectively, to evaluate extinction learning effectiveness.

The time spent freezing, defined as the ceasing of all body and head movements, except the flank movements related to breathing³², was used as a fear memory index for all experiments. Such response was quantified in seconds by a trained observer (inter- and intra-observer reliabilities ≥ 90%) blind to the experimental groups and expressed as the percentage of total session time.

A five min test in the elevated plus-maze was conducted as previously described³³. A trained observer blind to the experimental design scored the following behavioral measures from the DVD: the number of open- and enclosed-arms entries (EAE) with the four paws as well as the time spent in open- and enclosed-arms. Raw data were used to calculate the percentage of entries [%OAE; (open-arms entries/(open- + enclosed-arms entries)) × 100] and time spent in open-arms [%OAT; [(time in open-arms/300) × 100]]. The number of stretched-attend postures (SAPs), defined as a posture in which the subject stretches forward and then retracts to its original position, performed from the central platform or enclosed-arms towards open-arms, was also recorded. It has been shown that the animal's anxiety response level may be inferred from inhibitory avoidance (%OAT and %OAE) and risk assessment (SAPs) behaviors, and the number of EAE is considered an elevated plus-maze index of general exploratory activity³⁴.

Histology. Most aspects mentioned in this section were conducted as fully described elsewhere^{20,29,30}. Briefly, at the end of the experiments, animals were anesthetized as already described for surgery, received a lethal dose of chloral hydrate (3.0 ml/kg of a 15% solution). Then Evans Blue (0.2 μl) was infused into the IL with the same needle used in the respective experiment for subsequent evaluation of the infusion site. Brains were removed and immersed in a 4.0% formalin solution and, later, sucrose 30%, for 48 h each. Then, brain slices (50 μm thick) were obtained in a cryostat, mounted on glass microscope slides, and stained with cresyl violet to determine the infusion site. Its location in the IL ranged from 3.7 to 2.7 mm anterior to Bregma. Figure 1 shows a photomicrograph of the rat IL with infusion sites. Animals receiving the treatment outside this medial prefrontal cortex subregion (about 20%) were excluded from the analysis.

Statistical analysis. After ensuring the assumptions of normality with Shapiro–Wilk's *W* test and homogeneity of variance with Levene's test, freezing times expressed during Tests A and B were subjected to a mixed analysis of variance (ANOVA) in which the independent factors were treatment and test sessions. The same approach was used to compare the time spent freezing in the first extinction session block with that expressed during Test A. For extinction session data, a mixed ANOVA was carried out in which the independent factors were treatment and time-bin. The Newman–Keuls test was used for *post-hoc* multiple comparisons in the above-mentioned cases. The discrimination index (the difference between the percentage of time spent freezing during Test A and Test B, divided by the sum of the two percentages), the elevated plus-maze data, and the delta of the freezing time (the difference between the percentage of time spent freezing during the first extinction block and Test A) used in experiments 7 and 9 were analyzed using two-sample unpaired Student *t*-tests. The statistical significance level was set at $p < 0.05$. For statistical analysis, Statistic 13.5 (StatSoft, EUA) was used, and GraphPad Prism 8.02 (GraphPad Prism, EUA) was used for graphing.

The effect size was calculated using the formula for Hedges' *g* to reflect the mean-difference between two groups ($n \leq 20$ per group) that could be dissimilar in size. A $g \geq 0.8$ was considered a large effect size³⁵. The sample size determined by power analysis was 8 animals per group ($\alpha = 0.05$; $\beta = 0.20$ and standardized effect size or Cohen's $d = 1.0$). The group sizes were equal by design, but due to experimental losses (when treatment was infused outside the target brain region) or the violation of the predetermined exclusion criterion (fear-conditioned animals were those spending at least 35% of freezing behavior during Test A or first extinction block, except for the experiment 4 where there was a single context-shock pairing), in a few cases, they were unequal. We have replaced the exclusions in an attempt to keep the study balanced and to maintain its power.

Results

Experiment 1: Effects of IL inactivation during the consolidation of a contextual fear memory on its intensity and specificity. Thirty animals were randomly allocated to two groups based on the treatment (vehicle, $n = 15$; muscimol, $n = 15$) given immediately after pairing the context A with three shocks (Fig. 2A). In the following days, both groups were exposed to the conditioned context (Test A) and the novel,

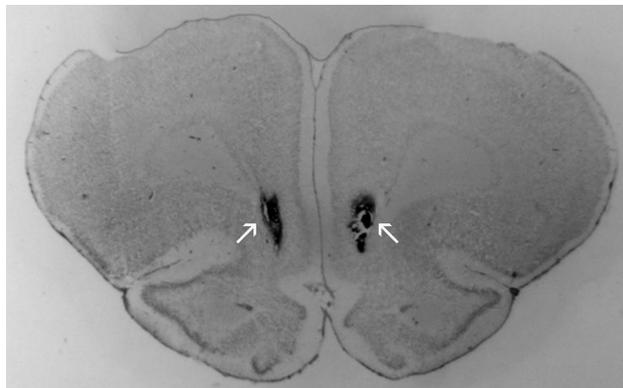


Figure 1. Photomicrograph of representative infusion sites placement (indicated by arrows) in the rat infralimbic cortex (~3.2 mm anterior to Bregma).

neutral context B (Test B) in a counterbalanced order (i.e., half of animals of each group performed Test B before Test A). In both groups, data of the latter animals did not differ qualitatively from those in which Test A was performed before Test B. Therefore, they were merged for the statistical analysis. To assess treatment effects on memory specificity and generalization, data from Tests A and B were used to calculate the discrimination index.

A mixed ANOVA showed significant effects of treatment ($F_{1,28} = 4.2$; $p = 0.04$), test sessions ($F_{1,28} = 166.1$; $p = 0.00001$), and their interaction ($F_{1,28} = 4.5$; $p = 0.04$) for freezing time. As shown in Fig. 2B, Newman–Keuls *post-hoc* tests showed that muscimol and vehicle groups behaved similarly during Test A ($p = 0.61$; Hedges' g effect size = 0.25), but during Test B animals treated with muscimol presented higher levels than controls ($p = 0.02$; $g = 0.94$). Furthermore, there were significant treatment effects for the discrimination index ($t_{1,28} = 8.1$; $p = 0.008$). As shown in Fig. 2C, muscimol-treated animals presented lower values than controls ($p = 0.008$; $g = 1.04$).

Experiment 2: Effects of IL inactivation six hours after the acquisition of a contextual fear memory on its intensity and specificity. To test whether the abovementioned findings depend on the time elapsed between fear conditioning and IL inactivation, 18 animals had the context A paired with three shocks but only received the treatment (vehicle, $n = 9$; muscimol, $n = 9$) six hours later (Fig. 2D). Tests A and B were performed on the following days. Their data were used to calculate the discrimination index.

A mixed ANOVA showed significant effects of test sessions ($F_{1,16} = 211.47$; $p = 0.00001$), but not treatment ($F_{1,16} = 0.10$; $p = 0.75$) or interaction between these factors ($F_{1,16} = 0.05$; $p = 0.81$) for freezing time. As shown in Fig. 2E, muscimol and vehicle groups behaved similarly during both Tests A and B. Regarding the discrimination index, there were also no significant treatment effects ($t_{1,16} = 0.17$; $p = 0.90$) (Fig. 2F).

Experiment 3: Acute effects of IL inactivation immediately after contextual fear memory acquisition on the expression of anxiety-related behaviors. To investigate the possibility that augmented freezing time seen during Test B performed 24 h after fear conditioning and IL inactivation (Experiment 1) was associated with changes in anxiety-related behaviors, 11 animals had context A paired with three shocks and then were randomly allocated to two groups based on the treatment (vehicle, $n = 6$; muscimol, $n = 5$) given immediately after that. Both groups performed the elevated plus-maze test 45 min later (Fig. 2G).

Unpaired Student's *t*-tests showed no significant effects of treatment for inhibitory avoidance (%OAT: $t_9 = 0.70$, $p = 0.50$ and %OAE: $t_9 = 0.58$, $p = 0.57$), risk assessment (SAPs: $t_9 = 1.2$; $p = 0.25$), and general exploratory activity (EAE: $t_9 = 0.31$, $p = 0.76$) in the elevated plus-maze test. As shown in Fig. 2H, muscimol-treated rats did not differ significantly from controls in any of these behavioral measures, indicating that post-acquisition IL inactivation effects were not due to altered levels of anxiety during consolidation.

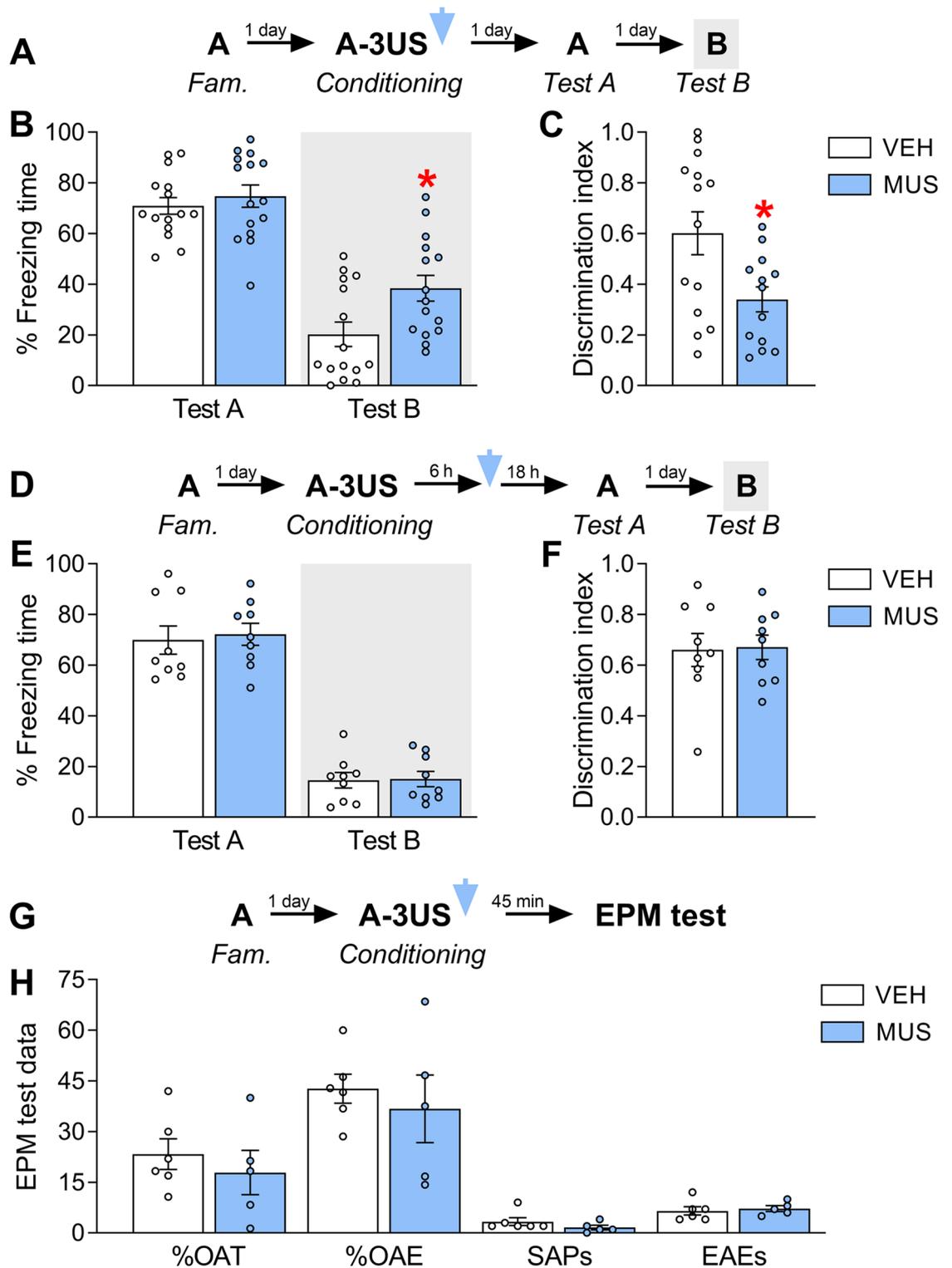


Figure 2. Effects of IL inactivation by muscimol (MUS) immediately (*upper graphs*) or six hours after (*middle graphs*) the acquisition of contextual fear memories on their expression in the paired context A (Test A) and the novel, neutral context B (Test B), and on anxiety-related behavior and general exploratory activity assessed in the elevated plus-maze (EPM) test 45 min later (*lower graph*). (A) Experiment 1’s design. (B) MUS-treated animals presented comparable freezing times to controls (VEH) during Test A. However, they had higher levels during Test B. (C) The MUS group presented lower discrimination index values than the VEH group. (D) Experiment’s 2 design. (E) MUS-treated animals presented comparable freezing times to VEH during both Tests A and B. (F) The MUS group presented similar discrimination index values to the VEH group. (G) Experiment’s 3 design. (H) MUS-treated animals and controls behaved similarly in either case [anxiety: % open-arm time (%OAT), % open-arm entries (%OAE) and stretched-attend postures (SAPs); general exploratory: enclosed-arm entries (%EAEs)]. Values are expressed as individual units and mean \pm S.E.M. (n per group in experiment 1 = 15; experiment 2 = 9; and experiment 3 = 5–6). The * denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$) from the respective control group (mixed ANOVA followed by the Newman–Keuls test or unpaired t-test).

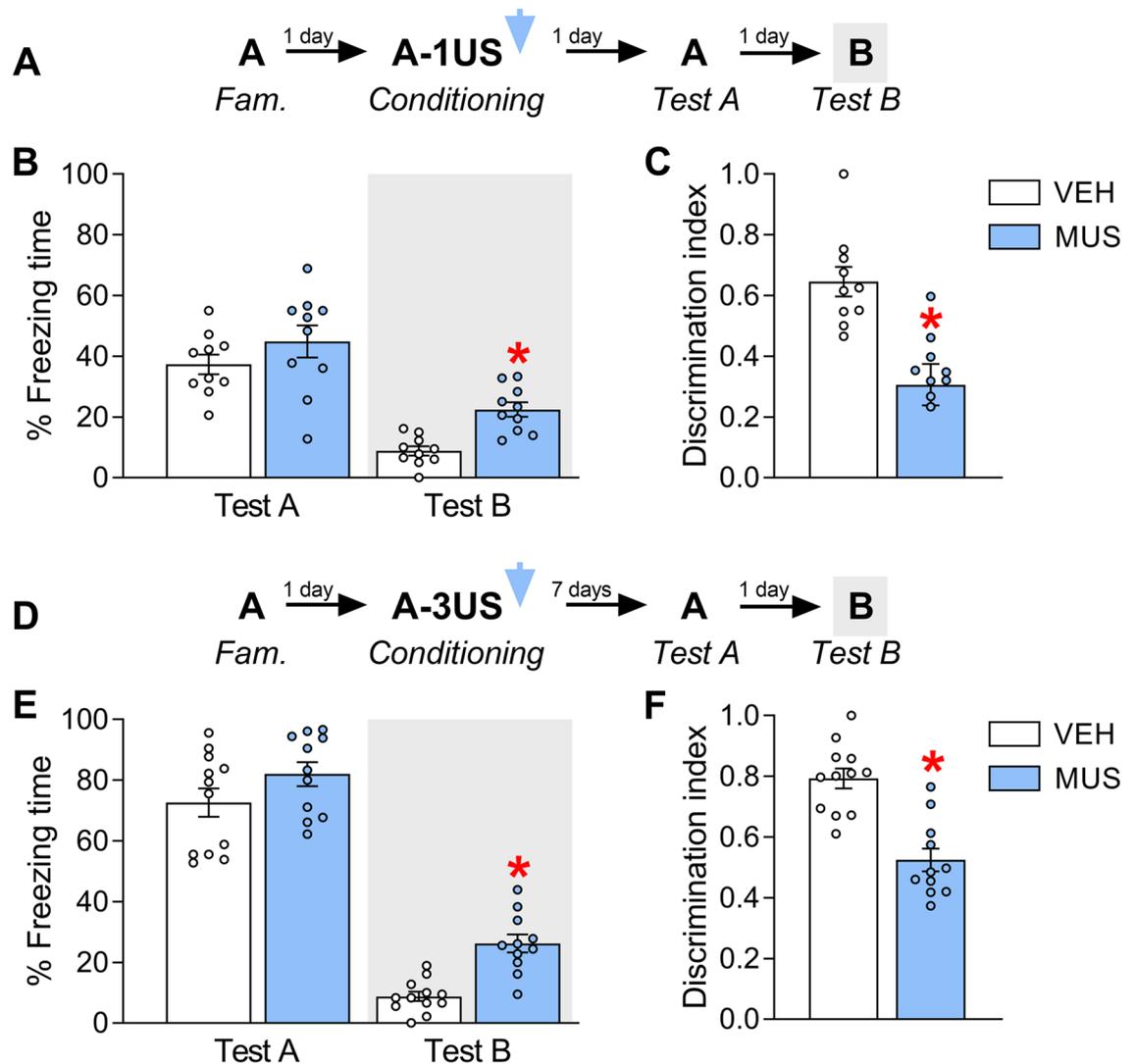


Figure 3. Effects of IL inactivation by muscimol (MUS) immediately after weak contextual fear memory acquisition on expression in the paired context A (Test A) and the novel, neutral context B (Test B) evaluated at a recent time point (*upper graphs*), or after strong contextual fear memory acquisition evaluated at a more remote time point (*lower graphs*). (A) Experiment 4's design. (B) MUS-treated animals presented comparable freezing times to controls (VEH) during Test A. However, they had higher levels during Test B. (C) The MUS group presented lower discrimination index values than the VEH group. (D) Experiment's 5 design. (E) MUS-treated animals presented comparable freezing times to VEH during Test A, although they had higher levels during Test B. (F) The MUS group presented lower discrimination index values than the VEH group. Values are expressed as individual units and mean \pm S.E.M. (n per group in experiment 4 = 10; and experiment 5 = 11–12). The * denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$) from the respective control group (mixed ANOVA followed by the Newman–Keuls test or unpaired t-test).

Experiment 4: Effects of IL inactivation during the consolidation of a weaker contextual fear memory on its intensity and specificity. Freezing times close to the ceiling level could have concealed possible differences between groups during Test A in experiment 1. To evaluate this possibility, 20 animals were randomly allocated to two groups based on the treatment (vehicle, $n = 10$; muscimol, $n = 10$) given immediately after pairing the context A with a single shock (Fig. 3A). Tests A and B were performed on the following days, and their data were used to calculate the discrimination index.

A mixed ANOVA showed significant effects of treatment ($F_{1,18} = 6.5$; $p = 0.02$), test sessions ($F_{1,18} = 106.6$; $p = 0.00001$), but not their interaction ($F_{1,18} = 1.5$; $p = 0.23$), for freezing time. As shown in Fig. 3B, unprotected Newman–Keuls tests showed that muscimol and vehicle groups behaved similarly during Test A ($p = 0.21$; $g = 0.54$), but animals treated with muscimol presented higher levels than controls during Test B ($p = 0.03$; $g = 2.16$). Moreover, there were significant treatment effects for the discrimination index ($t_{1,18} = 16.3$; $p = 0.001$). As shown in Fig. 3C, muscimol-treated animals presented lower values than controls ($p = 0.001$; $g = 1.80$).

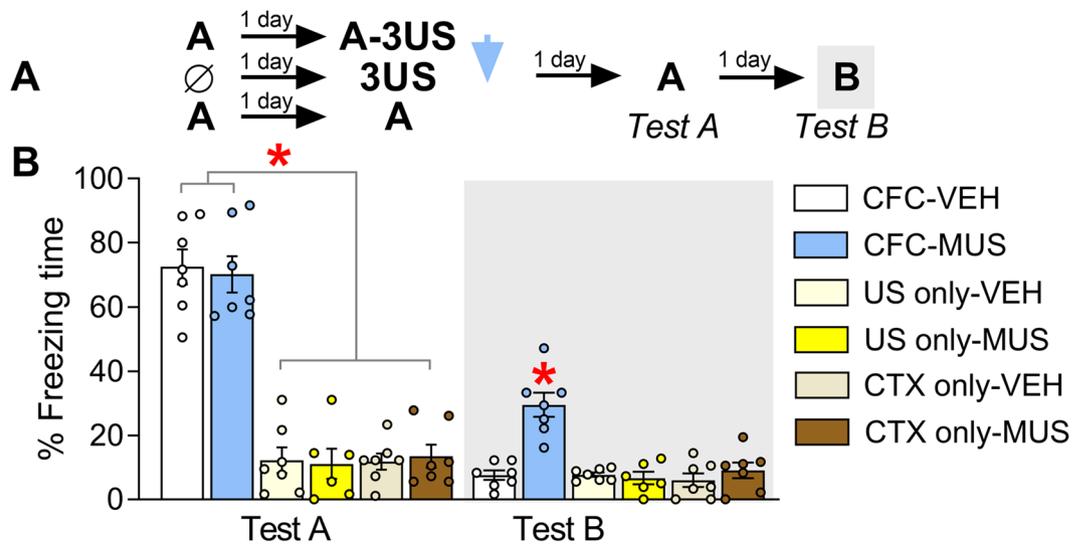


Figure 4. Effects of IL inactivation by muscimol (MUS) after pairing the context A with three shocks (CFC), exposure to immediate foot-shocks (US only) or the mere exposure to the context A (CTX only), on freezing time expressed during exposure to contexts A (Test A) and B (Test B). (Experiment 6). (A) The experimental design used. (B) During Test A, both CFC-VEH and CFC-MUS groups expressed significantly higher freezing levels than the others did. The CFC-MUS group presented higher freezing levels than the others did during Test B. Values are expressed as individual units and mean \pm S.E.M. (n per group = 6–7). The * denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$) from all the other groups in the same session (mixed ANOVA followed by the Newman–Keuls test).

Experiment 5: Effects of IL inactivation during the consolidation of a contextual fear memory on its intensity and specificity evaluated at a more remote time point. To investigate whether IL inactivation-induced effects persist for longer periods, 23 animals were randomly allocated to two groups based on the treatment (vehicle, $n = 12$; muscimol, $n = 11$) given immediately after pairing the context A with three foot-shocks (Fig. 3D). Tests A and B were performed 7 and 8 days later.

A mixed ANOVA showed significant effects of treatment ($F_{1,21} = 10.9$; $p = 0.003$), test sessions ($F_{1,21} = 450.2$; $p = 0.00001$), but not their interaction ($F_{1,21} = 2.1$; $p = 0.17$), for freezing time. As shown in Fig. 3E, unprotected Newman–Keuls tests showed that muscimol and vehicle groups behaved similarly during Test A ($p = 0.12$; $g = 0.63$), but animals treated with muscimol presented higher levels than controls during Test B ($p = 0.006$; $g = 2.21$). Moreover, there were significant treatment effects for the discrimination index ($t_{1,21} = 28.8$; $p = 0.0001$). As shown in Fig. 3F, muscimol-treated animals presented lower values than controls ($p = 0.0001$; $g = 2.23$).

Experiment 6: Are the effects of IL inactivation on fear generalization learning-dependent? To examine this question (i.e., whether muscimol-induced effects are not associated with fear sensitization or drug effects per se), 41 animals were allocated to six groups based on the procedure they underwent on days 1 and 2 (context A-shock pairing—CFC—as in experiment 1; US only or CTX only), and the treatment (vehicle or muscimol) given immediately after that (Fig. 4A). Tests A and B were performed on the following days. The experimental groups were as follow: CFC-VEH, $n = 7$; CFC-MUS, $n = 7$; US only-VEH, $n = 7$; US only-MUS, $n = 6$; context only-VEH, $n = 7$; and context only-MUS, $n = 7$.

A mixed ANOVA showed a significant day 2 procedure *versus* treatment *versus* test sessions interaction ($F_{2,35} = 4.8$; $p = 0.01$) for freezing time. As shown in Fig. 4B, CFC-MUS and CFC-VEH groups behaved similarly during Test A ($p = 0.67$; $g = 0.16$) but presented higher freezing time levels than the other groups ($p \leq 0.0001$; $g \geq 4.38$), which did not differ from each other ($p \geq 0.89$; $g \leq 0.03$). During Test B, the CFC-MUS group presented higher levels than the others ($p \leq 0.009$; $g \geq 2.07$).

Experiment 7: Effects of IL inactivation during the consolidation of a contextual fear memory on its subsequent extinction. To determine whether IL inactivation during consolidation interferes with subsequent extinction learning and retention, 16 animals were randomly allocated to two groups based on the treatment (vehicle, $n = 8$; muscimol, $n = 8$) given immediately after pairing the context A with three shocks (Fig. 5A). On the next day, both groups underwent a 15-min extinction session (context A re-exposure without US presentation). Test A (to assess the recall of extinction learning) and Test B (to assess whether extinction learning influences freezing expressed in context B) were performed six and seven days later.

For extinction session data, a mixed ANOVA showed significant effects of time-bin ($F_{4,56} = 52.7$; $p = 0.00001$) and interaction between time-bin and treatment ($F_{4,56} = 2.7$; $p = 0.04$), but not treatment ($F_{1,14} = 1.0$; $p = 0.32$). As shown in Fig. 5B, whereas vehicle-treated animals presented lower freezing time values from the second to the fifth extinction session block relative to the first one ($p \leq 0.0001$; $g \geq 4.71$), those treated with muscimol only

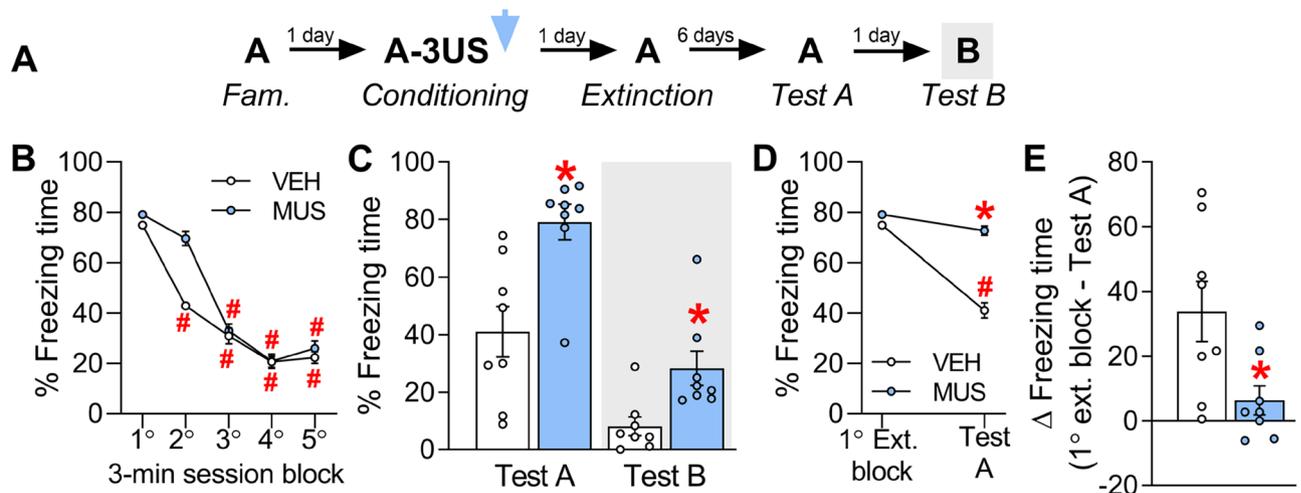


Figure 5. Effects of IL inactivation by muscimol (MUS) during the consolidation of a contextual fear memory on its extinction, and expression in the paired context A (Test A) and the context B (Test B) (Experiment 7). (A) The experimental design used. (B) The freezing time reduction throughout the extinction session in MUS-treated animals was similar to controls (VEH group). (C) MUS-treated animals did not retain the extinction learning as well as the VEH group, as observed during Test A. On Test B, they kept expressing more freezing time than controls. (D) To estimate how efficient the extinction learning and memory process was, the time spent freezing in the first extinction session block and that expressed during Test A were compared. There was a difference indicative of a sufficient extinction in animals treated with VEH, but not MUS. As a result, the freezing time delta was lower in MUS-treated animals than controls (E). Values are expressed as individual units and/or mean \pm S.E.M (n per group = 8). The # represents a significant difference ($p < 0.05$) from the respective first extinction session block (mixed ANOVA followed by the Newman–Keuls test). The * denotes a statistically significant difference from the respective control group (mixed ANOVA followed by the Newman–Keuls test or unpaired t-test).

presented a significant reduction from the third to the fifth extinction session block ($p \leq 0.0001$; $g \geq 2.81$). No differences between groups were found across any extinction session block ($p \geq 0.11$; $g \leq 1.56$).

For Tests A and B data, a mixed ANOVA showed significant effects of test sessions ($F_{1,14} = 45.5$; $p = 0.0001$) and treatment ($F_{1,14} = 15.7$; $p = 0.004$), but not their interaction ($F_{1,14} = 1.0$; $p = 0.33$). As shown in Fig. 5C, unprotected Newman–Keuls tests showed that muscimol-treated animals presented higher freezing time levels than controls during both Test A ($p = 0.005$; $g = 1.54$) and Test B ($p = 0.05$; $g = 1.49$).

To estimate how efficient the extinction learning and memory process was, the time spent freezing in the first 3-min extinction session block (Fig. 5B) and that expressed during the 3-min Test A (Fig. 5C) were compared. A mixed ANOVA showed significant effects of treatment ($F_{1,14} = 10.2$; $p = 0.01$), test sessions ($F_{1,14} = 15.0$; $p = 0.02$), and their interaction ($F_{1,14} = 7.0$; $p = 0.02$). As shown in Fig. 5D, there were reduced values in animals treated with vehicle ($p = 0.001$; $g = 1.89$), but not muscimol ($p = 0.67$; $g = 0.60$). Similarly, as shown in Fig. 5E, there were significant treatment effects for the freezing time delta ($t_{1,14} = 6.9$; $p = 0.02$).

Experiment 8: Effects of IL protein synthesis inhibition during the consolidation of a contextual fear memory consolidation on its intensity and specificity.

To investigate whether ILs influence on memory consolidation depends on protein synthesis, 16 animals were randomly allocated to two groups based on the treatment (vehicle, $n = 8$; anisomycin, $n = 8$) given immediately after pairing the context A with three shocks (Fig. 6A). Tests A and B were performed on the following days.

A mixed ANOVA showed significant effects of test sessions ($F_{1,14} = 177.3$; $p = 0.00001$), but not treatment ($F_{1,14} = 1.1$; $p = 0.31$) or interaction between these factors ($F_{1,14} = 1.8$; $p = 0.20$), for freezing time. As shown in Fig. 6B, unprotected Newman–Keuls tests showed that anisomycin and vehicle groups presented similar values during both Tests A ($p = 0.93$; $g = 0.03$) and B ($p = 0.14$; $g = 1.65$). There were significant treatment effects for the discrimination index ($t_{1,14} = 10.3$; $p = 0.006$). As shown in Fig. 6C, drug-treated animals presented lower values than controls ($p = 0.006$; $g = 1.60$).

Experiment 9: Effects of IL protein synthesis inhibition during the consolidation of a contextual fear memory on its subsequent extinction.

To this aim, 20 animals were randomly allocated to two groups based on the treatment (vehicle, $n = 10$; anisomycin, $n = 10$) given immediately after pairing the context A with three shocks (Fig. 6D). On the next day, both groups underwent a 15-min extinction learning session. Tests A and B were performed six and seven days later, respectively.

For extinction session data, a mixed ANOVA showed significant effects of time-bin ($F_{4,72} = 30.67$; $p = 0.000001$), but not treatment ($F_{1,18} = 1.36$; $p = 0.25$) or interaction between these factors ($F_{4,72} = 0.76$; $p = 0.55$). As shown in Fig. 6E, both groups presented lower freezing time values from the second to the fifth extinction session block

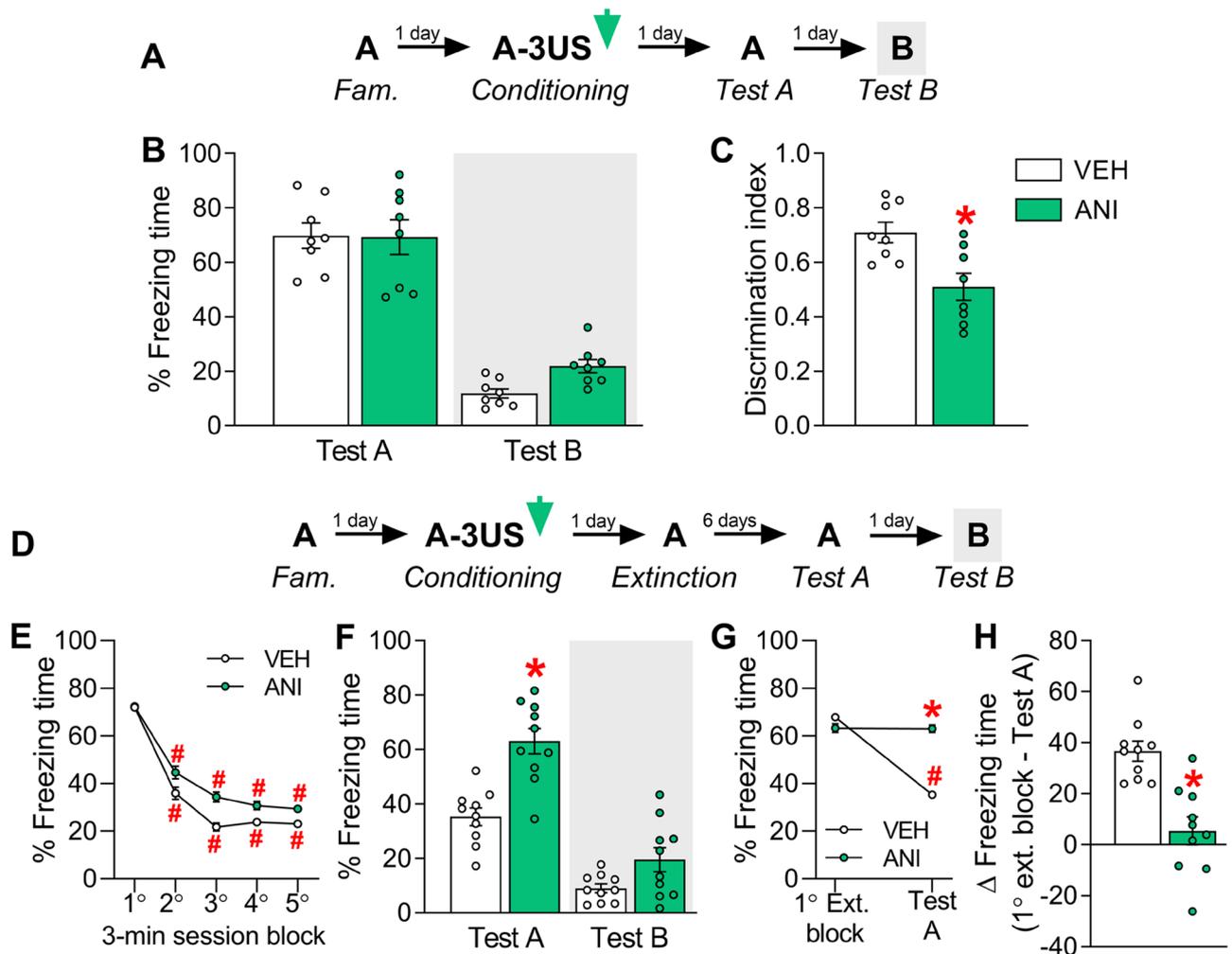


Figure 6. Effects of IL protein synthesis inhibition by anisomycin (ANI) during the consolidation of a contextual fear memory either on its expression in the paired context A (Test A) and the context B (Test B) (upper graphs) or on its extinction and Tests A and B (lower graphs). (A) Experiment's 8 design. (B) ANI-treated animals presented comparable freezing times to controls (VEH) during Tests A and B ($p=0.14$). (C) The ANI group presented lower discrimination index values than the VEH group. (D) Experiment's 9 design. (E) The freezing time reduction throughout the extinction session in ANI-treated animals was similar to controls (VEH) group. (F) ANI-treated animals did not retain the extinction learning as well as the VEH group, as observed during Test A. On Test B, no differences ($p=0.09$) were found. (G) To estimate how efficient the extinction learning and memory process was, the time spent freezing in the first extinction session block and that expressed during Test A were compared. There was a difference indicative of a sufficient extinction in animals treated with VEH, but not ANI. As a result, the freezing time delta was lower in ANI-treated animals than controls (H). Values are expressed as individual units and/or mean \pm S.E.M (n per group in experiment 8 = 8; and experiment 9 = 10). The # represents a significant difference ($p < 0.05$) from the respective first extinction session block (mixed ANOVA followed by the Newman-Keuls test). The * denotes a statistically significant difference from the respective control group (mixed ANOVA followed by the Newman-Keuls test or unpaired t-test).

relative to their respective first one ($p \leq 0.0008$; $g \geq 1.08$). No differences between groups were found across any extinction session block ($p \geq 0.47$; $g \leq 0.32$).

For Tests A and B, a mixed ANOVA showed significant effects of test sessions ($F_{1,18} = 120.2$; $p = 0.00001$), treatment ($F_{1,18} = 21.7$; $p = 0.0002$), and their interaction ($F_{1,18} = 7.4$; $p = 0.01$). As shown in Fig. 6F, anisomycin-treated animals presented higher freezing time levels than controls during Test A ($p = 0.0003$; $g = 2.20$), but not Test B ($p = 0.09$; $g = 0.99$).

To estimate how efficient the extinction learning and memory process was, the time spent freezing in the first extinction session block (Fig. 6E) and that expressed during Test A (Fig. 6F) were compared. A mixed ANOVA showed significant effects of treatment ($F_{1,18} = 6.6$; $p = 0.02$), test sessions ($F_{1,18} = 38.9$; $p = 0.00001$), and their interaction ($F_{1,18} = 21.5$; $p = 0.0002$). As shown in Fig. 6G, there were reduced values in animals treated with vehicle ($p = 0.0001$; $g = 3.37$), but not anisomycin ($p = 0.27$; $g = 0.36$). Similarly, as shown in Fig. 6H, there were significant treatment effects on the freezing time delta ($t_{1,18} = 21.5$; $p = 0.0002$).

Discussion

Inactivating the IL immediately after, but not six hours later, pairing the context A with either one or three shocks significantly reduced the ability to restrict freezing to the conditioned context, as seen during Test B performed 2 and 8 days after conditioning and inferred by the discrimination index. This result indicates that information processed in the IL, or at least passing through this medial prefrontal cortex subregion, during consolidation influences memory specificity. It is in line with that reported by Zelikowsky et al.¹¹ and Xu and Südhof¹², which lesioned the IL and inactivated both IL and PL, respectively, before contextual fear memory acquisition in rodents that later presented higher freezing times than controls when exposed to a novel and neutral context. Xu and Südhof¹² have suggested a neural circuitry for fear memory specificity and generalization in which IL and PL modulate memory trace representations in the hippocampus through the thalamic nucleus reuniens. Based on this, the IL inactivation performed in our experiments has presumably affected the functional interaction of the neuronal circuitry underlying consolidation. Collectively, their data and ours suggest that the IL controls contextual fear memory specificity at acquisition and consolidation phases by suppressing generalization. Importantly, this view is consistent not only with animal and human cued fear conditioning results³⁶ but also with the IL's contribution to discriminate between fear and safety cues in both contextual and cued fear conditioning^{37,38}. Of note, the post-acquisition IL inactivation-induced memory generalization was not associated with changes in anxiety-related behaviors. Besides, the IL and the adjacent PL typically have opposite roles in learning and memory processing³⁹, a feature also valid to fear overgeneralization. Whereas stimulating the IL activity suppresses it⁴⁰, a similar approach applied to the PL can promote it⁴¹.

Unlike Test B, there were no differences between muscimol and vehicle groups during Test A in any experiment conducted here (except experiment 7, in which it was carried out post-extinction). This result indicates that intensity is not a primary memory aspect influenced by the IL activity during consolidation. It is in line with that reported by Wang et al.¹⁷, which inactivated the IL with muscimol during the consolidation of inhibitory avoidance memory in animals that later behaved similarly to controls. In contrast, there was a relative reduction in inhibitory avoidance when the IL was inactivated with tetrodotoxin 25 min after training¹⁶. Differences in the duration of the pharmacological intervention used and the moment it was given may account for the mixed findings. Besides, the neural substrate regulating contextual fear conditioning and inhibitory avoidance is thought to be overlapping yet distinct¹⁰ and, thus, the relative IL contribution in each case may vary. Importantly, as previously mentioned, changes in IL plasticity patterns are associated with aversive memory consolidation. However, they do not necessarily influence memory intensity upon retrieval and expression. Instead, they could allow adjustments in mechanisms supporting the original aversive memory to retain the extinction one^{21,42–44}. For instance, whereas fear conditioning was sufficient to depress the IL intrinsic excitability^{18,19}, fear extinction produced the opposite outcome⁴⁵. Of note, dampening the excitability of IL neurons is accompanied by impaired extinction consolidation⁴⁶.

Animals in which the IL was inactivated during consolidation extinguished similarly to controls within the session but were unable to recall the extinction memory the following day. This result is in line with that found when the IL was lesioned or inactivated before cued and contextual fear memory acquisition^{12–14}, suggesting that the IL controls the formation of extinction-sensitive fear memories at both stages. Of note, activity in the IL similarly has a role not only after consolidation, in maintaining extinction-sensitive fear memories⁴⁷, but also during their extinction acquisition and consolidation^{48–50}. Furthermore, post-extinction Test B data from muscimol-treated animals in experiment 7 and those from controls (without extinction) in experiments 1 and 5 are alike, suggesting that a single session of extinction learning was insufficient to attenuate the overgeneralization produced by IL inactivation after memory acquisition.

Our result showing that anisomycin-treated animals extinguished within the session but were unable to recall the extinction memory the following day is equivalent to that seen with muscimol and indicates that protein synthesis in the IL is necessary for consolidating extinction-sensitive contextual fear memories. This finding agrees with those relating *de novo* protein synthesis requirement in the IL to fear extinction memory consolidation^{51,52}. Of note, reactivating the IL neuronal ensembles involved in the original memory engram during remote fear extinction is thought to be required for fear attenuation⁵³. Similarly, recruiting the IL neuronal population activated during social interaction can alleviate conditioned fear responses⁵⁴. Collectively, data suggest that activity and plasticity in the IL during initial learning stages are essential for posterior suppression of fear. In this context, future studies are guaranteed to examine remaining open questions. For instance, is the memory engram representing fear memory in the IL suppressed by another representing the extinction learning? Alternatively, is extinction learning achieved through changes in the original engram representing the fear memory?

Although there were no statistically significant differences in *p*-values between anisomycin and vehicle groups during Test A and Test B (the effect size was significant in this case) in experiment 8, a reduction in the discrimination index was shown. This result suggests that protein synthesis in the IL has moderate effects on specificity and generalization attributes of the memory during consolidation compared to those exerted on extinction retention. The study by Awad et al.⁵² used a similar approach (i.e., comparing lidocaine-induced temporary inactivation with anisomycin-induced protein synthesis inhibition) and found subtle quantitative differences as well. A possible explanation for the absence of anisomycin-induced effects on Test B is the dose of 20 µg/hemisphere used here. The dose range in which this drug produces significant effects when infused into the IL or PL varies from 12.5 to 62.5 µg/hemisphere^{15,51,52,55,56}. However, that possibility is unlikely since the same dose interfered with extinction retention (experiment 9), being selected here because it provides more spatially precise protein synthesis inhibition than the dose of 62.5 µg/hemisphere²⁸. Of note, we considered our results as if anisomycin primarily had impaired the protein synthesis in the IL. However, it is acknowledged that its administration can also interfere with other processes presumed to be necessary for cellular memory consolidation, including monoamine levels⁵⁷ and neural activity⁵⁸.

In summary, either suppressing the activity or inhibiting protein synthesis in the IL during contextual fear consolidation produces more generalized and extinction-resistant memories. At least three not mutually excluding potential explanations may account for this pattern of findings, namely: (i) it represents the direct IL influence over brain regions supporting aversive memory consolidation; (ii) it results from the lack of modulation of other interconnected areas of the underlying circuitry through the IL; and (iii) it is associated with a failure in establishing an inhibitory engram in the IL during memory consolidation. Whatever the case, the precise neural basis and plastic mechanisms underlying the IL-related changes reported here require further examination.

Data availability

All data supporting this study are available from the corresponding author upon request.

Received: 16 April 2020; Accepted: 3 September 2020

Published online: 28 September 2020

References

- Walters, E. T., Carew, T. J. & Kandel, E. R. Associative learning in Aplysia: Evidence for conditioned fear in an invertebrate. *Science* **211**, 504–506 (1981).
- Adolphs, R. The biology of fear. *Curr. Biol.* **23**, R79–93. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.055> (2013).
- Asok, A., Kandel, E. R. & Rayman, J. B. The neurobiology of fear generalization. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 329. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00329> (2019).
- Milad, M. R. & Quirk, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: Ten years of progress. *Annu. Rev. Psychol.* **63**, 129–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.13163> (2012).
- Maren, S., Phan, K. L. & Liberzon, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 417–428. <https://doi.org/10.1038/nrn3492> (2013).
- Pitman, R. K. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. *Biol. Psychiatry* **26**, 221–223 (1989).
- Dunsmoor, J. E., Niv, Y., Daw, N. & Phelps, E. A. Rethinking extinction. *Neuron* **88**, 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.028> (2015).
- Dudai, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. *Annu. Rev. Psychol.* **55**, 51–86 (2004).
- Frankland, P. W. & Bontempi, B. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 119–130 (2005).
- Izquierdo, I., Furini, C. R. & Myskiw, J. C. Fear memory. *Physiol. Rev.* **96**, 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015> (2016).
- Zelikowsky, M. *et al.* Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 9938–9943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301691110> (2013).
- Xu, W. & Südhof, T. C. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* **339**, 1290–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1229534> (2013).
- Quirk, G. J., Russo, G. K., Barron, J. L. & Lebron, K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *J. Neurosci.* **20**, 6225–6231 (2000).
- Oswald, B. B., Maddox, S. A., Herbst, M. R. & Powell, D. A. Muscimol infusions to infralimbic cortex impair extinction but not acquisition of a trace eyeblink conditioned response in rabbits. *Psychol. Neurosci.* **8**, 114–129. <https://doi.org/10.1037/h0100355> (2015).
- Zhang, Y., Fukushima, H. & Kida, S. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol. Brain* **4**, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-4> (2011).
- Torres-García, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L. & Prado-Alcalá, R. A. Differential effects of inactivation of discrete regions of medial prefrontal cortex on memory consolidation of moderate and intense inhibitory avoidance training. *Front. Pharmacol.* **8**, 842. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00842> (2017).
- Wang, X. Q., Li, X. L. & Wang, G. W. Effect of prefrontal infralimbic cortex GABAA receptor agonist on passive avoidance memory consolidation of rats. *Dongwuxue Yanjiu* **34**, 589–595 (2013).
- Santini, E., Quirk, G. J. & Porter, J. T. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. *J. Neurosci.* **28**, 4028–4036. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2623-07.2008> (2008).
- Soler-Cedeño, O., Cruz, E., Criado-Marrero, M. & Porter, J. T. Contextual fear conditioning depresses infralimbic excitability. *Neurobiol. Learn. Mem.* **130**, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.015> (2016).
- Troyner, F., Bicca, M. A. & Bertoglio, L. J. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. *Hippocampus* **28**, 602–616. <https://doi.org/10.1002/hipo.22964> (2018).
- Siddiqui, S. A. *et al.* Enhanced histone acetylation in the infralimbic prefrontal cortex is associated with fear extinction. *Cell. Mol. Neurobiol.* **37**, 1287–1301. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0464-6> (2017).
- Siddiqui, S. A. *et al.* Regulation of HDAC1 and HDAC2 during consolidation and extinction of fear memory. *Brain Res. Bull.* **150**, 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.05.011> (2019).
- Kugelman, T., Zuloaga, D. G., Weber, S. & Raber, J. Post-training gamma irradiation-enhanced contextual fear memory associated with reduced neuronal activation of the infralimbic cortex. *Behav. Brain Res.* **298**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.050> (2016).
- Jinks, A. L. & McGregor, I. S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res.* **772**, 181–190 (1997).
- Lisboa, S. F., Stecchini, M. F., Corrêa, F. M. A., Guimarães, F. S. & Resstel, L. B. M. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience* **171**, 760–768 (2010).
- Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th edn. (Academic Press, San Diego, 2009).
- Allen, T. A. *et al.* Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *J. Neurosci. Methods* **171**, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.033> (2008).
- Wanisch, K. & Wotjak, C. T. Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol. Learn. Mem.* **90**, 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.02.007> (2008).
- Stern, C. A., Gazarini, L., Vanvossen, A. C., Hames, M. S. & Bertoglio, L. J. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learn. Mem.* **21**, 14–20. <https://doi.org/10.1101/lm.032631.113> (2014).
- da Silva, T. R., Raymundi, A. M., Bertoglio, L. J., Andreatini, R. & Stern, C. A. Role of prelimbic cortex PKC and PKM ζ in fear memory reconsolidation and persistence following reactivation. *Sci. Rep.* **10**, 4076–2356. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60046-x> (2020).
- Landeira-Fernandez, J., DeCola, J. P., Kim, J. J. & Fanselow, M. S. Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. *Behav. Neurosci.* **120**, 873–879 (2006).

32. Blanchard, R. J. & Blanchard, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **68**, 129–135 (1969).
33. Stern, C. A. J., Do Monte, F. H. M., Gazarini, L., Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience* **170**, 214–222 (2010).
34. Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 1193–1205 (2005).
35. Ellis, P. D. *The Essential Guide to Effect Sizes: Statistical Power, Meta-analysis, and the Interpretation of Research Results* (Cambridge University Press, Cambridge, 2010).
36. Spalding, K. N. The role of the medial prefrontal cortex in the generalization of conditioned fear. *Neuropsychology* **32**, 1–17. <https://doi.org/10.1037/neu0000384> (2018).
37. Sangha, S., Robinson, P. D., Greba, Q., Davies, D. A. & Howland, J. G. Alterations in reward, fear and safety cue discrimination after inactivation of the rat prelimbic and infralimbic cortices. *Neuropsychopharmacology* **39**, 2405–2413. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.89> (2014).
38. Vieira, P. A. *et al.* Prefrontal consolidation supports the attainment of fear memory accuracy. *Learn. Mem.* **21**, 394–405. <https://doi.org/10.1101/lm.036087.114> (2014).
39. Giustino, T. F. & Maren, S. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. *Front. Behav. Neurosci.* **9**, 298. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298> (2015).
40. Scarlata, M. J. *et al.* Chemogenetic stimulation of the infralimbic cortex reverses alcohol-induced fear memory overgeneralization. *Sci. Rep.* **9**, 6730. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43159-w> (2019).
41. Vanvossen, A. C. *et al.* Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiol. Learn. Mem.* **137**, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.002> (2017).
42. Hong, J. & Kim, D. Freezing response-independent facilitation of fear extinction memory in the prefrontal cortex. *Sci. Rep.* **7**, 5363. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04335-y> (2017).
43. Soler-Cedeño, O. *et al.* Plasticity of NMDA receptors at ventral hippocampal synapses in the infralimbic cortex regulates cued fear. *eNeuro* **6**, 9–11. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0354-18.2019> (2019).
44. Park, K. & Chung, C. Differential alterations in cortico-amygdala circuitry in mice with impaired fear extinction. *Mol. Neurobiol.* **57**, 710–721. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01741-3> (2020).
45. Bloodgood, D. W., Sugam, J. A., Holmes, A. & Kash, T. L. Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. *Transl. Psychiatry* **8**, 60. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0106-x> (2018).
46. Vollmer, L. L. *et al.* Neuropeptide Y impairs retrieval of extinguished fear and modulates excitability of neurons in the infralimbic prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **36**, 1306–1315. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4955-13.2016> (2016).
47. Mukherjee, A. & Caroni, P. Infralimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity. *Nat. Commun.* **9**, 2727. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05318-x> (2018).
48. Milad, M. R. & Quirk, G. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* **420**, 70–74 (2002).
49. Do-Monte, F. H., Manzano-Nieves, G., Quiñones-Laracuate, K., Ramos-Medina, L. & Quirk, G. J. Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *J. Neurosci.* **35**, 3607–3615. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3137-14.2015> (2015).
50. Laurent, V. & Westbrook, R. F. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learn. Mem.* **16**, 520–529. <https://doi.org/10.1101/lm.1474609> (2009).
51. Santini, E., Ge, H., Ren, K., Peña de Ortiz, S. & Quirk, G. J. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **24**, 5704–5710 (2004).
52. Awad, W., Ferreira, G. & Maroun, M. Dissociation of the role of infralimbic cortex in learning and consolidation of extinction of recent and remote aversion memory. *Neuropsychopharmacology* **40**, 2566–2575. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.103> (2015).
53. Khalaf, O. & Gräff, J. Reactivation of recall-induced neurons in the infralimbic cortex and the basolateral amygdala after remote fear memory attenuation. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 70. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00070> (2019).
54. Gutzeit, V. A. *et al.* Optogenetic reactivation of prefrontal social neural ensembles mimics social buffering of fear. *Neuropsychopharmacology* **45**, 1068–1077 (2020).
55. Moscarello, J. M. & LeDoux, J. E. Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. *J. Neurosci.* **33**, 3815–3823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2596-12.2013> (2013).
56. Rizzo, V. *et al.* Encoding of contextual fear memory requires de novo proteins in the prelimbic cortex. *Biol. Psychiatry. Cogn. Neurosci. Neuroimaging* **2**, 158–169 (2017).
57. Canal, C. E., Chang, Q. & Gold, P. E. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12500–12505 (2007).
58. Sharma, A. V., Nargang, F. E. & Dickson, C. T. Neurosilence: Profound suppression of neural activity following intracerebral administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin. *J. Neurosci.* **32**, 2377–2387. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3543-11.2012> (2012).

Acknowledgements

This study was supported by Brazilian grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 306777/2016-9; 307022/2019-6), which had no further role in the design of the study, collection, and analysis of data and decision to submit the paper for publication.

Author contributions

H.B.: conducted the experiments; H.B. and L.J.B.: data analysis and interpretation; H.B. and L.J.B.: elaborated the work design, discussed the results, and wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.J.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020