

PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

CLARISSA PENHA FARIAS

**EFEITO DO SUPORTE SOCIAL NA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO
AO CONTEXTO: APRENDIZAGEM SEM EVOCÇÃO, E DEPENDENCIA DE SÍNTESE DE
PROTEÍNAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MAS NÃO NO HIPOCAMPO**

Porto Alegre

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

CLARISSA PENHA FARIAS

**EFEITO DO SUPORTE SOCIAL NA EXTINÇÃO DE MEDO CONDICIONADO
AO CONTEXTO: APRENDIZAGEM SEM EVOCAÇÃO, E DEPENDENCIA DE
SÍNTESE DE PROTEÍNAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MAS NÃO NO
HIPOCAMPO**

Dissertação apresentada a Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Gerontologia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw

Co-orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo

Linha de Pesquisa: Aspectos Biológicos no Envelhecimento

Porto Alegre

2019

Ficha Catalográfica

F224e Farias, Clarissa Penha

Efeito do suporte social na extinção de medo condicionado ao contexto Aprendizagem sem evocação, e dependência de síntese de proteínas no córtex pré-frontal mas não no hipocampo / Clarissa Penha Farias . – 2018.

59 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ivan Izquierdo.

1. Memória. 2. Medo condicionado ao contexto. 3. Extinção. 4. Suporte Social.
I. Myskiw, Jociane de Carvalho. II. Izquierdo, Ivan. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

CLARISSA PENHA FARIAS

**EFEITO DO SUPORTE SOCIAL NA EXTINÇÃO DE MEDO CONDICIONADO
AO CONTEXTO: APRENDIZAGEM SEM EVOCAÇÃO, E DEPENDENCIA DE
SÍNTESE DE PROTEÍNAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MAS NÃO NO
HIPOCAMPO**

Dissertação apresentada a Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Gerontologia Biomédica.

Aprovado em _____ de _____ de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Irani Iracema De Lima Argimon – IGG (PUCRS)

Profa. Dra. Renta Kochhann – (PUCRS)

Profa. Dra. Carla H. A. Schwanke – (PUCRS/ SUPLENTE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meu pais José e Rosa que me proporcionaram muitos anos da minha formação, mas principalmente por me ensinarem que sonhar vale a pena, correr atrás dos sonhos mais ainda. Tornar sonhos em metas faz com que o percurso se torne mais pleno e prazeroso.

Dedico em especial este trabalho a minha Orientadora Jociane de Carvalho Myskiw, que me oportunizou reiniciar minha vida acadêmica com grupos de estudos, e por fim fazer parte do Centro de Memória, local que me enche de orgulho fazer parte. A Professora Cristiane Furini que sempre esteve atenta e disponível para ajudar, e ao meu co-orientador Ivan Izquierdo, nosso coordenador que além de ser uma referência na compreensão dos mecanismos da memória é um exemplo de generosidade e humildade.

Aos colegas do Centro de Memória, em especial a Eduarda Goldfrid Nachtgall, que sempre foi solidária com todos, sempre esteve disponível a ajudar. Da mesma forma sou grata pela parceria da técnica do vivário, Carla, que além de exercer seu trabalho plenamente sempre foi uma ótima companhia.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) por me proporcionar a infraestrutura necessária para o andamento de minha formação. Ao Instituto de Geriatria e Gerontologia (IGG) pela acolhida e confiança. Sem dúvida um lugar onde eu pude aprofundar, compreender, atualizar e aprender mais visando a saúde do próximo, em um ambiente agradável, com colegas, professores e administração extremamente competentes. Obrigada pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa e também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Meu carinho especial as minhas conexões afetivas, meu par Anderson, irmão e amigos que dão suavidade até para os momentos mais pesados.

Com carinho... obrigada!

“May your choices reflect your hopes not your fears”

Nelson Mandela

RESUMO

As memórias de medo quando disfuncionais podem levar a patologias associadas a ansiedade, como a depressão, o Transtorno de Pânico e Transtorno de estresse pós-traumático. Sendo assim, torna-se fundamental a compreensão de mecanismos biológicos e comportamentais que possam contribuir no tratamento destes transtornos. O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o impacto do suporte social na extinção de uma memória de medo e verificar a participação de diferentes áreas cerebrais nesta memória. Para isso, foram utilizados Ratos Wistar entre 300 - 330g com cânulas implantadas nas regiões CA1 do hipocampo ou CPFm, submetidos ao teino de MCC sozinhos. Vinte e quatro horas após, foi realizado o treino de extinção, com duração de 10 minutos, sozinhos (S) ou na presença de um coespecífico familiar (SS) e imediatamente foram infundidas intra-CA1 ou intra-CPFm solução salina 0,9% (Veículo), anisomicina (Ani, 80 µg por lado; inibidor de síntese de proteínas), rapamicina (Rapa; 5 pg por lado; inibidor da proteína mTOR) ou 5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; 8 ng por lado; inibidor de expressão gênica). Após vinte e quatro horas os animais S ou SS foram submetidos ao teste de extinção, todos sozinhos, por 3 minutos. Como resultados foi encontrado que a extinção do medo condicionado ao contexto (MCC) na presença de um familiar que não passou pela tarefa aversiva (suporte social), pode ocorrer independentemente da memória original ser evocada durante o treinamento de extinção. O suporte social gera uma forma de aprendizagem diferente da extinção adquirida sem suporte social em termos das estruturas cerebrais envolvidas. Foi observado que a extinção da memória de medo com suporte social depende de síntese de proteínas na região do CPFm, mas não da região ca1 do Hipocampo. Esses achados podem levar a uma melhor compreensão dos mecanismos cerebrais envolvidos na influência do suporte social nas memórias e em terapias para distúrbios relacionados a memórias de medo disfuncionais.

Palavras-Chave: Memória, Medo condicionado ao contexto, Extinção, Suporte Social, hipocampo, córtex pré-frontal.

ABSTRACT

Memories of fear when dysfunctional can lead to pathologies associated with anxiety, such as depression, panic disorder and posttraumatic stress disorder. Thus, it becomes essential to understand biological and behavioral mechanisms that may contribute to the treatment of these disorders. The general objective of this research was to evaluate the impact of social support on the extinction of a fear memory and to verify the participation of different brain areas in this memory. For this, Wistar rats were used between 300 - 330g with cannulas implanted in the CA1 regions of the hippocampus or PFCm, submitted to MCC theophyte alone. Twenty-four hours later, the extinction training was carried out with a duration of 10 minutes, either alone (S) or in the presence of a familial coexistent (SS) and immediately infused intra- CA1 or intra-PFCin saline solution 0.9% (Vehicle), anisomycin (Ani, 80 µg per side, protein synthesis inhibitor), rapamycin (Rapa, 5 µg per side, mTOR protein inhibitor) or 5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosylbenzimidazole (DRB , 8 ng per side, inhibitor of gene expression). After twenty-four hours the animals S or SS were submitted to the extinction test, all alone, for 3 minutes. As results, it was found that the MCC in the presence of a family member who did not undergo the aversive task (social support) can occur independently of the original memory being evoked during the extinction training. Social support generates a different form of learning from extinction acquired without social support in terms of the brain structures involved. It has been observed that the extinction of fear memory with social support depends on protein synthesis in the PFCm region, but not in the ca1 region of the Hippocampus. These findings may lead to a better understanding of the brain mechanisms involved in the influence of social support in memories and in therapies for disorders related to dysfunctional fear memories.

Key words: Memory, Context conditioned fear, Extinction, Social support, hippocampus, prefrontal cortex.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1 – Protocolo experimental da extinção com suporte social.	27
Quadro 2 - Desenho experimental da extinção com suporte social.....	27
Figura.1: Desenho ilustrativo do cérebro de rato mostrando sombreada a região CPFm (A) e região CA1 do hipocampo dorsal (B) onde posteriormente é realizada a implantação das cânulas guias.	28

SIGLAS E ABREVIATURAS

Ani: Anisomicina, inibidor de síntese de proteínas extra ribossomais

CA1: sub-região hipocampal

CeMBE: Centro de Modelos Biológicos Experimentais

CEUA: Comissão de Ética para o Uso de Animais

CPFm: Córtex Pré-Frontal medial

CR: resposta condicionada. Do inglês conditioned response

CS: estímulo condicionado. Do inglês conditioned stimulus

DRB: inibidor de expressão gênica

MCC: medo condicionado ao contexto

Tr Ext: sessão de treino de extinção

IGG: Instituto de Geriatria e Gerontologia

I.P.: via intraperitoneal

P: pares

Rapa: rapamicina, inibidor da proteína mTOR

S: sozinho

Veh: veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 ENVELHECIMENTO	14
2.2 MEMÓRIA E MEMÓRIA DE EXTINÇÃO	15
2.2.1 MEMÓRIA DE MEDO E MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	17
2.3 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO NA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO	18
2.4 SUPORTE SOCIAL	19
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 METODOS	24
4.1 ANIMAIS	24
4.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	24
4.3 MANIPULAÇÕES DOS ANIMAIS	24
4.4 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS	25
4.5 PROTOCOLO DO PARADIGMA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	25
4.5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE EXTINÇÃO COM SUPORTE SOCIAL	26
FONTE: CLARISSA PENHA FARIAS, 2017	27
4.6 DESENHO EXPERIMENTAL	27
4.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REGIÃO ESTUDADA	28
4.9 ASPECTOS ÉTICOS	29
5 RESULTADOS	30
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
APENDICE A - ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO PNAS	57
ANEXO A – APROVAÇÃO DO SISTEMA DE PESQUISA DA PUCRS	58
ANEXO B – APROVAÇÃO CEUA	59

1 INTRODUÇÃO

Ainda que não exista um consenso sobre a idade na qual um indivíduo pode ser considerado idoso, as idades entre 60 e 65 anos servem frequentemente como marcadores cronológicos para esta definição. Entretanto, é importante observar que esse marcador cronológico e o fato de tornar-se velho não são necessariamente sinônimos (WHO, 2017). A idade em si é apenas um dos elementos balizadores da passagem do tempo (SCHNEIDER; IRIGARAY, 2008), mas acredita-se que em 2020 esta população possa alcançar a marca de 32 milhões de habitantes (BEZERRA; ALMEIDA; NÓBREGA-TERRIEN, 2012).

O aumento deste contingente populacional pode ser creditado às melhorias no sistema de saúde pública, nutrição, educação e condições de vida e aos avanços na medicina que têm auxiliado na prevenção de morte prematura, mortalidade infantil e infecções (BURLÁ et al., 2013; OEPPEN; VAUPEL, 2002). Com a população envelhecida o perfil de morbimortalidades vem se modificando, além de aumentar as necessidades em cuidados crônicos (GOTTLIEB et al., 2011). Além das necessidades específicas da saúde, se faz presente a necessidade de compreender este processo na sociedade brasileira, tendo em vista as alterações significativas num contexto social que o envelhecimento acarreta (FELIX; CATÃO, 2013; OPRESKO; SHAY, 2017).

O envelhecimento pode ser definido biologicamente como uma diminuição das funções das células, dos tecidos e dos órgãos, que levam à perda da homeostase, aumentando a predisposição para doenças e, por fim, conduzindo a morte (LEE; NOH, 2016). Este declínio é muitas vezes considerado como o principal fator de risco para algumas doenças, tais como o câncer, a diabetes, as cardiovasculares e as neurodegenerativas (LÓPEZ- OTÍN et al., 2013). Diante destas considerações que apontam um declínio na funcionalidade do organismo, no cérebro não é diferente. O envelhecimento cerebral está associado a declínios da função cognitiva, incluindo a memória. Estes declínios estão associados, não apenas a uma diminuição do número dos neurônios no cérebro, mas também com alterações sinápticas no

hipocampo e no córtex pré-frontal, além de atrofia cerebral (ANDREWS-HANNA et al., 2007; MORRISON; BAXTER, 2012).

Alguns estudos descrevem também a importância do estilo de vida na cognição do idoso, sugerindo que exercícios físicos e cognitivos podem ter efeito benéfico na cognição e memória (KÜSTER et al., 2016). Além disso, também existem achados que indicam que o engajamento social pode desempenhar um papel importante na saúde mental no final da vida (GLASS et al., 2006).

Neste sentido, pouco se sabe sobre os mecanismos neurais associados ao suporte social. No entanto, alguns achados sugerem que o suporte social facilita a extinção da memória de medo, por exemplo.

A extinção da memória é considerada como um novo aprendizado que inibe a evocação da memória original, ou seja, não é um esquecimento, mas sim uma nova memória que se sobrepõe a uma memória já existente (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015; PONNUSAMY et al., 2016). Assim como na consolidação da memória original, a extinção também pode ser modulada por diferentes mecanismos moleculares, por fármacos que agem sobre os receptores para os diferentes neurotransmissores envolvidos na aprendizagem e memória (FIORENZA et al., 2012), bem como a exposição a um ambiente novo (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014) e a interação social entre seres da mesma espécie (co-específicos) (GUZMÁN et al., 2009, 2014).

Tendo em vista que o suporte social facilita a extinção da memória de medo, é de fundamental importância a compreensão de seus mecanismos sobre suas complexas funções, para que no futuro possa ser aplicada a distúrbios associados ao medo e ao suporte social.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENVELHECIMENTO

As pesquisas relacionadas com a temática memória e envelhecimento, têm sido cada vez mais recorrente e relevante quando se trata da saúde dos idosos, que atualmente vivem mais do que há 100 anos atrás e representam 7,3% da população brasileira, segundo o Censo de 2010 (MORIGUCHI et al., 2014). O envelhecimento humano vem se caracterizando como um fenômeno global influenciando tendências demográficas durante os séculos 20 e 21. Nos países desenvolvidos, 75% da população morrem após os 75 anos. No Japão, essa expectativa de vida se diferencia ainda mais, ultrapassando os 85 anos. No Rio Grande do Sul, apresenta ainda, um quadro que revela que as mulheres vivem aproximadamente 8 anos mais que os homens (GOTTLIEB et al., 2011; HANNIGAN et al., 2015; LUNENFELD; STRATTON, 2013).

O aumento da expectativa de vida é uma grande conquista da sociedade, entretanto, o envelhecimento apresenta também grandes desafios, pois é um processo complexo, dinâmico e universal, que acarreta declínio das funções biológicas, fisiológicas e maior vulnerabilidade a doenças (BENNETT et al., 2008; FONTANA; PARTRIDGE; LONGO, 2010). Sendo assim, em conjunto com a transição demográfica, ocorre também a epidemiológica, que se traduz em um aumento na incidência de doenças crônicas, não transmissíveis, degenerativas e incapacitantes (SCHRAMM et al., 2004). Atualmente, as doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, câncer, diabetes, doenças respiratórias e as doenças de Alzheimer e Parkinson são as principais causas de morbidade e mortalidade (SEALS; JUSTICE; LAROCCA, 2016; WHO, 2017).

Sabe-se que durante o processo de envelhecimento humano o organismo passa por uma série de modificações, em diferentes aspectos, tais como, psicológico, social e biológico. Considerando os aspectos psicossociais alguns estudos vêm relacionando o número de pessoas que compõem a rede social do idoso com as funções físicas e cognitivas. Assim, poucas relações

sociais estão associadas ao desenvolvimento de incapacidades e diminuição de funções físicas (LI; CHEN, 2017). Além disso a conexão social de alta qualidade com amigos e familiares está associada a uma menor probabilidade de depressão (WERNER-SEIDLER et al., 2017).

Dentre as modificações biológicas, destaca-se o declínio das funções cognitivas, como por exemplo a aprendizagem, a memória, a atenção, o raciocínio e a solução de problemas (ANTUNES et al., 2006). Um dos fatores que podem influenciar esse declínio cognitivo no idoso, é a depressão, muito recorrente em idosos e também está associada a um aumento do risco de demências (DINIZ et al., 2013). Existem diversos estudos que buscam identificar os mecanismos neurais que levam ao declínio cognitivo em idosos, no entanto, ainda não está claro quais são esses mecanismos, mas provavelmente, as modificações nas respostas celulares e subcelulares estão envolvidas, bem como, alterações morfológicas e de resposta funcional local e regional das redes neurais (BÄCKMAN et al., 2006).

2.2 Memória e Memória de Extinção

As memórias que acompanham cada indivíduo são formadoras de sua identidade, guiando comportamentos, conectando o que já foi feito e suas consequências à novas experiências e seus novos desfechos, ou não. Uma pessoa sem a capacidade de armazenar ou acessar suas memórias tende a isolar-se do que é (STERN; ALBERINI, 2013). A memória pode ser considerada como um processo individual, ou seja, mesmo vivenciado experiências idênticas, cada indivíduo irá armazenar e recordar essas informações à sua maneira (IZQUIERDO, IVAN, 2008).

Após uma informação ser adquiridas, ou seja, aprendida, ela pode permanecer armazenada por um curto período de tempo ou por um longo período de tempo, sendo assim, classificadas em memórias de curta ou de longa duração. A memória de curta duração permanece armazenada por alguns minutos ou horas, podendo perdurar de 3 a 6 horas no máximo, enquanto a memória de longa duração permanece armazenada por muitas horas, dias, meses ou anos. Porém, quando perdura pela vida toda são

chamadas de memórias remotas. É importante destacar que a memória de curta duração não depende de síntese proteica, mas sim de sucessivas ativações de diferentes vias de sinalização, envolvendo várias proteínas quinases. Já a memória de longa duração, necessita de síntese de proteínas e de transcrição gênica para ser armazenada (COWAN, 1998; IZQUIERDO, IVAN, 2008).

O processo de armazenamento das informações recém-adquiridas é chamado de consolidação (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO et al., 2008), o processo pelo qual um novo traço de memória é gradualmente formado (BADDELEY et al., 2011). Enquanto estão sendo consolidadas, as memórias encontram-se lábeis e são sensíveis a interferências, tanto positivas (como a incorporação de novas informações) quanto negativas (como a ação de inibidores de síntese proteica ou o acontecimento de eventos traumáticos) (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

Quando evocadas, as memórias já consolidadas tornam-se novamente lábeis e susceptíveis a novas interrupções (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; SARA, 2000) este processo é também conhecido como evocação, reativação, recordação, lembrança ou recuperação (IZQUIERDO, IVAN, 2008). A consolidação de memórias de longa duração conta com modificações sinápticas, morfológicas e funcionais, que parecem formar a base da evocação (SZAPIRO et al., 2002), já a formação de novas memórias está baseada na evocação de experiências ocorridas no passado, visto que é a memória do passado que organiza e dá sentido às experiências perceptuais do presente (IZQUIERDO, IVAN, 2008; SARA, 2000). A evocação de uma memória previamente consolidada pode desencadear dois processos distintos e dependentes de síntese de proteínas: a consolidação, que pode fornecer uma janela de oportunidades para a manutenção, o fortalecimento e atualização (integração de novas informações) da memória evocado (NADER; SCHAFFÉ; DOUX, 2000; SARA, 2000); ou a extinção, que consiste de um novo aprendizado (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

A extinção foi descrita por Pavlov há mais de um século, e consiste na inibição da evocação de uma resposta aprendida por repetição de estímulo que a produzem sem a apresentação do reforço. A extinção é um processo ativo de aprendizagem decorrente da reexposição à informação/situação na ausência de reforço, a qual leva à formação de uma nova memória que se sobrepõe à original (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015). Ainda, de forma mais simples, pode-se dizer que a extinção é a inibição da recuperação de uma memória adquirida anteriormente (FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014)

Em um texto escrito por Izquierdo, “A Arte de Esquecer”, o autor comenta a importância de esquecer, ou ao menos de algumas memórias serem mantidas longe de sua evocação (IZQUIERDO, IVAN, 2008). Na clínica, a extinção é conhecida como terapia de exposição, sendo utilizada no tratamento de distúrbios desencadeados pela evocação recorrente de memórias de medo (FIORENZA et al., 2012; IZQUIERDO, IVAN, 2008).

O processo de extinção depende de ativação de receptores glutamatérgicos NMDA, proteína quinase dependente de AMPc, proteínas quinases reguladas extracelularmente, proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina, expressão gênica e síntese proteica em uma ou mais das seguintes estruturas encefálicas: hipocampo, amígdala basolateral, córtex entorrinal e córtex pré-frontal ventromedial (FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; IZQUIERDO, IVAN, 2008).

2.2.1 Memória de medo e medo condicionado ao contexto

A memória de medo é a forma de memória mais bem estudada, muito provavelmente devido a importância do medo na sobrevivência. No entanto, existem diferentes formas de lidar com o medo, em que cada indivíduo lida de uma determinada maneira diante de uma mesma situação (LONSDORF; MERZ, 2017).

A ausência do medo em seres humanos é considerada perigosa e potencialmente letal (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). No entanto, é sabido que existem memórias de experiências de medo que podem levar a

condições patogênicas, como ansiedades e fobias, podendo interferir em atividades das mais corriqueiras de um indivíduo como sair de casa, por exemplo. Nos últimos anos, houve grandes avanços na compreensão dos fundamentos neurobiológicos da formação de memória de medo e extinção. Foi mostrado que a extinção não é mediada por uma região específica do cérebro. Em vez disso, ela depende da plasticidade de uma rede neural, envolvendo amígdala, o córtex pré-frontal e o hipocampo (ORSINI; MAREN, 2012).

Acredita-se que indivíduos que possuam uma rede de apoio, podem enfrentar melhor situações de medo, se comparado com indivíduos sozinhos. Na pesquisa básica, alguns estudos (KIYOKAWA et al., 2014; LIPINA; RODER, 2013; LIU; YUAN, 2016a) vêm sendo realizados, utilizando o paradigma do suporte social ou “social buffer”, a fim de compreender os mecanismos neurais envolvidos nessa memória.

Em modelos animais, o condicionamento do medo pavloviano tem sido um modelo influente para o estudo dos transtornos de ansiedade e medo (CHANG et al., 2009; MILAD et al., 2006). O modelo clássico de medo condicionado ao contexto, consiste na associação que o animal faz entre um estímulo condicionado (contexto) e um estímulo incondicionado (estímulo elétrico nas patas), desta forma gerando uma resposta de medo condicionado (imobilidade). A resposta de medo pode ser extinta diante da reapresentação do estímulo condicionado (contexto) na ausência de um estímulo incondicionado (estímulo elétrico) (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2015; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; MILAD et al., 2006).

2.3 Córtex Pré-Frontal e Hipocampo na memória de extinção

Nos últimos anos, houveram grandes avanços na compreensão dos fundamentos neurobiológicos da formação de memória de medo e extinção. Foi mostrado que a extinção não é mediada por uma região específica do cérebro. Em vez disso, ela depende da plasticidade de uma rede neural, envolvendo amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo (ORSINI; MAREN, 2012). O processo de extinção depende de ativação de diferentes receptores

bem como, glutamatérgicos NMDA, além de proteína quinase dependente de AMPc, proteínas quinases reguladas extracelularmente, proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina, expressão gênica e síntese proteica em uma ou mais das seguintes estruturas encefálicas: hipocampo, amígdala basolateral, córtex entorrinal e córtex pré-frontal ventromedial (FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; IZQUIERDO, IVAN, 2008).

Evidências demonstram a importância da participação do córtex pré-frontal medial (CPFm) na tarefa de medo condicionado ao contexto, e que esta região é especialmente sensível a experimentos envolvendo tarefas sociais e emocionais (BRILL-MAOZ; MAROUN, 2016; MORGAN; ROMANSKI; LEDOUX, 1993), notavelmente relacionado a distúrbios como Transtorno de estresse pós-traumático, depressão, estresse crônico e dor (ROY; SHOHAMY; WAGER, 2012). Além disso, lesões pré-frontais causam déficits no comportamento social, como a perda da afinidade do grupo social, bem como demonstraram um papel crítico para esta área do cérebro em vários aspectos da cognição, emoção e comportamento (MYERS; SWETT; MILLER, 1973; ROY; SHOHAMY; WAGER, 2012). Já o hipocampo apresenta forte relação com a aprendizagem contextual nos estudos de condicionamento do medo pavloviano em ratos, além de estar envolvido na modulação da expressão de ansiedade e condicionamento de medo (MAREN; HOLT, 2004; ZHANG et al., 2014). Lesões nesta região geram prejuízo de aprendizagem contextual (KLEIN et al., 2015; MOSER et al., 1995). No entanto, existe uma lacuna na literatura diante da compreensão das estruturas e mecanismos envolvidos na aprendizagem da memória de extinção com suporte social em ratos.

2.4 Suporte social

Compreendendo que o comportamento é a tentativa do organismo de se adaptar as mudanças de condições internas e externas, é importante salientar que o comportamento social é uma construção complexa (MOY et al., 2004) que envolve inúmeros fatores e que em diferentes espécies estes ajustes podem variar (SCOTT, J. P., FREDERICSON, E., 1951). Neste sentido, estudos que utilizam modelos animais sociais como os ratos, camundongos e zebrafish, vêm tentando avaliar o impacto de um coespecífico nos mecanismos neurais e comportamentais envolvidos na memória social. Na ciência, tal fenômeno é

descrito como “social buffering” ou Suporte social (como será mencionado no decorrer deste trabalho). É reconhecido como um efeito de modalidade multi-sensorial, consistindo por contato físico direto, observação visual e/ou olfação (LIU; YUAN, 2016).

As percepções de sinais comportamentais, entre animais de mesma espécie, podem influenciar nas respostas ao estresse. Em tarefas relacionadas à extinção da memória de medo sugerem que a interação social pode ser um regulador positivo na inibição da resposta comportamental de medo e assim poderia ser uma alternativa fácil, acessível para tratamento de distúrbios relacionados ao medo (BRILL-MAOZ; MAROUN, 2016).

Existem evidências de que a intensidade da resposta de redução de comportamento de medo é mais eficiente quando a participação de membros de mesma espécie e principalmente se este coespecífico não passou pela situação de estresse (KIYOKAWA et al., 2014).

Um estudo realizado com ratos machos, para avaliar a importância do suporte social, baseado no odor de um coespecífico, encontrou que os mecanismos associados a FOS (um fator de transcrição gênica) na amígdala, foram os mesmos quando comparado o suporte social realizado por um coespecífico doador de odor desconhecido e um doador de odor familiar, no entanto ficou claro que o efeito do suporte social de um odor doador familiar é mais eficaz na resposta de medo condicionado ao contexto (KIYOKAWA et al., 2014).

O suporte social já possui algumas evidências sobre seus mecanismos neurais. Em um estudo, realizado recentemente, os autores avaliam a importância de pistas visuais e olfativas, isoladamente ou concomitantemente do suporte social em um modelo experimental em Zebrafish. Neste estudo, o suporte social pelo estímulo visual foi representado por diferentes tamanhos de cardume familiar do peixe testado, e como estímulo olfativo, foi colocado uma quantidade de água do aquário do cardume do qual o peixe testado fazia parte. Como resultado o estímulo visual, em zebrafish, foi mais eficaz que o estímulo

olfativo na promoção da diminuição da resposta de medo. Porém, o estímulo visual e olfativo quando concomitantes são ainda mais eficientes. Além disso, foi mostrado que o suporte social revelou uma co-ativação em regiões homologas do cérebro, mesmo fenômeno que ocorre em mamíferos, sugerindo que o suporte social durante um evento ameaçador parece ser um processo conservado entre as espécies (FAUSTINO; TACÃO-MONTEIRO; OLIVEIRA, 2017).

Notavelmente, o comportamento também pode ser modelado pela aprendizagem observacional (vicária), e assim, um grupo de pesquisadores investigou o suporte social com a participação de 21o específico “com medo” e 21o específico “sem medo”. Nestes achados, relatam que a atenuação do condicionamento do medo feito pelo grupo de animais “sem medo” foi em grande parte, mas não inteiramente, mediada pela aprendizagem indireta. Esses achados identificam um importante processo de suporte social que serve para prevenir uma indução de medo em resposta a eventos estressantes isolados e moderadamente intensos (GUZMÁN et al., 2009). Já, outro grupo encontrou diminuição do comportamento de medo quando os animais coespecíficos são expostos juntos a uma situação de medo (LEE; NOH, 2016).

Já existem evidências da importância da participação do Córtex Pré-Frontal Medial (CPFm) na tarefa de medo condicionado ao contexto, e que esta região é especialmente sensível a experimentos envolvendo tarefas sociais e emocionais (BRILL-MAOZ; MAROUN, 2016), e que lesões pré-frontais causam déficits no comportamento social, como a perda da afinidade do grupo social em macacos (MYERS; SWETT; MILLER, 1973).

Diante do exposto, os estudos ainda deixam lacunas a serem investigadas para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na extinção do medo, num modelo experimental de extinção com suporte social. Dentre os sistemas endógenos capazes de modular as memórias está o sistema serotoninérgico, que nos últimos dez anos, descobriu-se que está envolvido com diversas funções de integração do sistema nervoso central, tais como o humor, o estado de ansiedade, estresse, agressividade, alimentação, cognição e comportamento sexual. Segundo Brend Olivier “É espantoso que

um neurotransmissor seja capaz de desempenhar esse papel”. A descoberta da serotonina e da sua função na década de 1960, e na sequência o desenvolvimento dos SSRIs (Serotonin Selective Reuptake Inhibitors), foram grandes achados para o campo dos tratamentos de doenças psiquiátricas (MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008; OLIVIER, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a participação do córtex pré-frontal e do hipocampo na extinção da memória de medo condicionado com suporte social.

3.2 Objetivos específicos

Verificar a participação do córtex pré-frontal medial na extinção da memória de medo condicionado ao contexto com suporte social.

Verificar a participação da região CA1 do Hipocampo na extinção da memória de medo condicionado ao contexto com suporte social.

4 METODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar* de aproximadamente três meses de idade, pesando em média 300 gramas, provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS, e foram alojados no biotério do Centro de Memória, localizado no prédio 64 desta instituição e mantidos em grupos de quatro por caixa moradia; com água e comida a vontade, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luz a partir das 07:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas) e, a uma temperatura ambiente constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$. As caixas moradia foram trocadas e higienizadas 3 vezes por semana pela equipe altamente treinada e capacitada do CeMBE. Todos os procedimentos previstos no projeto foram realizados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCRS.

4.2 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas a 1 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (A -4.2, $L \pm 3.0$, V -1.8 mm) ou do Córtex Pré-frontal (A -2.9, $L \pm 1.0$, V -4.1 mm), segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina, juntamente com Xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico, ambos administrados intraperitonealmente (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Durante o período pós-operatório, 24 horas e 48 horas após a cirurgia, os animais receberam Meloxicam 0,2%, administrado via subcutânea, na dose de 2 mg/Kg.

4.3 Manipulações dos animais

Sete dias após a cirurgia os animais foram submetidos a três sessões de manipulação, em dias sucessivos. Durante cada sessão, os mesmos foram levados da sala de alojamento até a sala onde os experimentos

comportamentais foram realizados, retirados da caixa moradia e manuseados durante 5 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

4.4 Intervenções farmacológicas

Os animais receberam infusões intra-CPFm e intra-CA1 de solução salina 0,9% (Veículo), anisomicina (Ani, 80 µg por lado; inibidor de síntese de proteínas) ou rapamicina (Rapa; 5 pg por lado; inibidor da proteína mTOR; do inglês *mammalian target of rapamycin*) e receberão 5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; 8 ng por lado; inibidor de expressão gênica) imediatamente após a sessão de treino de extinção.

Além disso, receberão agonistas e antagonistas dos receptores 5-HT_{1A} no CPFm e na região CA1 do hipocampo dorsal. O agonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT (32 nmol; BIAGIONI et al., 2016) e, o antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635 (0,74 nmol; BIAGIONI et al., 2016). As drogas foram adquiridas da empresa Sigma U.S.A. As mesmas são dissolvidas de acordo com as especificações do fabricante e mantidas em alíquotas a uma temperatura de - 20°C.

Para as infusões farmacológicas na região alvo foi utilizado uma microseringa Hamilton acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Assim, foram infundidos bilateralmente os volumes de 1 µl na região CA1 do hipocampo dorsal e no córtex pré-frontal por hemisfério cerebral de veículo no qual a droga foi dissolvida (anisomicina ou rapamicina). Ao término, as agulhas de infusão foram mantidas no interior das cânulas-guia por pelo menos mais 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido.

4.5 Protocolo do paradigma de medo condicionado ao contexto

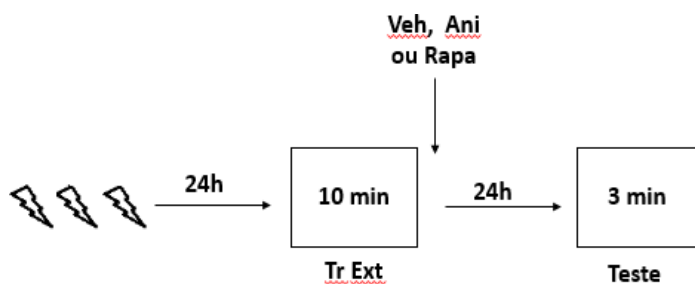
O aparato utilizado para estudar o Medo condicionado ao contexto foi uma caixa de condicionamento (35 x 35 x 35cm) formada de acrílico, cujo assoalho é constituído por barras metálicas que conduzem corrente elétrica, e a parte frontal em acrílico transparente, no alto da parede de fundo de acrílico

fica acoplado uma câmera Gopro HERO 3, para o armazenamento dos vídeos. Este aparato fica dentro de uma caixa de isolamento acústico.

4.5.1 Protocolo Experimental De Extinção com Suporte Social

No dia 1 (sessão de treino de Medo Condicionado ao Contexto - MCC), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento, e após um período de 120 s, foram apresentados 3 estímulos elétricos de 0,5 mA, com intervalo de 30 s entre eles. Trinta segundos após o último choque o animal retorna a sua caixa moradia. Vinte e quatro horas depois (dia 2) os animais foram submetidos a uma sessão de treino da extinção, para isso eles foram colocados individualmente ou em pares na mesma caixa onde aconteceu a sessão de treino de extinção, e após 10 min retornaram a sua caixa moradia. Vinte e quatro horas depois os animais foram submetidos a uma sessão de teste de extinção (dia 3), individualmente na caixa de condicionamento por 180 s. Foi medido o tempo total de *freezing* como resposta condicionada. *Freezing* é o comportamento mais medido em testes de condicionamento de medo. É definido como a ausência de qualquer movimento, exceto o movimento de respiração. Tal comportamento foi medido por observação direta, por um pesquisador capacitado, com o auxílio de um cronômetro. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera digital da marca GoPro, em caso de qualquer eventualidade as imagens são reavaliadas. E assim, durante a sessão de treino e teste da extinção foram quantificados o tempo de *freezing* de cada animal, com o objetivo de avaliar a expressão da memória aversiva em animais. É importante destacar que imediatamente após a sessão de treino de extinção foram infundidas as drogas, bilateralmente no córtex pré-frontal medial ou CA1 do hipocampo.

Quadro 1 – Protocolo experimental da extinção com suporte social:



Fonte: Clarissa Penha Farias, 2017

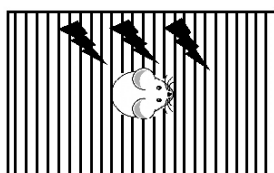
4.6 Desenho experimental

Os grupos experimentais estão apresentados a baixo:

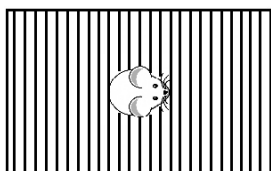
GRUPO 1 - submetidos a sessão de tr, ext e teste individualmente

GRUPO 2 - submetidos a sessão de tr individualmente, ext pares e teste individualmente

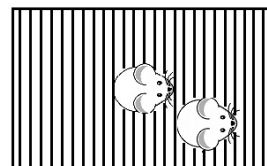
Quadro 2: Desenho experimental da extinção com suporte social



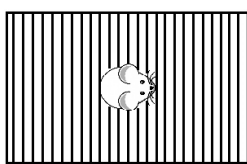
Tr MCC (Dia 1) - Grupo 1 e 2



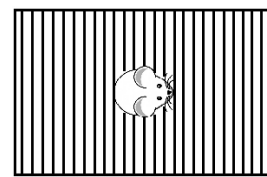
Tr Ext (Dia 2) - Grupo 1



Tr Ext (Dia 2) - Grupo 2



Teste (Dia 3) - Grupo 1



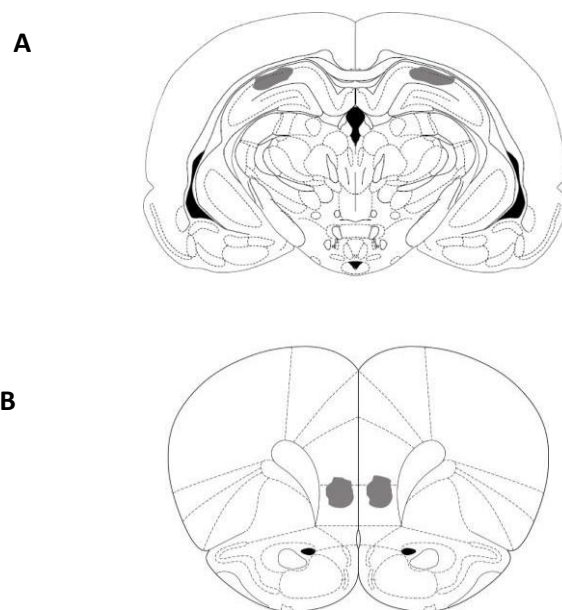
Teste (Dia 3) - Grupo 2

fonte: Clarissa Penha Farias, 2017.

4.7 Avaliação histológica da região estudada

Ao término dos experimentos comportamentais, os animais previamente operados, foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas guias nas regiões cerebrais alvo, visando assim garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta das drogas foram incluídos na análise estatística final. Para este procedimento histológico, os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas guia; quinze minutos depois serão eutanasiados (Tiopental sódico 100 mg/Kg i.p.) e então decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, a partir disso procederá a análise histológica, considerando somente os animais com a infusão de azul de metileno dentro de 2 mm² dos locais alvos.

Figura.1.: Desenho ilustrativo do cérebro de rato mostrando sombreada a região CPFm (A) e região CA1 do hipocampo dorsal (B) onde posteriormente é realizada a implantação das cânulas guias.



4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Graph-Pad Prisma 5.1. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para todos os dados os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.9 Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados com o máximo de cuidado para evitar o desconforto e o sofrimento dos animais. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Estado do Rio Grande do Sul e, somente após a sua aprovação foi dado início aos procedimentos experimentais, os quais estão de acordo com as normas regidas por esta universidade. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCRS sob registro: 7480 (ANEXO A).

5 RESULTADOS

Classification: Biological Sciences

EXTINCTION OF CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING WITH SOCIAL SUPPORT: LEARNING WITHOUT RETRIEVAL AND DEPENDENCE ON PREFRONTAL CORTEX BUT NOT HIPPOCAMPAL PROTEIN SYNTHESIS

Short title: Extinction memory with social support

Clarissa Penha Farias^a, Cristiane R. G. Furini^{a,b}, Eduarda Godfried Nachtigall^a, Jonny Anderson Kielbovycz Behling^a, Letícia Bühler^a, Eduardo Silva de Assis Brasil^a, Letícia Bühler^a, Ivan Izquierdo^{a,b}, Jociane de Carvalho Myskiw^{a,b}.

^aMemory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil;

^bNational Institute of Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Brazil.

Author contributions: C.P.F., C.R.G.F., I.I. and J.C.M. designed research; C.P.F., C.R.G.F., E.G.N., J.A.K.B., E.S.A.B. and J.C.M. performed the research; C.P.F., C.R.G.F. and J.C.M. analyzed the data; C.P.F., C.R.G.F., I.I. and J.C.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

To whom correspondence may be addressed:

Jociane de Carvalho Myskiw and Ivan Izquierdo

E-mail: jociane_carvalho@hotmail.com; izquier@terra.com.br

Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – 2nd floor, phone (+55 51) 3320 3336; 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Extinction of contextual fear conditioning (CFC) in the presence of a familiar non-fearful conspecific (social support), like that of other tasks, can occur regardless of whether the original memory is retrieved during the extinction training. Extinction with social support is blocked by the protein synthesis inhibitors, anisomycin and rapamycin and by the inhibitor of gene expression, DRB, infused immediately after extinction training into the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) but unlike regular CFC extinction, not in the CA1 region of the dorsal hippocampus. So social support generates a form of learning that differs from extinction acquired without social support, in terms of the brain structures involved. This finding may lead to a better understanding of the brain mechanisms involved in the social support of memories, and in therapies for disorders related to dysfunctional fear memories. Thus, here we show for the first time that the consolidation of extinction memory with social support relies on vmPFC rather than hippocampus gene expression and ribosomal and mTOR-dependent protein synthesis. These results provide additional knowledge about the cellular mechanisms and brain structures involved on the effect of social support in changing behavior and fear extinction memory.

Keywords: Contextual fear conditioning; Extinction; Prefrontal cortex; Hippocampus; Social buffering, Social support.

Significance Statement

The presence of a familiar non-fearful conspecific during the extinction training session inhibits the retrieval but not the consolidation of extinction of contextual fear conditioning. This effect relies on vmPFC rather than hippocampal gene expression and on ribosomal and mTOR-dependent protein synthesis. These results provide new knowledge about the cellular mechanisms and brain structures involved on the effect of social support in changing behavior and fear extinction memory.

Introduction

Fear memories are essential for survival, however, their overexpression and/or generalization to other than the original stimulus, may lead to fear- and anxiety-related disorders, such as phobias and posttraumatic stress disorder (PTSD) (1–7). Currently, the first-line treatment for these disorders are the extinction- based exposure therapies (2,3,8,9), which suppresses fear response by repeatedly exposing the subjects to the fear-inducing stimulus without harmful consequences (10).

Pavlovian fear conditioning is a widely used experimental model to study fear learning and extinction (8,11–13). In this paradigm, a neutral conditioned stimulus (CS) is paired with an aversive unconditioned stimulus (US). Subsequent presentations of the CS alone elicit a conditioned fear response (CR) (2,7,12). Multiple presentations of the CS in the absence of the US will eventually induce extinction memory, which decrease fear response to the CS (2,7,11). Fear extinction memory requires, at the time of consolidation, protein synthesis in several brain regions, such as hippocampus (14–19), ventromedial prefrontal cortex (8) and basolateral amigdala (20).

The expression of fear response can be modulated by many factors including by social presence (21–24). It has been reported that the presence of a conspecific reduces stress and fear responses to threat situation (25–30) Such reduction in fear responses can be greater when the conspecific is familiar and/or non-fearful (15). This social support effect is known as social buffering and seems to involve direct physical interaction, visual observation and/or olfaction (25,26,32–34). In addition, the presence of a conspecific blocks the fear response to an auditory CS (35) and facilitated fear extinction.

In the current study, we first examined the effect of social support by a familiar non-fearful conspecific during an unreinforced retrieval on the extinction memory of contextual fear conditioning (CFC). Then we study the effects of a ribosomal protein synthesis inhibitor, anisomycin (Ani); a mTOR dependent protein synthesis inhibitor, rapamycin (Rapa); and a gene expression inhibitor, 5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) on fear extinction memory of CFC with social support when infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus or ventromedial prefrontal cortex (vmPFC).

Results

Effect of social support by a familiar conspecific on the extinction of CFC.

To verify the effect of social support on the extinction memory of CFC, animals were submitted to a training session (CFC) alone. After 24 h they were submitted to a 10-min extinction training session (Ext Tr) either Alone or in the presence of a familiar conspecific, Support; and after another 24 h, the animals underwent a 3-min extinction retention test (Test), always alone. As can be observed in Fig. 1, animals whose Ext Tr occurred with social support expressed less freezing behavior than animals submitted to the Ext Tr alone. One-way ANOVA showed significant differences between groups ($F_{(3,28)} = 16.40$; $P < 0.0001$), and Newman-Keuls test revealed significant differences between the first 3 min of Ext Tr Support and the first 3 min of Ext Tr Alone. However, both groups (Alone and Support) exhibited similar levels of freezing during the Test, indicating that even in the absence of retrieval, animals submitted to the Ext Tr with a familiar conspecific were able to learn the extinction of CFC. Clearly, social support adds a degree of complexity to the task under study (one more stimulus and its consequences to be analysed besides the regular CS and US).

Effect of Ani, Rapa and DRB given into the vmPFC on the consolidation of extinction of CFC with social support.

A time-honored way of assessing whether a given brain structure participates in a given behavioral task is to study the effect of inhibition of ribosomal or mTOR-mediated protein synthesis and of gene expression in that structure. For these purposes, the effect of the localized infusion of well-known inhibitors of these processes, the most widely used of which are, respectively, anisomycin, rapamycin and DRB (7,14,15). To verify the participation of vmPFC on extinction of CFC with social support, animals were submitted to a training session (CFC) alone. After 24 h they were submitted to a Ext Tr either Alone or Support. Immediately after the Ext Tr session, animals received intra-vmPFC infusions of vehicle (Veh), anisomycin (Aniso, 80 μg per side; inhibitor of ribosomal protein synthesis), rapamycin (Rapa, 5 μg per side; inhibitor of mTOR-mediated protein synthesis) or DRB (5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosyl benzimidazole; 8 ng per side; inhibitor of gene expression). The doses were taken from the literature (7,14,15). Twenty-

four hours later, the animals underwent an Test, always alone. In Figure 2A Two-way ANOVA revealed a significant difference between the variables: Interaction ($F^{7,85} = 3.62$; $P = 0.0018$), Treatment ($F^{7,85} = 15.47$; $P < 0.0001$) and Groups ($F^{1,85} = 12.81$; $P = 0.0006$). In Figure 2B, Interacion ($F^{7,76} = 8.65$; $P < 0.0001$), Treatment ($F^{7,76} = 30.56$; $P < 0.0001$) and Groups ($F^{1,76} = 39.91$; $P < 0.0001$) and in the Figure 2C, Interacion ($F^{7,76} = 5.55$; $P < 0.0001$), Treatment ($F^{7,76} = 20.12$, $P < 0.001$) and Group ($F^{1,76} = 18,25$; $P < 0.0001$). During the Test, animals of both Alone and Support groups that received intra-vmPFC infusions of Aniso (A), Rapa (B) or DRB (C) showed an impairment of extinction memory when compared to their control groups. Two-way ANOVA followed by Boferroni in test revealed significant differences between Veh and Ani (Fig. 2A), Veh and Rapa (Fig. 2B) and DRB (Fig. 2C) groups on the Test. Similar result was observed on the Test Support group, when compared the treated groups with their respective Veh-treated group. The results obtained using Ani, Rapa and DRB infusions suggest that the vmPFC is involved in the consolidation of extinction of CFC with social support.

Effect of Ani, Rapa and DRB given into the CA1 on the consolidation of extinction of CFC with social support. In order to verify the participation of the CA1 region of the hippocampus on extinction of CFC with social support, the protocol described above was repeated, except that now, animals received intra-CA1 infusions of vehicle (Veh), Aniso (80 μg per side), Rapa (5 μg per side) or DRB (8 ng per side) immediately after the Ext Tr. In Figure 3A Two-way ANOVA revealed a significant difference between the variables: Interaction ($F^{7,68} = 13,30$; $P < 0.001$), Treatment ($F^{7,68} = 28,26$; $P < 0.001$) and Groups ($F^{1,68} = 49,53$; $P < 0.001$). In Figure 3B, Interacion ($F^{7,80} = 47.09$; $P < 0.0001$), Treatment ($F^{7,80} = 52,81$; $P < 0.001$) and Group ($F^{1,80} = 208.87$; $P < 0.0001$) and the Figure 3C, Interatio ($F^{7,80} = 16,09$; $P < 0.0001$), Treatment ($F^{7,80} = 28,33$; $P < 0.0001$) and Groups ($F^{1,80} = 89.66$; $P < 0.0001$). As shown in Fig. 3, animals whose Ext Tr occurred Alone and received intra-CA1 infusions of Aniso (A), Rapa (B) or DRB (C) exhibit an impairment on extinction memory when compared to their control groups on the Test. Two-way ANOVA followed by Boferroni in test revealed significant differences between Veh and Ani (Fig. 3A), Veh and Rapa (Fig. 3B) and DRB (Fig. 3C) groups on the Test. While the animals whose Ext Tr occurred with Social Support and received intra-CA1

infusions of Aniso (*A*), Rapa (*B*) or DRB (*C*) were able to extinguish the memory as well as the control group on the Test. The results obtained using Ani, Rapa and DRB infusions suggest that the CA1 region of the hippocampus is not involved in the consolidation of extinction of CFC with social support.

Discussion

Here we show that the presence of a familiar non-fearful conspecific during the extinction training session inhibits the retrieval but not the consolidation of extinction of CFC. Concerning whether the vmPFC and CA1 region of the dorsal hippocampus play a role in extinction of CFC with social support, our findings show that Ani, Rapa and DRB given into the vmPFC, but not into the CA1, impairs the consolidation of extinction of CFC. So social support generates a form of learning that differs from extinction acquired without social support, in terms of the brain structures involved.

Stress and fear responses induced by exposure to stressful stimuli can be attenuated when animal is exposed in the presence of a conspecific (25,31). This phenomenon is known as social buffering and has been demonstrated as an important strategy of social support in humans (36) and other species, including pigs (37), guinea pigs (38), cats (39), sheep (40), rhesus monkeys (41), zebrafish (42) and rodents (21,25,27,31,32,43).

The effect of social buffering on fear memory in rodents demonstrates that the presence of a conspecific decreases escape, avoidance and freezing behavior (25,31,44,45) and can occur either by pair-housing after a stressful traumatic event or by pair-exposure to an acute stressor or fear conditioning with an unfamiliar conspecific animal (28,45), however the effect is more prominent when the conspecific is a familiar animal (46).

Studies investigating the neural pathways that underlie the social buffering of conditioned fear responses indicate that pair-exposure to a contextual conditioned stimulus (CS) attenuates the c-Fos expression in the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus and lateral (LA) and central amygdala (28,31,47). Also, the presence of a conspecific suppressed the behavioral responses and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation to the CS, leading the corticosterone levels equal to a nonconditioned group (46). The

pharmacological antagonism and genetic down-regulation of oxytocin receptors in lateral septum, but not in the hippocampus, suppressed, while oxytocin administration facilitated the reduction of fear conditioning behavior induced by pre-exposure to nonfearful conspecifics (48).

The effect of social support also seems to occur during the extinction process. Animals submitted to an extinction training that is unable by itself to induce extinction of fear memory, when in the presence of an unfamiliar conspecific exhibited inhibition of freezing responses on test session that was followed by a decreased c-Fos expression in the PVN and LA, indicating a facilitation of extinction (22). Bredy and Barad (2008) (49) reported that exposing mice to a recently fear-conditioned familiar conspecific or to a urinary chemosignal from shocked conspecifics facilitates extinction learning but not the retention of extinction memory. Moreover, the presence of another animal in the extinction training facilitates extinction memory consolidation, and this effect is mediated by oxytocin in medial prefrontal cortex (mPFC), once the intra-mPFC infusions of an oxytocin selective agonist enhanced while the infusion of an antagonist blocked the facilitation of extinction induced by a conspecific (21).

Here we verified that the presence of a familiar conspecific on the extinction training session was capable of inhibit the retrieval of fear memory but not the consolidation of extinction of CFC. This is in agreement with other results demonstrating that the social presence facilitates the extinction of fear memories (21,22,32,49) and also with recent data showing that retrieval performance is not necessary for the initiation, maintenance or spontaneous recovery of extinction (16). That is, the results suggest that when extinction occurs in pairs, especially in the presence of a familiar conspecific, it provides the inhibition of the original fear association. This effect could be caused by physical contact or social interaction, though these variables were not measured in this study.

The involvement of the ventromedial prefrontal cortex (50–54) and the CA1 region of the hippocampus (17,54,55) together with the basolateral amygdala and other brain structures (7,8,18,55,56) in the extinction learning has been extensively described. The manipulation with protein synthesis inhibitors and signaling pathways indicate that these brain structures are crucial for the consolidation of extinction (57).

The present study shows that intra-vmPFC infusions of Ani, Rapa or DRB immediately after the extinction training session inhibits CFC extinction in animals trained, extinguished and tested alone, as amply described before (7,8,56,58). More importantly, we verified that in animals whose extinction occurred in the presence of a familiar conspecific, the consolidation of extinction of CFC with social support was abolished when protein synthesis was blocked in the vmPFC. This suggested that vmPFC participates on the consolidation of extinction of CFC with social support and requires ribosomal and mTOR- dependent protein synthesis and gene expression. When infused intra-CA1 immediately after the extinction training session, Ani, Rapa or DRB also inhibited the extinction of CFC in animals trained, extinguished and tested alone demonstrating that, as previous described (7,8,17,59), extinction requires ribosomal and mTOR-dependent protein synthesis and gene expression in the hippocampus, however had no effect on the extinction with social support.

The involvement of the vmPFC in the learning with social support suggests that it may be more complex than learning without social support. In a recent report, the enhanced retrieval of humans with highly superior memory correlates with the increased medial PFC activity measured by fMRI (60); that area appears to be related to the processing of more complex memories than those that take place without its intervention.

Thus, here we show for the first time that consolidation of the extinction memory with social support relies on vmPFC rather than hippocampal gene expression and ribosomal- and mTOR-dependent protein synthesis. These results provide additional knowledge about the cellular mechanisms and brain structures involved on the effect of social support in changing behavior and fear extinction memory.

Materials and Methods

Animals. Male *Wistar* rats (CrlCembe:WI; 3 months-old, 300–330 g) from Centro de Modelos Biologicos e Experimentais (CeMBE) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Brazil, were housed and maintained in groups of four per housing box, with free access to food and water, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) and room`s

temperature maintained at 22–23 °C. Each animal was randomly assigned to the group Alone, social support (the group of subjects submitted to the extinction learning in the presence of a familiar non-fearful conspecific) or the animal used as social support (rat placed with the subject during extinction training). Cage mates were assigned to the group of subjects submitted to the presence of a conspecific or to the social supporter group to maintain the familiarity between them. All experimental procedures were approved by Animal Committee on Ethics in the Care and Use of Laboratory Animals of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Surgery. Animals were deeply anesthetized with i.p. injections of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and implanted with a 22-gauge bilateral guide cannula 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus (anterior -4.2 mm, lateral \pm 3.0 mm, ventral -1.8 mm; from Bregma) or the ventromedial prefrontal cortex (anterior +3.2 mm, lateral \pm 0.8 mm, ventral -4.1 mm; from Bregma) according to the coordinates of the Atlas by Paxinos and Watson (1986). Dental acrylic cement was used to fix the guide cannulae to the skull. After surgery, animals were allowed 7 days for recovery prior to behavioral procedures and were handled daily for 3 days before the behavioral experiments.

Extinction of Contextual Fear Conditioning (CFC). For the CFC, animals were individually placed into the conditioning chamber (35 × 35 × 35 cm aluminum box with acrylic walls, and a floor of stainless-steel grid bars connected to a device to deliver the foot-shock presentations, placed inside a sound-attenuating box with a ventilating fan) and after 2 min, three electrical foot shocks (0.5 mA, 2 s) were delivered with a 30-s intervals between them. Animals were removed from the conditioning chamber 30 s after the last foot shock and placed back in their home cages. After 24 h, animals were placed in the same conditioning chamber, Alone (A) or in the presence of a familiar non- fearful conspecific (Social Support, S), for a 10-min extinction training of CFC, with no foot shocks. Twenty-four hours later, all animals were placed again in the same apparatus alone for a 3-min extinction retention test, again with no foot shocks. After each use, the apparatus was cleaned with 70% ethanol. The

percentage of time that the animals spent freezing (i.e., no visible movement except for respiration) in the apparatus was measured (8,14–16).

Pharmacological interventions. Animals received intra-vmCPF or intra-CA1 infusions of 0.9% saline (vehicle), Anisomycin (Ani, 80 μg per side; inhibitor of protein synthesis), Rapamycin (Rapa, 5 μg per side; mTOR-dependent protein synthesis inhibitor) and 5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosylbenzimidazole (DRB, 8 ng per side; inhibitor of gene expression) immediately after the extinction training session.

The doses used were chosen based on previous studies reporting their efficacy (14,15,61,62). For the drug infusions, a 10- μl Hamilton syringe was connected through a polyethylene tube to an infusion needle and 1 μl (at a rate of 0.5 $\mu\text{l}/30$ s) was bilaterally infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus or into the vmPFC. Control groups received equal volumes of sterile saline (0.9%). At the end, the infusion needle was left in place for additional 60 seconds in order to prevent backflow and was then withdrawn, placed on the other side and the procedure was repeated.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls Test and presented as mean \pm standard error of the mean. For all data the values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by research grants from the National Council of Research of Brazil (CNPq), the Brazilian Agency for Graduate Studies (CAPES) and the State Foundation for science support (FAPERGS).

REFERENCES

1. Heim C, Nemeroff CB. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS Spectr*. 2009 Jan;14(1 Suppl 1):13–24.
2. Milad MR, Quirk GJ. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol*. 2012;63:129–51.
3. Milad MR, Rosenbaum BL, Simon NM. Neuroscience of fear extinction: implications for assessment and treatment of fear-based and anxiety related disorders. *Behav Res Ther*. 2014 Nov;62:17–23.
4. Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, et al. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*. 2011 Oct 28;147(3):678–89.
5. Cowansage KK, Shuman T, Dillingham BC, Chang A, Golshani P, Mayford M. Direct reactivation of a coherent neocortical memory of context. *Neuron*. 2014 Oct 22;84(2):432–41.
6. Tanaka KZ, Pevzner A, Hamidi AB, Nakazawa Y, Graham J, Wiltgen BJ. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron*. 2014 Oct 22;84(2):347–54.
7. Izquierdo I, Furini CRG, Myskiw JC. Fear Memory. *Physiol Rev*. 2016 Apr;96(2):695–750.
8. Fiorenza NG, Rosa J, Izquierdo I, Myskiw JC. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav Brain Res*. 2012 Jun 15;232(1):210–6.
9. Maren S, Holmes A. Stress and Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Jan;41(1):58–79.
10. McLean CP, Foa EB. Prolonged exposure therapy for post-traumatic stress disorder: a review of evidence and dissemination. *Expert Rev Neurother*. 2011 Aug;11(8):1151–63.
11. Milad MR, Rauch SL, Pitman RK, Quirk GJ. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biol Psychol*. 2006 Jul;73(1):61–71.
12. Chang C, Knapska E, Orsini CA, Rabinak CA, Zimmerman JM, Maren S. Fear extinction in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2009 Apr;Chapter 8:Unit8.23.
13. LeDoux JE. Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 25;111(8):2871–8.
14. de Carvalho Myskiw J, Furini CRG, Benetti F, Izquierdo I. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 25;111(12):4572–7.

15. de Carvalho Myskiw J, Benetti F, Izquierdo I. Behavioral tagging of extinction learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 15;110(3):1071–6.
16. de Carvalho Myskiw J, Furini CRG, Schmidt B, Ferreira F, Izquierdo I. Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 13;112(2):E230-233.
17. Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 9;98(21):12251–4.
18. Kitamura T, Ogawa SK, Roy DS, Okuyama T, Morrissey MD, Smith LM, et al. Engrams and Circuits Crucial for Systems Consolidation of a Memory. *Science*. 2017 Apr 7;356(6333):73–8.
19. Nader K, Schafe GE, Doux JEL. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 2000 Aug;406(6797):722–6.
20. Lin C-H, Yeh S-H, Leu T-H, Chang W-C, Wang S-T, Gean P-W. Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003 Mar 1;23(5):1574–9.
21. Brill-Maoz N, Maroun M. Extinction of fear is facilitated by social presence: Synergism with prefrontal oxytocin. *Psychoneuroendocrinology*. 2016 Apr;66:75–81.
22. Mikami K, Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Mori Y. Social buffering enhances extinction of conditioned fear responses in male rats. *Physiol Behav*. 2016 01;163:123–8.
23. Hall DA. The reaction between elastase and elastic tissue. 1. The substrate. *Biochem J*. 1955 Mar;59(3):459–65.
24. Baum WM, Rachlin HC. Choice as time allocation. *J Exp Anal Behav*. 1969 Nov;12(6):861–74.
25. Davitz JR, Mason DJ. Socially facilitated reduction of a fear response in rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1955 Jun;48(3):149–51.
26. Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Nishihara M, Mori Y. Main olfactory system mediates social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Eur J Neurosci*. 2009 Feb;29(4):777–85.
27. Kiyokawa Y, Wakabayashi Y, Takeuchi Y, Mori Y. The neural pathway underlying social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Eur J Neurosci*. 2012 Nov;36(10):3429–37.
28. Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Mori Y. Two types of social buffering differentially mitigate conditioned fear responses. *Eur J Neurosci*. 2007 Dec;26(12):3606–13.
29. DeVries AC, Glasper ER, Detillion CE. Social modulation of stress responses. *Physiol Behav*. 2003 Aug;79(3):399–407.

30. Nakayasu T, Kato K. Is full physical contact necessary for buffering effects of pair housing on social stress in rats? *Behav Processes*. 2011 Feb;86(2):230–5.
31. Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Partner's stress status influences social buffering effects in rats. *Behav Neurosci*. 2004 Aug;118(4):798–804.
32. Guzmán YF, Tronson NC, Guedea A, Huh KH, Gao C, Radulovic J. Social modeling of conditioned fear in mice by non-fearful conspecifics. *Behav Brain Res*. 2009 Jul 19;201(1):173–8.
33. Cohen S, Wills TA. Stress, social support, and the buffering hypothesis. *Psychol Bull*. 1985 Sep;98(2):310–57.
34. Liu H, Yuan T-F. Physical Interaction Is Required in Social Buffering Induced by a Familiar Conspecific. *Sci Rep*. 2016 Dec 23;6:39788.
35. Kiyokawa Y, Takeuchi Y. Social buffering ameliorates conditioned fear responses in the presence of an auditory conditioned stimulus. *Physiol Behav*. 2017 01;168:34–40.
36. Beck JG, Grant DM, Clapp JD, Palyo SA. Understanding the interpersonal impact of trauma: contributions of PTSD and depression. *J Anxiety Disord*. 2009 May;23(4):443–50.
37. Kanitz E, Hameister T, Tuchscherer M, Tuchscherer A, Puppe B. Social support attenuates the adverse consequences of social deprivation stress in domestic piglets. *Horm Behav*. 2014 Mar;65(3):203–10.
38. Hennessy MB, Zate R, Maken DS. Social buffering of the cortisol response of adult female guinea pigs. *Physiol Behav*. 2008 Mar 18;93(4– 5):883–8.
39. John ER, Chesler P, Bartlett F, Victor I. Observation learning in cats. *Science*. 1968 Mar 29;159(3822):1489–91.
40. Lyons DM, Price EO, Moberg GP. Social grouping tendencies and separation-induced distress in juvenile sheep and goats. *Dev Psychobiol*. 1993 Jul;26(5):251–9.
41. Winslow JT, Noble PL, Lyons CK, Sterk SM, Insel TR. Rearing effects on cerebrospinal fluid oxytocin concentration and social buffering in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2003 May;28(5):910–8.
42. Faustino AI, Tacão-Monteiro A, Oliveira RF. Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Sci Rep*. 2017 Mar 31;7:44329.
43. Klein B, Bautze V, Maier A-M, Deussing J, Breer H, Strotmann J. Activation of the mouse odorant receptor 37 subsystem coincides with a reduction of novel environment-induced activity within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Eur J Neurosci*. 2015 Mar;41(6):793–801.

44. Ishii A, Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Mori Y. Social buffering ameliorates conditioned fear responses in female rats. *Horm Behav.* 2016;81:53–8.
45. Lee H, Noh J. Pair exposure with conspecific during fear conditioning induces the link between freezing and passive avoidance behaviors in rats. *Neurosci Res.* 2016 Jul;108:40–5.
46. Kiyokawa Y, Honda A, Takeuchi Y, Mori Y. A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behav Brain Res.* 2014 Jul 1;267:189–93.
47. Fuzzo F, Matsumoto J, Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Ono T, Nishijo H. Social buffering suppresses fear-associated activation of the lateral amygdala in male rats: behavioral and neurophysiological evidence. *Front Neurosci.* 2015;9:99.
48. Guzmán YF, Tronson NC, Sato K, Mesic I, Guedea AL, Nishimori K, et al. Role of oxytocin receptors in modulation of fear by social memory. *Psychopharmacology (Berl).* 2014 May;231(10):2097–105.
49. Bredy TW, Barad M. Social modulation of associative fear learning by pheromone communication. *Learn Mem Cold Spring Harb N.* 2009 Jan;16(1):12–8.
50. Santini E, Muller RU, Quirk GJ. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2001 Nov 15;21(22):9009–17.
51. Santini E, Quirk GJ, Porter JT. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2008 Apr 9;28(15):4028–36.
52. Santini E, Sepulveda-Orengo M, Porter JT. Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2012 Aug;37(9):2047–56.
53. Do-Monte FH, Manzano-Nieves G, Quiñones-Laracuente K, Ramos-Medina L, Quirk GJ. Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. *J Neurosci.* 2015 Feb 25;35(8):3607–15.
54. Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2011 Jan;36(2):529–38.
55. Vianna MR, Igaz LM, Coitinho AS, Medina JH, Izquierdo I. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.* 2003 May;79(3):199–203.
56. Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, et al. Brain region-specific gene expression activation required for

reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009 Jan 14;29(2):402–13.

57. Milad MR, Quirk GJ. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*. 2002 Nov 7;420(6911):70–4.

58. Santini E, Ge H, Ren K, Peña de Ortiz S, Quirk GJ. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2004 Jun 23;24(25):5704–10.

59. Vianna MR, Coitinho AS, Izquierdo I. Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. *Curr Neurovasc Res*. 2004 Jan;1(1):55–60.

60. Santangelo V, Cavallina C, Colucci P, Santori A, Macrì S, McGaugh JL, et al. Enhanced brain activity associated with memory access in highly superior autobiographical memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul 24;115(30):7795–800.

61. Igaz LM, Vianna MRM, Medina JH, Izquierdo I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2002 Aug 1;22(15):6781–9.

62. Myskiw JC, Rossato JI, Bevilaqua LRM, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2008 Mar;89(3):338–51.

Graphics and Legends

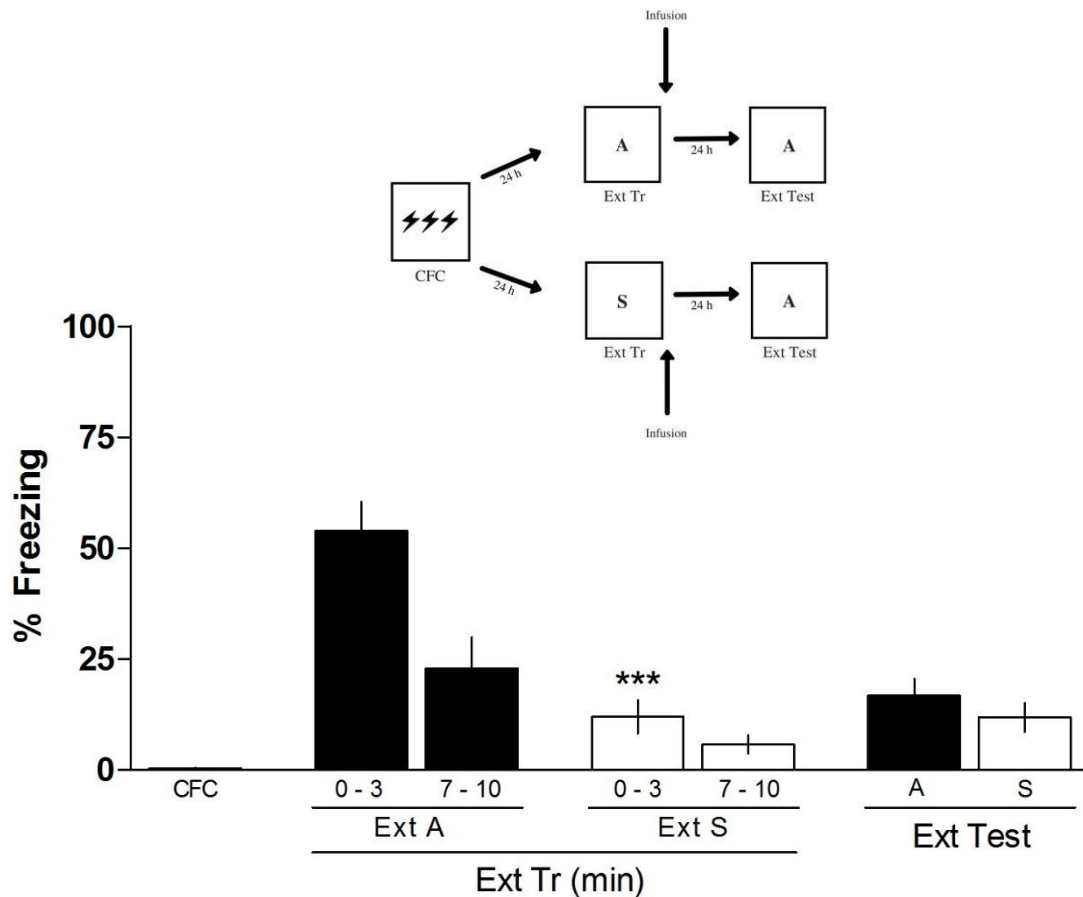


Fig. 1. Effect of social support by a familiar conspecific on the extinction of CFC. Animals were trained in CFC (three 2-s, 0.5-mA scramble footshocks separated by 30-s intervals). After 24 h, animals were submitted to an extinction training session (Ext Tr) either Alone (A) or with Social Support (S). Twenty-four hours later, the animals underwent an Test, in which they were alone. The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the Tr, in the first 3 min and last 3 min of the Ext Tr and in the Test. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$ animals per group). *** $P < 0.0001$ vs. group Alone group in the first 3 min of the Ext Tr, Newman-Keuls test after one-way ANOVA. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocol used.

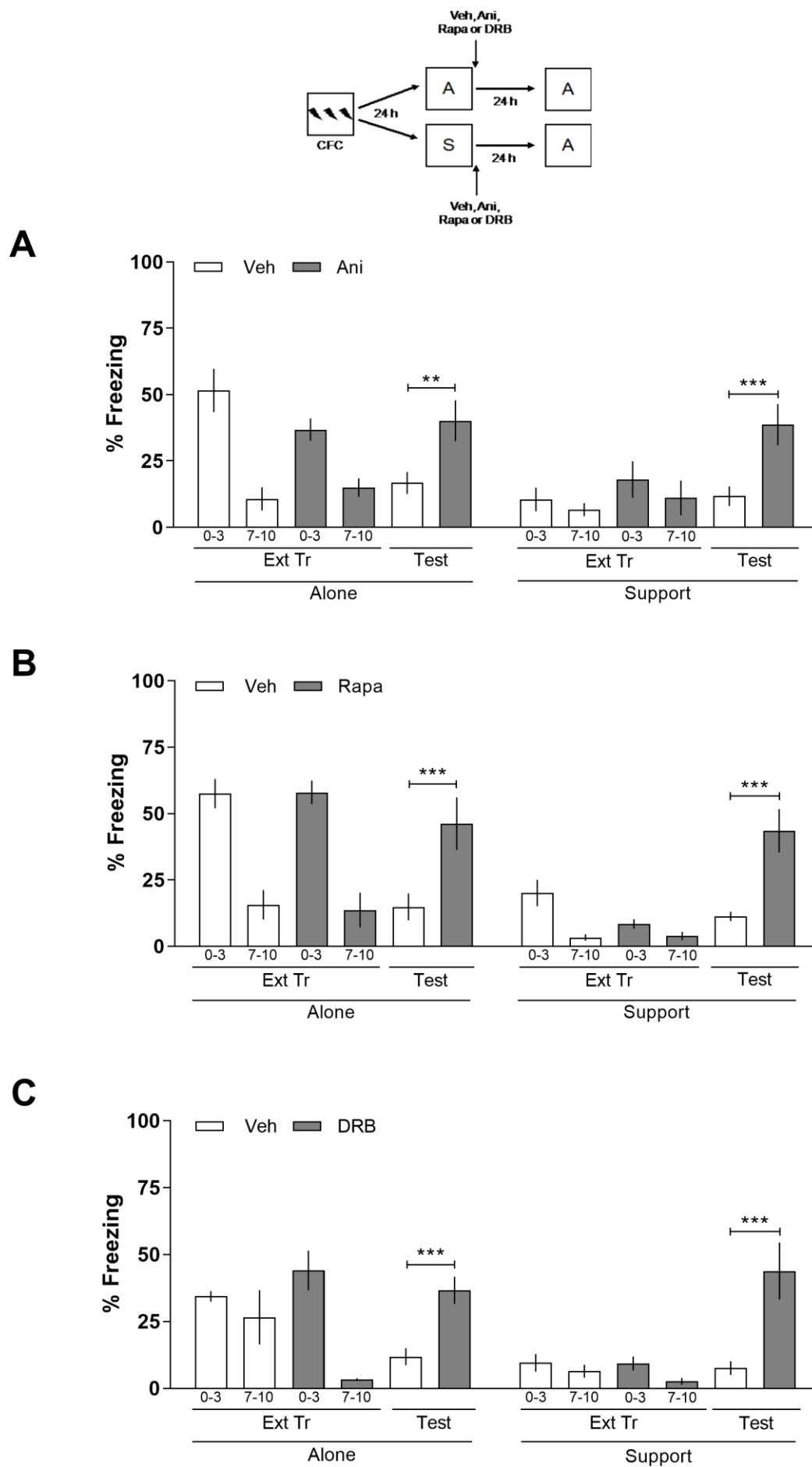


Fig. 2. Effect of Ani, Rapa and DRB given into the vmPFC on the consolidation of extinction of CFC with social support. Animals with infusion cannulae implanted in the vmPFC were trained in CFC (three 2-s, 0.5- mA scramble footshocks separated by 30-s intervals). After 24 h, the animals were submitted to an extinction training session (Ext Tr) either Alone (A) or with Social Support (S). Immediately after the Ext Tr session, the animals were bilaterally infused intra-vmPFC with Veh, Aniso (80 μ g per side) (A), Rapa (5 μ g per side) (B), or DRB (8 ng per side) (C). Twenty-four hours later, the animals underwent an Ext Test alone. When given into the vmPFC, Ani, Rapa and DRB blocked the consolidation of extinction of CFC. The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the Tr, in the first 3 min and last 3 min of the Ext Tr and in the Test. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 5 - 7 animals per group). **P < 0.01 and ***P<0.001 vs. control groups in the retention test, Bonferroni post-test after two-way ANOVA. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocol used.

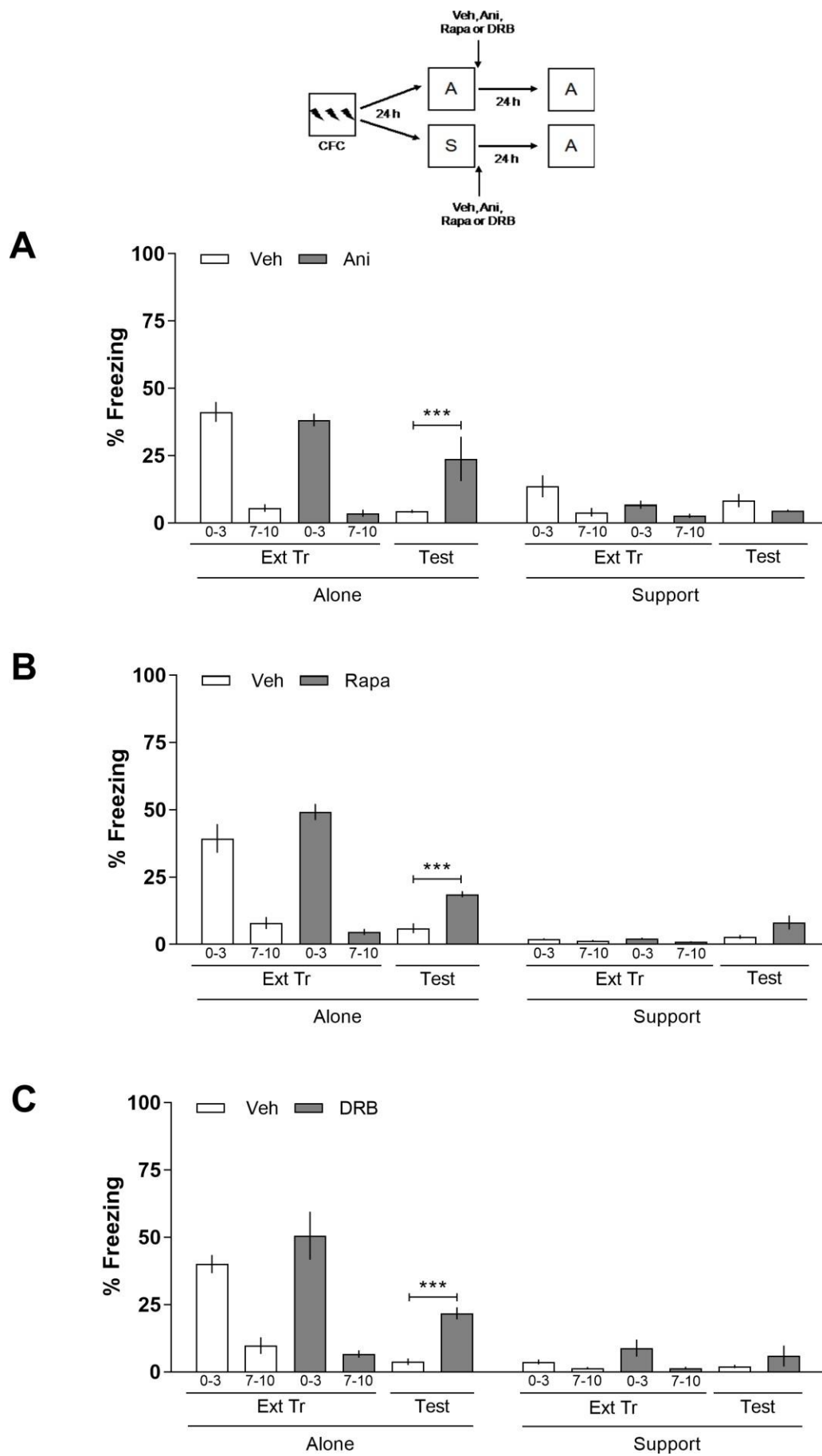


Fig. 3. Effect of Ani, Rapa and DRB given into the CA1 on the consolidation of extinction of CFC with social support. Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 were trained in CFC. After 24 h, the animals were submitted to an extinction training session (Ext Tr) either Alone

(A) or with Social Support (S). Immediately after the Ext Tr session, the animals were bilaterally infused intra-CA1 with Veh, Aniso (80 µg per side) (A), Rapa (5 µg per side) (B), or DRB (8 ng per side) (C). Twenty-four hours later, the animals underwent an Test alone. When given into the CA1, Ani, Rapa and DRB blocked the consolidation of extinction of CFC of the group Alone but not with social support. The figure shows the percentage of time spent freezing in the first 2 min of the Tr, in the first 3 min and last 3 min of the Ext Tr, and in the Ext Test. Data are expressed as mean ± SEM (n = 5-7 animals per group). ***P < 0.0001 vs. control groups in the retention test, Bonferroni test after Two-way ANOVA. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocol used.

6 CONCLUSÃO

Deste modo, este estudo conclui que a interação social pode ser um regulador positivo na extinção da memória de medo mesmo que não haja a evocação da memória aversiva. Além disso, nossos resultados sugerem que a consolidação da memória de extinção com suporte social não é dependente do hipocampo, região esta necessária para a consolidação da extinção de memória de medo em animais treinados e testados sozinhos. Os resultados sugerem que a extinção de medo com suporte social além de ser uma possível ferramenta eficaz para a facilitação da extinção de memórias de medo, é uma memória com mecanismo de consolidação particular, que difere da consolidação da extinção de medo de animais expostos ao MCC e treino de extinção sozinhos. Estudos adicionais são necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos na extinção da memória de medo com suporte social.

REFERÊNCIAS

ANDREWS-HANNA, J. R. et al. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. **Neuron**, v. 56, n. 5, p. 924–935, 6 dez. 2007.

ANTUNES, H. K. M. et al. Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 2, p. 108–114, abr. 2006.

BÄCKMAN, L. et al. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 6, p. 791–807, 2006.

BENNETT, M. F. et al. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? **The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings**, v. 13, n. 1, p. 15–19, abr. 2008.

BEZERRA, F. C.; ALMEIDA, M. I. DE; NÓBREGA-TERRIEN, S. M. Estudos sobre envelhecimento no Brasil: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 15, n. 1, p. 155–167, 2012.

BADDELEY, A. et al. Memória. Porto Alegre: Artmed; 2011.

BRILL-MAOZ, N.; MAROUN, M. Extinction of fear is facilitated by social presence: Synergism with prefrontal oxytocin. **Psychoneuroendocrinology**, v. 66, p. 75–81, abr. 2016.

BURLA, Claudia et al. Uma visão geral da demência no Brasil: uma abordagem demográfica. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 10, p. 2949- 2956, out. 2013.

CHANG, C. et al. Fear Extinction in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 47, n. 1, p. 8.23.1-8.23.17, [s.d.].

COWAN, N. **Attention and Memory: An Integrated Framework**. [s.l.] Oxford University Press, 1998.

DE CARVALHO MYSKIW, J. et al. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. 4572–4577, 25 mar. 2014.

DE CARVALHO MYSKIW, J. et al. Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 2, p. E230-233, 13 jan. 2015.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 527–538, 24 out. 2002.

DINIZ, B. S. et al. Late-life depression and risk of vascular dementia and

Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies. **The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science**, v. 202, n. 5, p. 329–335, maio 2013.

FAUSTINO, A. I.; TACÃO-MONTEIRO, A.; OLIVEIRA, R. F. Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44329, 31 mar. 2017.

FELIX, Y. T. M.; CATÃO, M. DE F. F. M. Envelhecimento e aposentadoria por policiais rodoviários. **Psicologia & Sociedade**, v. 25, n. 2, p. 420–429, 2013.

FIORENZA, N. G. et al. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 210–216, 15 jun. 2012.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D. Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5976, p. 321–326, 16 abr. 2010.

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

GLASS, T. A. et al. Social engagement and depressive symptoms in late life: longitudinal findings. **Journal of Aging and Health**, v. 18, n. 4, p. 604–628, ago. 2006.

GOTTLIEB, M. G. V. et al. Envelhecimento e longevidade no Rio Grande do Sul: um perfil histórico, étnico e de morbi-mortalidade dos idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 2, p. 365–380, jun. 2011.

GUZMÁN, Y. F. et al. Social modeling of conditioned fear in mice by non-fearful conspecifics. **Behavioural Brain Research**, v. 201, n. 1, p. 173–178, 19 jul. 2009.

GUZMÁN, Y. F. et al. Role of oxytocin receptors in modulation of fear by social memory. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 10, p. 2097–2105, maio 2014.

HANNIGAN, C. et al. The NEIL Memory Research Unit: psychosocial, biological, physiological and lifestyle factors associated with healthy ageing: study protocol. **BMC Psychology**, v. 3, n. 1, 27 jun. 2015.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, abr. 2016.

IZQUIERDO, IVAN. **Memória**. [s.l.] Artmed, 2008.

KIYOKAWA, Y. et al. A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 267, p. 189–193, 1 jul. 2014.

KLEIN, B. et al. Activation of the mouse odorant receptor 37 subsystem coincides

with a reduction of novel environment-induced activity within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **The European Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 6, p. 793–801, mar. 2015.

KÜSTER, O. C. et al. Cognitive change is more positively associated with an active lifestyle than with training interventions in older adults at risk of dementia: a controlled interventional clinical trial. **BMC psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 315, 08 2016.

LEE, H.; NOH, J. Pair exposure with conspecific during fear conditioning induces the link between freezing and passive avoidance behaviors in rats. **Neuroscience Research**, v. 108, p. 40–45, jul. 2016.

LI, N.; CHEN, W. A Mobile Game for the Social and Cognitive Well-Being of Elderly People in China. **Studies in Health Technology and Informatics**, v. 242, p. 614–621, 2017.

LIPINA, T. V.; RODER, J. C. Co-learning facilitates memory in mice: a new avenue in social neuroscience. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 283–293, jan. 2013.

LIU, H.; YUAN, T.-F. Physical Interaction Is Required in Social Buffering Induced by a Familiar Conspecific. **Scientific Reports**, v. 6, p. 39788, 23 2016a.

LIU, H.; YUAN, T.-F. Physical Interaction Is Required in Social Buffering Induced by a Familiar Conspecific. **Scientific Reports**, v. 6, p. 39788, 23 dez. 2016b.

LONSDORF, T. B.; MERZ, C. J. More than just noise: Inter-individual differences in fear acquisition, extinction and return of fear in humans - Biological, experiential, temperamental factors, and methodological pitfalls. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 80, p. 703–728, set. 2017.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 6 jun. 2013.

LUNENFELD, B.; STRATTON, P. The clinical consequences of an ageing world and preventive strategies. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 27, n. 5, p. 643–659, out. 2013.

MAREN, S.; HOLT, W. G. Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 97–110, fev. 2004.

MILAD, M. R. et al. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. **Biological Psychology**, v. 73, n. 1, p. 61–71, jul. 2006.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 3, p. 187–199, jun. 2008.

- MORIGUCHI, Y., BONARDI, G., ORG: MORIGUCHI, E. Geriatria & gerontologia preventivas: novos conceitos. Porto Alegre: Edipucrs, 2014.
- MORGAN, M. A.; ROMANSKI, L. M.; LEDOUX, J. E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. **Neuroscience Letters**, v. 163, n. 1, p. 109–113, 26 nov. 1993.
- MORRISON, J. H.; BAXTER, M. G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 240–250, 7 mar. 2012.
- MOSER, M. B. et al. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 21, p. 9697–9701, 10 out. 1995.
- MOY, S. S. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 3, n. 5, p. 287–302, out. 2004.
- MYERS, R. E.; SWETT, C.; MILLER, M. Loss of social group affinity following prefrontal lesions in free-ranging macaques. **Brain Research**, v. 64, p. 257–269, 21 dez. 1973.
- NADER, K.; SCHAFE, G. E.; DOUX, J. E. L. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, ago. 2000.
- OEPPEN, J.; VAUPEL, J. W. Broken Limits to Life Expectancy. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1029–1031, 2002.
- OLIVIER, B. Serotonin: a never-ending story. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 2–18, 15 abr. 2015.
- OPRESKO, P. L.; SHAY, J. W. Telomere-associated aging disorders. **Ageing Research Reviews**, v. 33, p. 52–66, jan. 2017.
- ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1773–1802, ago. 2012.
- PONNUSAMY, R. et al. Retrieval and Reconsolidation Accounts of Fear Extinction. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, 9 maio 2016.
- ROY, M.; SHOHAMY, D.; WAGER, T. D. Ventromedial prefrontal-subcortical systems and the generation of affective meaning. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 3, p. 147–156, mar. 2012.
- SARA, S. J. Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. **Learning & Memory**, v. 7, n. 2, p. 73–84, 3 jan. 2000.

SCHNEIDER, R. H.; IRIGARAY, T. Q. O envelhecimento na atualidade: aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais. **Estudos de Psicologia (Campinas)**, v. 25, n. 4, p. 585–593, dez. 2008.

SCOTT, J. P., FREDERICSON, E. The Causes Of Fighting In Mice And Rats. *Physiological Zoology*. v. 24, n. 4, p. 273-309, 1951.

SCHRAMM, J. M. D. A. et al. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 897–908, 2004.

SEALS, D. R.; JUSTICE, J. N.; LAROCCA, T. J. Physiological geroscience: targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 8, p. 2001–2024, 15 abr. 2016.

STERN, S. A.; ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory enhancement. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 37–53, fev. 2013.

SZAPIRO, G. et al. Molecular mechanisms of memory retrieval. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 11, p. 1491–1498, nov. 2002.

WERNER-SEIDLER, A. et al. The relationship between social support networks and depression in the 2007 National Survey of Mental Health and Well-being. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 52, n. 12, p. 1463–1473, 2017.

WHO | Proposta de definição proposta de uma pessoa idosa na África para o Projeto MDS. Disponível em: <<https://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

ZHANG, W.-N. et al. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 262, p. 47–56, 1 abr. 2014.

ISSN on-line: 1091-6490

Fator de impacto: 9.504

Qualis: A1



Extinction learning with social support depends on protein synthesis in prefrontal cortex but not hippocampus

Clarissa Penha Farias^{a,b}, Cristiane Regina Guerino Furini^{a,b}, Eduarda Godfried Nachtigall^a, Jonny Anderson Kielbovicz Behling^a, Eduardo Silva de Assis Brasil^a, Leticia Bühler^a, Ivan Izquierdo^{a,b,1}, and Jociane de Carvalho Myskiw^{a,b,1}

^aMemory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil; and ^bNational Institute of Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, Brazil

Contributed by Ivan Izquierdo, November 13, 2018 (sent for review September 13, 2018; reviewed by Michel Baudry and Benno Roozendaal)

Extinction of contextual fear conditioning (CFC) in the presence of a familiar nonfearful conspecific (social support), such as that of others tasks, can occur regardless of whether the original memory is retrieved during the extinction training. Extinction with social support is blocked by the protein synthesis inhibitors anisomycin and rapamycin and by the inhibitor of gene expression 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole infused immediately after extinction training into the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) but unlike regular CFC extinction not in the CA1 region of the dorsal hippocampus. So social support generates a form of learning that differs from extinction acquired without social support in terms of the brain structures involved. This finding may lead to a better understanding of the brain mechanisms involved in the social support of memories and in therapies for disorders related to dysfunctional fear memories. Thus, here we show that the consolidation of extinction memory with social support relies on vmPFC rather than hippocampus gene expression and ribosomal- and mammalian target of rapamycin-dependent protein synthesis. These results provide additional knowledge about the cellular mechanisms and brain structures involved on the effect of social support in changing behavior and fear extinction memory.

contextual fear conditioning | extinction | prefrontal cortex | hippocampus | social support

Fear memories are essential for survival, however, their over-expression and/or generalization to other than the original stimulus, may lead to fear- and anxiety-related disorders, such as phobias and post-traumatic stress disorder (1–7). Currently, the first-line treatment for these disorders is the extinction-based exposure therapies (2, 3, 8, 9), which suppresses fear response

In the current paper, we first examined the effect of S by a familiar nonfearful conspecific during an unreinforced retrieval on the extinction memory of contextual FC (CFC). Then, we study the effects of a ribosomal protein synthesis inhibitor, anisomycin (Ani); a mammalian target of rapamycin- (Rapa-) (mTOR-) dependent protein synthesis inhibitor, Rapa; and a gene expression inhibitor, 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) on fear extinction memory of CFC with S when infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus or ventromedial prefrontal cortex (vmPFC).

Results

Effect of S by a Familiar Conspecific on the Extinction of CFC. To verify the effect of S on the extinction memory of CFC, animals were submitted to a training session (CFC) alone. After 24 h, they were submitted to a 10-min extinction training (Ext Tr) session either Alone (A) or in the presence of a familiar conspecific, Support; and after another 24 h, the animals underwent a 3-min extinction retention test (Test) always alone. As can be observed in Fig. 1, animals whose Ext Tr occurred with S expressed less freezing behavior than animals submitted to the Ext Tr alone. One-way ANOVA showed significant differences between groups ($F_{3,28} = 16.40$; $P < 0.0001$), and the Newman-Keuls test revealed significant differences between the first 3 min of Ext Tr support and the first 3 min of Ext Tr A. However, both groups (A and Support) exhibited similar levels of freezing during the Test, indicating that, even in the absence of retrieval, animals submitted to the Ext Tr with a familiar conspecific were able to learn the extinction of CFC. Clearly, S adds a degree of complexity to the task under study (one more stimulus and its

ANEXO A – APROVAÇÃO DO SISTEMA DE PESQUISA DA PUCRS**SIPESQ**

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7480

Porto Alegre, 23 de julho de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES 5HT1A, DO CORTEX PRÉ-FRONTAL, HIPOCAMPO E DA AMÍGDA BASOLATERAL NA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO COM SUPORTE SOCIAL" coordenado por JOCIANE DE CARVALHO MYSKIW. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA

ANEXO B – APROVAÇÃO CEUA



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7480

Porto Alegre, 17 de novembro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES 5HT1A, DO CORTEX PRÉ-FRONTAL, HIPOCAMPO E DA AMÍGDA BASOLATERAL NA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO COM SUPORTE SOCIAL" coordenado por JÓCIANE DE CARVALHO MYSKIW.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
1814	Ratos	17/11/2016 - 17/07/2018

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)