

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

FLÁVIA FAGUNDES FERREIRA

**EFEITO DO SUPORTE SOCIAL E DOS RECEPTORES CB1 NA
CONSOLIDAÇÃO E NA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO
CONDICIONADO AO CONTEXTO**

Porto Alegre

2017

FLÁVIA FAGUNDES FERREIRA

**EFEITO DO SUPORTE SOCIAL E DOS RECEPTORES CB1 NA
CONSOLIDAÇÃO E NA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO
CONDICIONADO AO CONTEXTO**

Dissertação apresentada ao 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.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo

Co-orientador: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw

Porto Alegre
2017

Ficha Catalográfica

F383e Ferreira, Flávia Fagundes

Efeito do suporte social e dos receptores CB1 na consolidação e na extinção da memória de medo condicionado ao contexto / Flávia Fagundes Ferreira . – 2017.

84 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw.

1. Suporte social. 2. Memória de medo condicionado ao contexto. 3. receptores CB1. I. Izquierdo, Ivan. II. Myskiw, Jociane de Carvalho. III. Título.

Flávia Fagundes Ferreira

**EFEITO DO SUPORTE SOCIAL E DOS RECEPTORES CB1 NA
CONSOLIDAÇÃO E NA EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO
CONDICIONADO AO CONTEXTO**

Dissertação apresentada ao 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 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Carla Schwanke – PUCRS

Dra. Roberta Fabbri - UNIFI

Profa. Dra. Elke Bromberg (Suplente)- PUCRS

AGRADECIMENTOS

Dedico especial agradecimento aos meus professores orientadores, Dr. Ivan Izquierdo e Dra. Jociane Myskiw, pela oportunidade de fazer parte do Centro de Memória, onde sempre fui recebida com muito carinho. Obrigada pelo auxílio, paciência e oportunidade de aprendizado. Tenho certeza que obtive grande crescimento pessoal e profissional ao lado de grandes mestres.

Aos colegas do Centro de Memória, os quais se tornaram mais amigos do que apenas colegas de laboratório: Dra. Cristiane Furini, Ms. Scheila Schmidt, Ms. Carolina Zinn, Lorena Cavalcanti, Fernanda Rodrigues, Dra. Roberta Fabbri, Eduardo de Assis Brasil, Clarissa Penha, Eduarda Nachtigall, Bruna Saenger, Letícia Bühler e Jonny Anderson. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos, desde os de aflições por assuntos pessoais aos de alegria pelas nossas publicações, vocês são incríveis! Desejo muito sucesso e felicidade para todos vocês!

À minha família, obrigada por me apoiar, por confiar em mim, por ser meu porto seguro e me dar o ombro amigo sempre que necessário.

A todos os professores que contribuíram de alguma maneira na minha formação, desde a graduação até a conclusão do mestrado. Obrigada por disponibilizarem as ferramentas necessárias para o meu crescimento profissional.

Aos professores que aceitaram fazer parte da comissão examinadora e contribuir para o enriquecimento desta dissertação.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) por me proporcionar a oportunidade e a infraestrutura necessária para a minha conquista.

Ao Instituto de Geriatria e Gerontologia (IGG) e aos meus colegas do programa, por me acolherem desde o primeiro dia, como uma grande família. O IGG é, sem dúvidas, um local onde obtemos um enorme crescimento interior e profissional, rodeado de professores qualificados e alunos capacitados para formarmos uma grande equipe interdisciplinar, com riquíssimas discussões e aprendizados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado.

Novamente ao Instituto de Geriatria e Gerontologia pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À todos que, de alguma maneira, fizeram essa dissertação ser concluída.

Aprendi que nem sempre o caminho é fácil, que errar é humano e ser você mesmo não é defeito! Agradeço à vida por ter me tornado uma pessoa batalhadora, sempre com sorriso no rosto e grata por tudo que tenho.

Flávia Ferreira

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

As memórias de medo são as principais responsáveis pelo comportamento defensivo expresso em resposta a ameaças, porém, quando manifestadas de maneira recorrente e fora de contexto, podem desenvolver graves distúrbios emocionais, como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Tais memórias podem ser moduladas por manipulação farmacológica no sistema endocanabinóide e por interação com outros indivíduos da mesma espécie, além de métodos como a extinção, clinicamente conhecida como Terapia de Exposição, que visa inibir a evocação de uma memória previamente adquirida através da sobreposição de uma nova memória. Com isso, o objetivo deste estudo é demonstrar o efeito do suporte social sobre a aquisição e a extinção da memória de medo condicionado ao contexto (MCC) sob a modulação dos receptores canabinóides do subtipo 1 (CB1). Para isso, ratos Wistar machos adultos, com cânulas guia implantadas bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal por meio de cirurgia estereotáxica, foram submetidos sozinhos ou com a presença de um co-específico a 3 minutos de treino da tarefa de MCC, onde receberam 3 estímulos elétricos de 0,5 mA por 2 segundos e intervalo de 30 segundos entre cada estímulo. Com um intervalo de 24 horas, os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 3 minutos, para avaliação da aquisição da memória, ou a uma sessão de extinção de 10 minutos e então à sessão de teste, para avaliação da extinção da memória. Além disso, imediatamente após a sessão de treino, foram administradas infusões intra-CA1 de salina (1 µg/µl), do antagonista (AM251, 100 pmol/µl) ou do agonista (ACEA, 0.01 fmol/µl) dos receptores CB1. Verificou-se que a presença de um co-específico na sessão de treino, extinção ou teste induziu uma diminuição significativa da resposta condicionada de medo – medida através da porcentagem do tempo de imobilidade do animal – em todos os grupos, todavia, mesmo com a expressão da evocação da memória inibida pelo suporte social, os animais foram capazes de aprender a memória de extinção. Ainda, observou-se uma diminuição da resposta condicionada nos animais que receberam tanto infusões de salina quanto do

antagonista, entretanto, o maior efeito foi observado nos animais que receberam infusões do agonista, onde a inibição da resposta foi intensificada, apresentando as menores porcentagens de imobilidade dentre todos os grupos. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a influência do suporte social sobre a aquisição e a extinção da memória de MCC sob modulação dos receptores CB1, evidenciando sua importância sobre a inibição da resposta condicionada de medo e facilitação do processo de extinção da memória, mesmo sem a expressão da evocação dessa durante o processo.

Palavras chave: suporte social, memória de medo condicionado ao contexto, receptores CB1.

ABSTRACT

Fear memories are the main responsible for the defensive behavior expressed in response to threats, however when manifested recurrently and out of context they may develop serious emotional problems, such as post-traumatic stress disorder (PTSD). These memories can be modulated by pharmacological manipulation in the endocannabinoid system and by interaction with other individuals of the same species in addition to methods such as extinction, clinically known as Exposure Therapy, which aims to inhibit the evocation of a previously acquired memory by overlapping a new one. Therefore, the purpose of this study is to demonstrate the effect of social support on the acquisition and extinction of contextual fear conditioning memory (CFC) under the modulation of subtype 1 cannabinoid receptors (CB1). For this, male adult Wistar rats, with bilaterally implanted cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus by stereotactic surgery were submitted alone or with the presence of a co-specific to 3 minutes of CFC task training, where they received 3 electrical stimuli of 0.5 mA for 2 seconds and 30 seconds interval between each stimulus. At a 24-hour interval, the animals underwent a 3-minute test session to assay memory acquisition, or a 10-minute extinction session and then the test session to assay memory extinction. Furthermore, immediately after the training session, intra-CA1 infusions of saline (1 μg / μl), the antagonist (AM251, 100 pmol / μl) or the agonist (ACEA, 0.01 fmol / μl) of CB1 receptors were administered. It was found that the presence of a co-specific in the training, extinction or test session induced a significant decrease in the conditioned fear response - measured by the percentage of the animal's immobility time - in all groups, yet even with the expression of memory evocation inhibited by social support, the animals were able to learn the extinction memory. Moreover, a decrease in the conditioned response was observed in the animals receiving both saline and the antagonist infusions, however the greatest effect was observed in the animals receiving agonist infusions, where the inhibition of the response was intensified, presenting the lowest percentages of immobility among all groups. The results obtained in the

present study demonstrate the influence of social support on the acquisition and extinction of CFC memory under modulation of CB1 receptors, evidencing its importance on the inhibition of conditioned fear response and facilitation of the memory extinction process, even without the expression of memory evocation along the process.

Keywords: social buffering, contextual fear conditioning memory, CB1 receptors.

SIGLAS E ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoil-glicerol

AEA: N-araquidonoil-etanolamina (anandamida)

CA1: sub-região hipocampal

CB1: do inglês: *cannabinoid receptor type 1*

CB2: do inglês: *cannabinoid receptor type 2*

CeMBE: Centro de Modelos Biológicos Experimentais

CEUA: Comissão de Ética para o Uso de Animais

CR: resposta condicionada. Do inglês *conditioned response*

CS: estímulo condicionado. Do inglês *conditioned stimulus*

DBCA: Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos

Ext PN: sessão de treino em par e de extinção em par com animal não treinado

Ext PS: sessão de treino em par e de extinção sozinho

Ext SN: sessão de treino sozinho e de extinção em par com animal não treinado

Ext SS: sessão de treino e de extinção sozinho

Ext: sessão de treino de extinção

FAAH: amida hidrolase de ácidos graxos. Do inglês: *Fatty acid amide hydrolase*

GPCR: receptores acoplados à proteína G. Do inglês: G protein-coupled receptors

I.P.: via intraperitoneal

IGG: Instituto de Geriatria e Gerontologia

LTM: memória de longa duração. Do inglês: *long-term memory*

MAGL: monoacilglicerol lipase. Do inglês: *Monoacylglycerol lipase*

N: não treinado

P: pares

P: sessão de treino em par

PN: sessão de treino em par e de teste em par com animal não treinado

PNN: sessão de treino em par e de extinção e de teste em par com animal não treinado

PNS: sessão de treino em par, de extinção em par com animal não treinado e de teste sozinho

PP: sessão de treino e de teste em par

PS: sessão de treino em par e de teste sozinho

PSacea: sessão de treino em par e de teste sozinho, infundido intra-CA1 ACEA

PSam: sessão de treino em par e de teste sozinho, infundido intra-CA1 AM 251

PSN: sessão de treino em par, de extinção sozinho e de teste em par com animal não treinado

PSS: sessão de treino em par e de extinção e de teste sozinho

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

S: sozinhos

SAL: salina

SN: sessão de treino sozinho e de teste em par com animal não treinado

SNN: sessão de treino sozinho e de extinção e de teste em par com animal não treinado

SNS: sessão de treino sozinho, de extinção em par com animal não treinado e de teste sozinho

SP: sessão de treino sozinho e de teste em par

SS: sessão de treino e de teste sozinho

SSN: sessão de treino e de extinção sozinho e de teste em par

SSS: sessão de treino, de extinção e de teste sozinhos

STM: memória de curta duração. Do inglês: *short-term memory*

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático. Do inglês: *Posttraumatic stress disorder*

THC: Δ^9 -tetra-hidrocanabidiol

Tr: sessão de treino

US: estímulo incondicionado. Do inglês: *unconditioned stimulus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas do Δ^9 -tetra-hidrocanabidiol e dos dois endocanabinóides.	24
Figura 2: Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando sombreado o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.	27
Figura 3: Fotos do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.	28
Figura 4: Desenho esquemático dos grupos do protocolo de consolidação do paradigma de Medo Condicionado ao Contexto.	31
Figura 5: Desenho esquemático dos grupos do protocolo de extinção do paradigma de Medo Condicionado ao Contexto.	32
Figura 6: Efeito do suporte social na aquisição da memória de medo condicionado ao contexto.....	35
Figura 7: Efeito do suporte social sobre a evocação da memória de medo condicionado ao contexto.....	37
Figura 8: Efeito do suporte social durante o aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto.....	39
Figura 9: Efeito do suporte social durante a aquisição da memória no aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto.....	41
Figura 10: Participação do receptor CB1 no suporte social e a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. Envelhecimento.....	16
2.2. Memória	16
2.3. Medo Condicionado ao Contexto e a Interação Social.....	18
2.4. Sistema Endocanabinóide.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MÉTODOS.....	27
4.1. Animais	27
4.2. Cirurgia estereotáxica	27
4.3. Manipulação dos animais.....	28
4.4. Intervenção farmacológica	29
4.5. Medo Condicionado ao Contexto	29
4.6. Protocolo do Paradigma de Medo Condicionado ao Contexto.....	30
4.6.1. Protocolo de consolidação	30
4.6.2. Protocolo de extinção	31
4.7. Controle histológico da região estudada	32
4.8. Análise estatística dos dados.....	33
4.9. Aspectos Éticos.....	33
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS E APÊNDICES	58
ANEXO A: Aprovação comissão científica IGG.....	59
ANEXO B: Aprovação CEUA	60
ANEXO C: Submissão na Neurobiology of Learning and Memory.....	61
APÊNDICE A: Artigo científico original.....	62

1. INTRODUÇÃO

As memórias de medo são essenciais para a sobrevivência e adaptação ao meio (KONDO et al., 2013; LEDOUX, 2014), entretanto, indivíduos que enfrentam alguma experiência traumática podem desenvolver sérios problemas emocionais, tais como, transtorno de estresse pós-traumático, pânico e fobias (KONDO et al., 2013; RABINAK et al., 2013), os quais podem acompanhar o indivíduo durante todo o envelhecimento (NATIONAL INSTITUTE ON AGING, 2011). Estudos apontam diferentes manifestações em transtornos entre adultos jovens e idosos, com maior incidência nos idosos. Por exemplo, em idosos é comum os transtornos estarem associados com sentimentos de desespero e desamparo, além de sintomas de retardo psicomotor e perda de peso, enquanto nos adultos mais jovens há relato de culpa e manifestações suicidas (EDELSTEIN; SEGAL, 2011). Há evidências de que as diferenças na forma como os idosos enfrentam os transtornos de ansiedade podem ser devido às mudanças fisiológicas do envelhecimento (AVERILL; BECK, 2000; EDELSTEIN; SEGAL, 2011).

Estudo recente mostrou que 44% e 42% da população de São Paulo e do Rio de Janeiro, respectivamente, apresentam algum distúrbio emocional após algum evento traumático (RIBEIRO et al., 2013). O distúrbio mais grave e o melhor estudado é o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), que se caracteriza pela aparição reiterada de um quadro de medo intenso generalizado que o sujeito associa com o evento traumático. Um tratamento muito utilizado para aliviar o TEPT é a terapia de exposição. Durante várias sessões, através de um processo de extinção, o indivíduo aprende a inibir a evocação da memória traumática, mas sem apagá-la (IZQUIERDO et al., 1965; RESCORLA, 2001, 2004).

O aprendizado associativo descrito por Pavlov é uma excelente ferramenta comportamental para estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação e extinção de memórias de medo (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). Durante o condicionamento Pavloviano um estímulo neutro (estímulo condicionado), é pareado com um estímulo biologicamente significativo (estímulo incondicionado).

Posteriormente, quando o estímulo condicionado é apresentado sozinho, desencadeia a expressão de uma resposta condicionada (JOHANSEN et al., 2011). A exposição repetida e/ou prolongada ao estímulo condicionado, sem o reforço (sem o estímulo incondicionado), leva a diminuição ou abolição da expressão da resposta condicionada, ou seja, à extinção da memória (FIORENZA et al., 2012).

Numerosos estudos com animais demonstraram que vários fatores podem influenciar a expressão da resposta condicionada, tais como, a manipulação farmacológica de receptores para os diferentes neurotransmissores envolvidos com o aprendizado e a memória (FIORENZA et al., 2012), a exposição a um ambiente novo (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; MYSKIW et al., 2014) e, a interação social entre seres da mesma espécie (co-específicos) (GARRIDO ZINN et al., 2016; GUZMÁN et al., 2009, 2014). O sistema endocanabinóide, através da ativação de seus receptores, age na modulação do controle das emoções e no comportamento social (MARCO et al., 2011). Ainda, o receptor CB1 participa da formação e extinção da memória de medo condicionado ao contexto e do aprendizado social (KUHNER; MEYER; KOCH, 2013; MARCO et al., 2011).

Sabe-se da influência do sistema endocanabinóide endógeno no controle das emoções e, da influência da interação social no comportamento aversivo, porém, ainda não é sabido de forma clara qual o mecanismo que a interação social é capaz de regular a resposta ao estresse. Levando em consideração que uma resposta frente a um estímulo aversivo pode levar ao desenvolvimento de desordens neuropsiquiátricas, este estudo visa investigar o efeito do suporte social durante a aquisição e/ou extinção da memória de medo condicionado ao contexto e a participação dos receptores CB1.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Envelhecimento

O envelhecimento humano é conceituado como um processo dinâmico e progressivo, no qual há modificações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas que determinam perda de capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, ocasionando maior vulnerabilidade e maior incidência de processos patológicos que terminam por levá-lo a morte (PAPALÉO NETTO, 2001).

O processo de envelhecimento pode ser caracterizado por uma diminuição progressiva da capacidade funcional, acarretando em limitações de ordem física, psicológica e social que afetam a qualidade de vida do indivíduo (SQUIRE; KANDEL, 2003).

Dentre as modificações biológicas que ocorrem no processo do envelhecimento, destaca-se o declínio das funções cognitivas, tais como aprendizagem, memória, atenção, raciocínio e solução de problemas (SQUIRE; KANDEL, 2003). Esses declínios podem ser decorrentes de diferentes fatores neurodegenerativos, tais como a atrofia cerebral, a perda de neurônios, a presença de emaranhados neurofibrilares e, da formação de corpos de Lewy, dentre outros. O envelhecimento cerebral, mesmo na ausência de doença, está relacionado com prejuízos nas funções cognitivas, incluindo a memória. Esses prejuízos estão vinculados, não a uma perda do número de neurônios, mas a mudanças sinápticas específicas e sutis em estruturas cerebrais envolvidas com a memória, como o hipocampo (MORRISON; RESSLER, 2014; MORRISON; BAXTER, 2012).

2.2. Memória

A memória é o processo pelo qual a informação recebida pelo indivíduo é armazenada (ALBERINI, 1999). Ela tem como funções trazer à tona fatos do passado e planejar o futuro (CRYSTAL; GEORGE WILSON, 2015).

As memórias são fundamentais para a sobrevivência e adaptação ao meio, como no comportamento, pensamentos, resoluções de problemas e tomadas de decisões. Além disso, são fundamentais para modular a personalidade humana, o caráter e as interações sociais (ALBERINI; LEDOUX, 2013).

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo em que permanecem armazenadas, sendo divididas em memórias de curta duração (STM; do inglês: *short-term memory*), de longa duração (LTM; do inglês: *long-term memory*) ou remotas (IZQUIERDO et al., 1998, 1999; STERN; ALBERINI, 2013). A STM é armazenada por alguns segundos ou minutos e dura de 3 a 6 horas (IZQUIERDO et al., 1999), enquanto na LTM o armazenamento pode durar dias, meses ou anos. Porém, quando perdura durante anos ou pela vida toda fala-se em memórias remotas (IZQUIERDO et al., 1999; STERN; ALBERINI, 2013). A diferença entre a STM e a LTM reside não em seu conteúdo, que pode ser o mesmo, mas nos mecanismos subjacentes a cada uma delas (IZQUIERDO et al., 1998, 1999).

A fase inicial da formação da memória é chamada de aquisição, na que o sujeito adquire novas informações através da exposição a um estímulo ou um conjunto de estímulos (uma experiência) (STERN; ALBERINI, 2013). O processo de armazenamento dessa informação recém-adquirida, é denominado de consolidação (BALDI; BUCHERELLI, 2014; FURINI et al., 2014; MCGAUGH, 1966). O processo de consolidação consiste em um conjunto complexo e altamente regulado de reações bioquímicas interdependentes que culminam em uma progressiva estabilização pós-aquisição das memórias de longa duração (DUDAI, 2004; IZQUIERDO, 2011). Entretanto, enquanto estão sendo consolidadas, as memórias encontram-se em um estado lábil e são sensíveis a interferências tanto farmacológicas como comportamentais (GLASER et al., 2010; MAH; ALBERT; JAMIESON, 1972; MCGAUGH, 1966, 2000; SEROTA, 1971).

Memórias já consolidadas podem tornar-se novamente lábeis e susceptíveis a interrupções quando evocadas (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; MILEKIC; ALBERINI, 2002; PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997), processo este, também conhecido como recordação ou lembrança (STERN; ALBERINI,

2013). Ainda, a evocação de uma memória pode ser inibida, processo este denominado de extinção (MONFILS et al., 2009; MYSKIW; IZQUIERDO; FURINI, 2014; PAVLOV, 1927a). Vale ressaltar que o processo de extinção não consiste na eliminação da memória, mas sim, na inibição da sua expressão (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014a; MONFILS et al., 2009; MYSKIW; IZQUIERDO; FURINI, 2014).

Assim como outras formas de aprendizado, a extinção pode ser modulada por vários neurotransmissores liberados por diversas vias específicas agindo sobre diferentes estruturas cerebrais, como o hipocampo, a amígdala basolateral e o córtex pré-frontal (FIORENZA et al., 2012), ou ainda, pode ser facilitada pela prévia exposição a um ambiente novo (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014b; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013).

Assim, acredita-se que a compreensão dos mecanismos subjacentes a extinção da memória de medo pode resultar em melhorias no tratamento de transtornos de ansiedade (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). O paradigma comportamental mais utilizado para estudar memória de medo e a extinção é o sistema de modelo de medo condicionado de Pavlov (MAROUN, 2013).

2.3. Medo Condicionado ao Contexto e a Interação Social

Um evento traumático pode ser definido como uma experiência que está ameaçando a si próprio ou uma pessoa próxima, acompanhada de medo intenso, horror, ou desamparo (AMERICAN PSYCHIATRIC PUBLISHING, 2013). O medo é considerado um estado consciente, que consiste em ambos os componentes associativos e não associativos, causados pela exposição às ameaças reais ou imaginárias (IZQUIERDO et al., 2016). É um estado fisiológico subjetivo causado por estímulos e respostas e tem um papel essencial na sobrevivência dos animais (KONDO et al., 2013; LEDOUX, 2014). Apesar da clara importância deste tipo de memória, a sua evocação recorrente e fora de contexto, pode desencadear o desenvolvimento de sérias desordens psiquiátricas (KONDO et al., 2013; MONFILS et al., 2009), como transtorno de estresse pós-traumático, síndrome do pânico e fobias, os quais afetam

severamente a vida dos pacientes (KONDO et al., 2013; RABINAK et al., 2013).

O transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) é uma condição comum, crônica e incapacitante após experiências traumáticas, distinta das estressoras do cotidiano, seus sintomas podem se desenvolver imediatamente ou anos após a exposição (KELMENDI et al., 2016). Estudos realizados em duas grandes cidades do Brasil apontam uma alta prevalência de problemas emocionais. Como mencionamos acima, em São Paulo a incidência é de 44% da população e, no Rio de Janeiro é de 42% (RIBEIRO et al., 2013). Há estimativas de que 5-10% da população geral sofra de TEPT e que populações expostas a traumas crônicos apresentam taxas ao longo da vida de 20-30% (MORRISON; RESSLER, 2014). Os números são preocupantes, e acredita-se que seja devido ao aumento da violência predominantemente urbana, pois vivenciar um evento extremamente estressante com potencial risco de morte, como por exemplo, estupro, assalto, violência física, acidente de carro ou desastres naturais, pode levar a formação de uma memória com grande valência negativa (ALMLI et al., 2014).

Um dos melhores modelos comportamentais mais utilizados para se estudar memórias de medo é o condicionamento Pavloviano ou condicionamento clássico (PAVLOV, 1927b). Neste, os animais aprendem a associação entre um estímulo neutro (estímulo condicionado - CS; do inglês *conditioned stimulus*), por exemplo, um contexto ou um som, e um estímulo biologicamente significativo (estímulo incondicionado - US; do inglês *unconditioned stimulus*), por exemplo, um choque nas patas ou uma luz forte. Posteriormente, quando o CS é apresentado sozinho é gerada uma resposta condicionada (CR, do inglês *conditioned response*) (AGREN, 2014; BALDI; BUCHERELLI, 2014; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

Watson e Rayner (1920) demonstraram o funcionamento do condicionamento clássico em humanos; o experimento ficou conhecido como o caso da criança Albert B ("Little Albert"). Em um primeiro momento foi apresentado um rato branco para a criança, a qual responde com curiosidade, estendendo a mão para alcançá-lo. Posteriormente o mesmo animal foi apresentado associado com um ruído alto (batida de um martelo sobre uma

barra de aço suspensa). Em um terceiro momento, quando o mesmo animal foi apresentado a criança, esta, apresentou respostas de medo, caracterizadas com gritos e a mesma arrastando-se para longe do animal.

Contextualizando a semântica de condicionamento Pavloviano, “Little Albert” havia aprendido que um estímulo inócuo condicional (CS; rato branco) previu a ocorrência de um estímulo nocivo incondicional (US; barulho) e, a aprendizagem foi manifestada como uma resposta condicionada (choro) (MAREN, 2001).

Em estudos utilizando exames de imagens em alta resolução de estruturas cerebrais em pacientes com estresse pós-traumático, pode-se observar uma redução no volume do hipocampo. Esta estrutura é essencial no controle das respostas de estresse, na memória declarativa e nos aspectos contextuais e, é conhecido como uma das regiões mais plásticas no cérebro (HEIM; NEMEROFF, 2009; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013). O hipocampo dorsal é uma estrutura essencial para a aquisição da memória do medo condicionado ao contexto (AHI; RADULOVIC; SPIESS, 2004; KIM; FANSELOW, 1992; RADULOVIC et al., 2000; FIORENZA et al., 2012) e tem sido utilizado na aprendizagem do reconhecimento social (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000).

Os contextos culturais experimentados em eventos da vida e os indivíduos os quais estão presentes nestes muitas vezes definem nossas experiências. Estas configurações sociais influenciam fortemente a forma como entendemos o mundo e nós mesmos (MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013). Na tarefa de medo condicionado ao contexto, em animais, seguido de interações sociais positivas ou negativas podem reduzir ou aumentar o medo condicionado, respectivamente (GUZMÁN et al., 2009, 2013, 2014).

O status emocional, incluindo as respostas de medo, pode ser modulado por uma presença social e pelas memórias sociais (BRUCHEY; JONES; MONFILS, 2010; EPLEY, 1974; VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012). Experiências emocionais, incluindo o estresse, podem afetar a formação da memória (VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012).

O termo memória social pode estar relacionado com o armazenamento de informações sobre as qualidades atribuídas a um indivíduo específico (como

os relacionados com a sua assinatura individual, status social ou gênero), permitindo a identificação deste em encontro subsequente dentro de uma janela de tempo relevante (VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012).

A memória social se refere a diferentes processos, como ao reconhecimento de outro indivíduo co-específico e, ao aprendizado social, o qual se refere a capacidade do animal de obter uma experiência relacionada com interação com outros sujeitos. (VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012; ZAJONC, 1965). Interação social se caracteriza por qualquer interação que haja entre dois indivíduos. Interações sociais com co-específicos são importantes, não só para a reprodução, mas também para lidar com os estresses do meio em que vivem (KIYOKAWA et al., 2004; LATANÉ, 1969).

O aprendizado social pode ocorrer de duas maneiras: através de aprendizagem vicária ou pelo suporte social. Os animais sofrem influências comportamentais de outros, como na alimentação, deambulação e capacidades cognitivas (LIPINA; RODER, 2013). Já foi identificado, em modelos animais, que a interação social pode interferir emocionalmente no processo de aprendizado (GUZMÁN et al., 2014; LIPINA; RODER, 2013; PANKSEPP, 2011) e, que a socialização é afetada pelo medo e ansiedade, sendo estas emoções adaptáveis para proteção de ameaças externas (LITVIN et al., 2013).

A aprendizagem vicária envolve a observação do comportamento quando há a presença de um expectador passivo. Alguns estudos demonstraram que o envolvimento de um paradigma comportamental mediado pelo medo, quando associado com a observação de um co-específico ausente da sensação temerosa, diminui a resposta condicionada (GUZMÁN et al., 2009, 2014; MINEKA; COOK, 1993; ZAJONC, 1965).

O termo suporte social envolve o comportamento do animal quando há a presença de um outro indivíduo realizando a mesma atividade (ZAJONC, 1965), este é o fator mais investigado nos humanos (HEINRICHS et al., 2003). Pesquisadores demonstraram que o suporte ajuda na resistência ao estresse em alta tensão, enquanto em baixas tensões há pouco efeito (WILCOX, 1981). Este é o chamado efeito de tamponamento de stress. Outros estudos, no

entanto, descobriram que o apoio social tem um efeito sobre bem-estar que é independente do nível de estresse (ANDREWS et al., 1978).

Estudos anteriores mostram que animais quando colocados na caixa de condicionamento juntos na extinção, a memória é facilitada pela presença de outro animal. Os animais testados em pares em dois dias consecutivos apresentaram redução da expressão da resposta condicionada (BRILL-MAOZ; MAROUN, 2016). No entanto, outros estudos sugerem que o medo pode ser passado por transmissão social, aumentando a resposta de medo do animal não treinado (CHEN; PANKSEPP; LAHVIS, 2009).

Ratos testados no medo condicionado ao contexto com parceiros que não haviam sofrido estresse prévio apresentavam redução na resposta ao estresse (KIYOKAWA et al., 2004). Somente pelo fato de terem sido testados juntos diminui o comportamento de medo (LATANÉ, 1969). Estudos sugerem que a familiaridade dos animais influencia na transmissão social do medo (JONES et al., 2014; KİYOKAWA; TAKEUCHI; MORI, 2007; KNAPSKA et al., 2010). Utilizando odores em caixa de condicionamento para redução da resposta do medo condicionado, odores de co-específicos familiares apresentaram-se mais efetivos do que não familiares no suporte social (KIYOKAWA et al., 2014).

As respostas de medo podem ser moduladas por uma presença social, podendo ser atenuada pela presença de uma companhia calma em uma variação de espécies, incluindo os seres humanos. Este efeito ocorre pelo desvio de atenção do medo para o sujeito que encontra-se presente (EPLEY, 1974). Interações sociais positivas e suporte social diminuem a ansiedade (EGLISTON; RAPEE, 2007), além de trazer efeitos benéficos na saúde e longevidade (HEINRICHS et al., 2003), enquanto as negativas, caracterizadas como interações que induzem estresse, são ansiogênicas (ULLMAN; FILIPAS, 2001). As desordens de ansiedade, como a TEPT, são exacerbadas pela falta de suporte social (BOSCARINO, 1995).

A interação social e as memórias aversivas podem ser moduladas por diferentes mediadores químicos, como ocitocina e vasopressina (GABOR et al., 2012), assim como por diferentes sistemas: glutamatérgico, histaminérgico,

noradrenérgico (FIORENZA et al., 2012) e endocanabinóide (MARCO et al., 2011).

De forma particular, o sistema endocanabinóide parece agir na modulação do controle das emoções e no comportamento social, através da ativação dos receptores CB1 e CB2 (MARCO et al., 2011). Além disso, a ativação dos receptores CB1 parece desempenhar um importante papel na interação social (MARCO et al., 2011) e na formação e extinção da memória de medo condicionamento ao contexto (KUHNERT; MEYER; KOCH, 2013).

2.4. Sistema Endocanabinóide

A descoberta do principal constituinte psicoativo da *Cannabis sativa*, Δ^9 -tetra-hidrocanabidiol (THC), ocorreu em 1964, levando a identificação de receptores para o mesmo, e a subsequente demonstração de um sistema endocanabinóide endógeno (CARVALHO; VAN BOCKSTAELE, 2012; KANO et al., 2009). O sistema endocanabinóide age através de um sistema de sinalização de lipídios do cérebro, que atuam na modulação da liberação de neurotransmissores (MORENA; CAMPOLONGO, 2014). Dois subtipos de receptores endocanabinóides foram identificados em mamíferos: os receptores CB1 (clonado em 1990 por MATSUDA et al.) e os CB2 (clonados em 1993 por MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR.). Os receptores CB1 não são homogeneamente distribuídos no cérebro, mas concentrados no hipocampo, amígdala, cerebelo, hipotálamo, substância nigra, vias dopaminérgicas mesolímbicas e áreas de associação do córtex cerebral. Os receptores CB2 estão presentes na micróglia – células do sistema imunológico (CASTANETO et al., 2014; CLARKE et al., 2008; KANO et al., 2009; RUBINO et al., 2008; VIVEROS; MARCO; FILE, 2005).

Os dois principais ligantes endógenos para os receptores CB1 e CB2 são a N-araquidonoil-etanolamina (anandamida; AEA) e o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (MORENA; CAMPOLONGO, 2014). A AEA atua como um agonista parcial dos receptores CB1 e CB2, enquanto o 2-AG é um agonista total destes receptores (STELLA; SCHWEITZER; PIOMELLI, 1997).

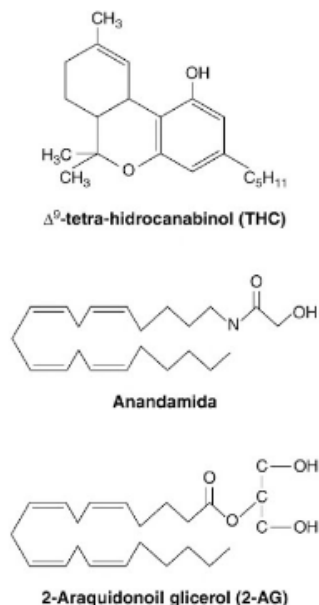


Figura 1: Estruturas do Δ^9 -tetra-hidrocanabinol e dos dois endocanabinóides.

(RANG et al., 2011)

O receptor CB1 encontra-se predominantemente no terminal pré-sináptico e a sua função parece ser a de modular a liberação de neurotransmissores como dopamina, serotonina, glutamato e noradrenalina na fenda sináptica (ISHAC et al., 1996; KATHMANN et al., 1999; SHEN et al., 1996; SZABO; MÜLLER; KOCH, 1999).

A modulação destes efeitos ocorre com a liberação de neurotransmissores através da ativação dos receptores endocanabinóides (MARCO et al., 2011), ativando canais iônicos e proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPKS) (BOUABLOULA et al., 1995; MORENA; CAMPOLONGO, 2014). Após a ativação do receptor, AEA e 2-AG são desativados por um processo de absorção ainda mal definido, envolvendo mecanismo transportador e, posteriormente, são metabolizados por suas enzimas de degradação amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL) (KANO et al., 2009; MORENA; CAMPOLONGO, 2014).

Os receptores CB1 representam a classe mais abundante de receptores acoplados à proteína G (GPCR) do Sistema Nervoso Central, e também estão presentes em uma variedade de tecidos periféricos. As proteínas Gi/ Go inibem a atividade da enzima adenilato ciclase com consequente fechamento dos canais de cálcio, abertura dos canais de potássio e estimulação das proteínas

quinases (MORENA; CAMPOLONGO, 2014). Os efeitos do THC na cognição, como na memória, e no humor são mediante a habilidade de ligação do agonista com o GPCR (HILLARD, 2014).

Estudos experimentais em ratos, sugerem que a ativação do sistema endocanabinóide participa na consolidação (MAĆKOWIAK et al., 2009, p. 1; VIVEROS; MARCO; FILE, 2005), e na extinção da memória (VIVEROS; MARCO; FILE, 2005). Entretanto, sua função é diferente dependendo do local de ação, como regiões e sistemas cerebrais envolvidos (IKEDA et al., 2015). Por exemplo, a infusão de um agonista seletivo dos receptores CB1 antes da sessão de treino na tarefa de medo condicionado ao som prejudica a consolidação, mas não modifica o comportamento de imobilidade do animal (*freezing*) provocado por um CS de apresentação de um som (PAMPLONA; TAKAHASHI, 2006). Entretanto, outros estudos, em modelos *knockout*, mostram que agonistas dos receptores endocanabinóides CB1 não modificam a memória de medo (MARSICANO et al., 2002).

O potencial terapêutico na modulação do endocanabinóide tem expressado efeito nos receptores CB1 em regiões importantes para ansiedade e para aprendizagem emocional, incluindo amígdala, hipocampo e o sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico (CHHATWAL et al., 2005).

O THC, responsável pelos efeitos psicoativos, é utilizado com propósitos recreativos e explorado por suas propriedades eufóricas e sedativas. No entanto, como efeitos adversos são comuns de serem reportados ansiedade, pânico e depressão. Tem sido demonstrada em estudos a relação entre sérias doenças mentais e o THC, como esquizofrenia, bipolaridade e depressão, apesar de não se saber de maneira clara como ocorre esta facilitação (CARVALHO; VAN BOCKSTAELE, 2012). Além disso, nas últimas décadas foi descoberto o envolvimento do sistema endocanabinóide no controle das emoções e no comportamento social. Tal descoberta foi através de maiores níveis de ligantes endocanabinóides endógenos em ratos que exploravam um animal desconhecido no contexto aversivo, mostrando também, que estes tendiam a explorar menos extensivamente o contexto. Esta descoberta é importante para compreender no enfrentamento de respostas a novos contextos sociais (MARCO et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do suporte social durante a aquisição e/ou extinção da memória de medo condicionado ao contexto e a participação dos receptores CB1.

3.2. Objetivos específicos

Verificar o efeito do suporte social durante a aquisição da memória de medo condicionado ao contexto.

Verificar o efeito do suporte social sobre a evocação da memória de medo condicionado ao contexto.

Verificar o efeito do suporte social durante o aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

Investigar a participação do receptor CB1 no suporte social e a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto.

4. MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos CrlCembe: *Wistar* machos adultos com três meses de idade (300 – 330 gramas) provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS. Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Memória, prédio 64 da PUCRS, em caixas moradia, forradas com maravalha, com capacidade para 4 animais. Os animais foram mantidos num ciclo claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), com água e comida à vontade, à uma temperatura ambiente constante de 23°C.

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 1,0 mm acima na região CA1 do hipocampo dorsal (Anterior -4,2 mm; Lateral \pm 3,0 mm; Ventral -1,8 mm), segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1986) (Fig. 3).

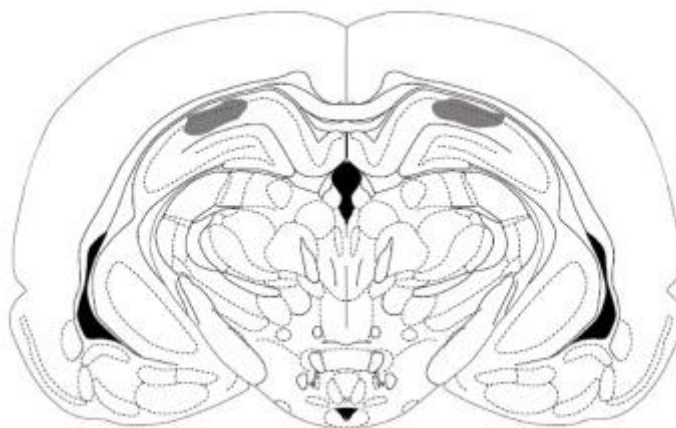


Figura 2: Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando sombreado o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.

(FIORENZA et al., 2012)

Todos os procedimentos foram realizados com os animais previamente anestesiados com Ketamina (75 mg/Kg) juntamente com Xilazina (10 mg/Kg), ambos administrados via intraperitoneal (i.p.). Como cuidado pós-cirúrgico os animais receberam Meloxicam 0,2% (24 horas e 48 horas após a cirurgia) administrado por via subcutânea, na dose de 2 mg/Kg.



Figura 3: Fotos do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do equipamento estereotáxico.

4.3. Manipulação dos animais

Nos sete dias que antecedem os experimentos comportamentais, e pelo menos 5 dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a sessões diárias de manipulação, com o objetivo de acostumá-los a serem manejados, e com isso se familiarizarem com o pesquisador, evitando o eventual estresse causado por ele durante o experimento. Logo, durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde foi realizada a tarefa comportamental, retirados da caixa-moradia e manuseados durante 2 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação, os animais foram submetidos ao paradigma de medo condicionado ao contexto.

4.4. Intervenção farmacológica

As drogas e as doses utilizadas foram: ACEA (Arachidonyl-2'-chloroethylamide hydrate; 0,01 fmol/ μ l), agonista seletivo dos receptores CB1 e; AM 251 (*N*-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide; 100 pmol/ μ l), antagonista seletivo dos receptores CB1. As doses utilizadas foram escolhidas com base em pesquisas anteriores de nosso grupo (CLARKE et al., 2008). As drogas foram adquiridas das empresas Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) e Tocris Bioscience (Bristol, UK) e, dissolvidos em solução salina 0,9% e mantidos em alíquotas a uma temperatura de -20°C.

Para o tratamento farmacológico foi utilizado uma micro-seringa Hamilton acoplada a um tubo de polietileno contendo em sua extremidade uma agulha de infusão de 0,05 mm de diâmetro. Os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (1 μ l/lado) com solução salina (salina 0,9%) ou droga. Ao término das microinfusões, as agulhas eram mantidas no interior das cânulas-guia por 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido.

4.5. Medo Condicionado ao Contexto

O aparato utilizado para a realização da tarefa de Medo Condicionado ao Contexto consiste de uma caixa (50 x 25 x 58 cm) formada por paredes laterais de acrílico preto e uma porta frontal em acrílico transparente (Albarsch, Porto Alegre, Brasil). O assoalho da caixa é constituído por barras metálicas que são capazes de conduzir corrente elétrica. Na parte superior da caixa há uma câmera GoPro® Hero3 acoplada, a qual realiza registro de todas as sessões realizadas. A caixa foi higienizada com uma solução de álcool 70% entre a passagem de cada animal.

4.6. Protocolo do Paradigma de Medo Condicionado ao Contexto

4.6.1. Protocolo de consolidação

No dia 1 (sessão de treino; Tr), os animais foram colocados sozinhos (S) ou em pares (P) na caixa de condicionamento e, após um período de 120 s, foram apresentados 3 estímulos elétricos (0.5 mA, 2 s) em intervalos de 30 s cada. Os animais foram recolocados na caixa moradia 30 s após o último estímulo elétrico. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento, sozinhos ou em pares, para uma sessão de teste de retenção (Teste) de 180 s, sem estímulo elétrico. Mediu-se o tempo total de imobilidade (*freezing*) como resposta condicionada durante os primeiros 120 s da sessão de treino e durante toda a sessão de teste (BRILL-MAOZ; MAROUN, 2016; FIORENZA et al., 2012; LEE; NOH, 2016). Todos os animais submetidos as sessões de treino e/ou teste em pares eram provenientes da mesma caixa moradia, baseado no conceito de familiaridade, evitando comportamento agressivo encontrado em estudos anteriores (ALBERTS; GALEF, 1973; WONGWITDECHA; MARSDEN, 1996).

Para a sessão de teste, além dos grupos S e P, foi incluído o grupo N (não treinado), formado por animais que não foram submetidos a sessão de treino da tarefa de medo condicionado ao contexto, ou seja, não receberam o estímulo elétrico.

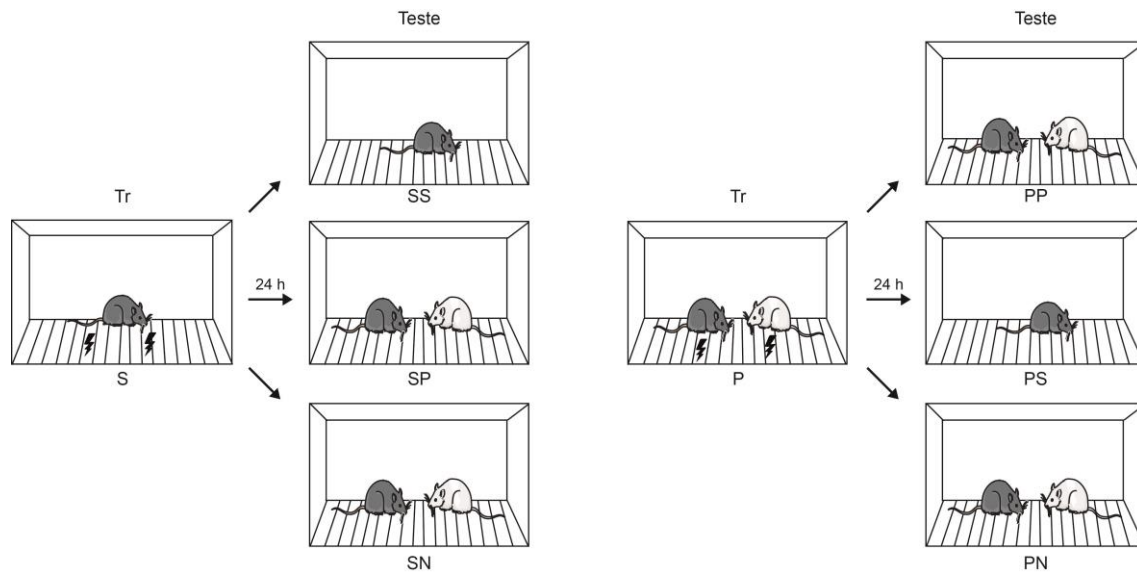


Figura 4: Desenho esquemático dos grupos do protocolo de consolidação do paradigma de Medo Condicionado ao Contexto. Legenda: S: sozinho, P: par, N: não treinado.

4.6.2. Protocolo de extinção

No dia 1 (sessão de treino; Tr), os animais foram colocados sozinhos (S) ou em pares (P) na caixa de condicionamento e, após um período de 120 s, foram apresentados 3 estímulos elétricos (0.5 mA, 2 s) em intervalos de 30 s cada. Os animais foram recolocados na caixa moradia 30 s após o último estímulo elétrico. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento, sozinhos ou em pares para uma sessão de treino da extinção (Ext) de 20 min, sem estímulo elétrico. Após 24 horas (dia 3), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento, sozinhos ou em pares para uma sessão de teste da extinção (Teste), de 180 s, sem o estímulo elétrico. Mediu-se o tempo total de imobilidade (*freezing*) como resposta condicionada durante os primeiros 120 s da sessão de treino e durante toda a Ext e Teste (BRILL-MAOZ; MAROUN, 2016; FIORENZA et al., 2012; LEE; NOH, 2016). Todos os animais que foram submetidos as sessões de treino, extinção e/ou teste em pares eram provenientes da mesma caixa moradia, baseado no conceito de familiaridade, evitando comportamento agressivo encontrado em estudos anteriores (ALBERTS; GALEF, 1973; WONGWITDECHA; MARSDEN, 1996).

Para as sessões de extinção e de teste da extinção, os animais que estavam em pares eram formados por grupo N (não treinado), formado por animais que não foram submetidos a sessão de treino da tarefa de medo condicionado ao contexto, ou seja, não receberam o estímulo elétrico.

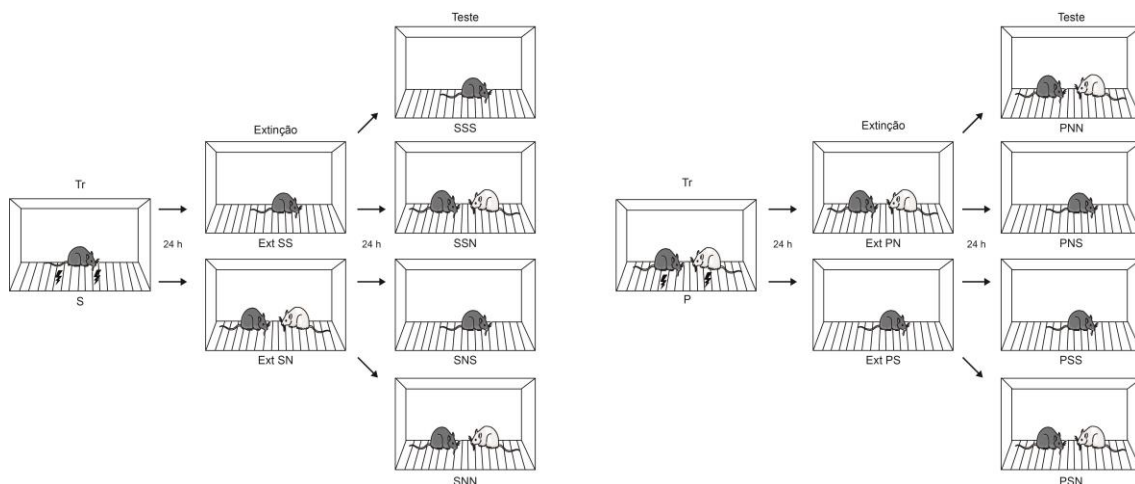


Figura 5: Desenho esquemático dos grupos do protocolo de extinção do paradigma de Medo Condicionado ao Contexto. Legenda: S: sozinho, P: par, N: não treinado.

4.7. Controle histológico da região estudada

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais previamente operados, foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas e a região cerebral atingida pela infusão, visando assim garantir que apenas os dados comportamentais dos animais que efetivamente receberam a administração correta das drogas foram incluídos na análise estatística final. Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à infusão bilateral intra-CA1 de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas guia; quinze minutos depois foram eutanasiados com overdose de Barbiturico (Tiopental Sódico, 100 mg/kg, via i.p.) conforme as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA e então decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, quando então se procedera a análise

histológica, considerando somente os animais com a localização das cânulas dentro de 2 mm² dos locais desejados.

4.8. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos na tarefa de medo condicionado ao contexto foram convertidos em porcentagem do tempo total de imobilidade (*freezing*), expressos como média \pm erro padrão e analisados usando análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) seguido do teste de *Newman-Keuls*. Para todos os dados, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software Graph-Pad Prisma 7.02*.

4.9. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Geriatria e Gerontologia (IGG; ANEXO A) e, posteriormente, pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número de registro CEUA 15/00474 (ANEXO B).

Todos os procedimentos foram realizados com o máximo de cuidado para evitar o desconforto e o sofrimento dos animais, conforme a Lei nº 11.794, de 2008, incluso na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), de 2013.

5. RESULTADOS

Com o objetivo de verificar o efeito do suporte social na aquisição da memória de medo condicionado ao contexto, os animais foram submetidos a uma sessão de treino (Tr) sozinhos (S) ou em pares (P) e, após 24 h foram submetidos a uma sessão de teste de retenção (Teste).

Como pode ser observado na Figura 6, no Teste, tanto os animais que estavam S quanto os que estavam em P, expressaram maior porcentagem de imobilidade quando comparados com a sessão de Tr. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(3;44)}=60,36$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferenças significativas entre os grupos S vs. SS $p<0,0001$ e P vs. PP $p<0,001$, indicando que os animais aprenderam a tarefa. Entretanto, os animais que passaram pelas sessões de Tr e teste em P expressaram uma porcentagem de imobilidade significativamente menor na sessão de teste quando comparados com os animais que passaram pelas duas sessões S. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(3;44)}=60,36$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos SS vs. PP $p<0,0001$. Estes dados indicam que o suporte social é capaz de diminuir a expressão da resposta condicionada na sessão de teste de retenção da memória de medo condicionado ao contexto.

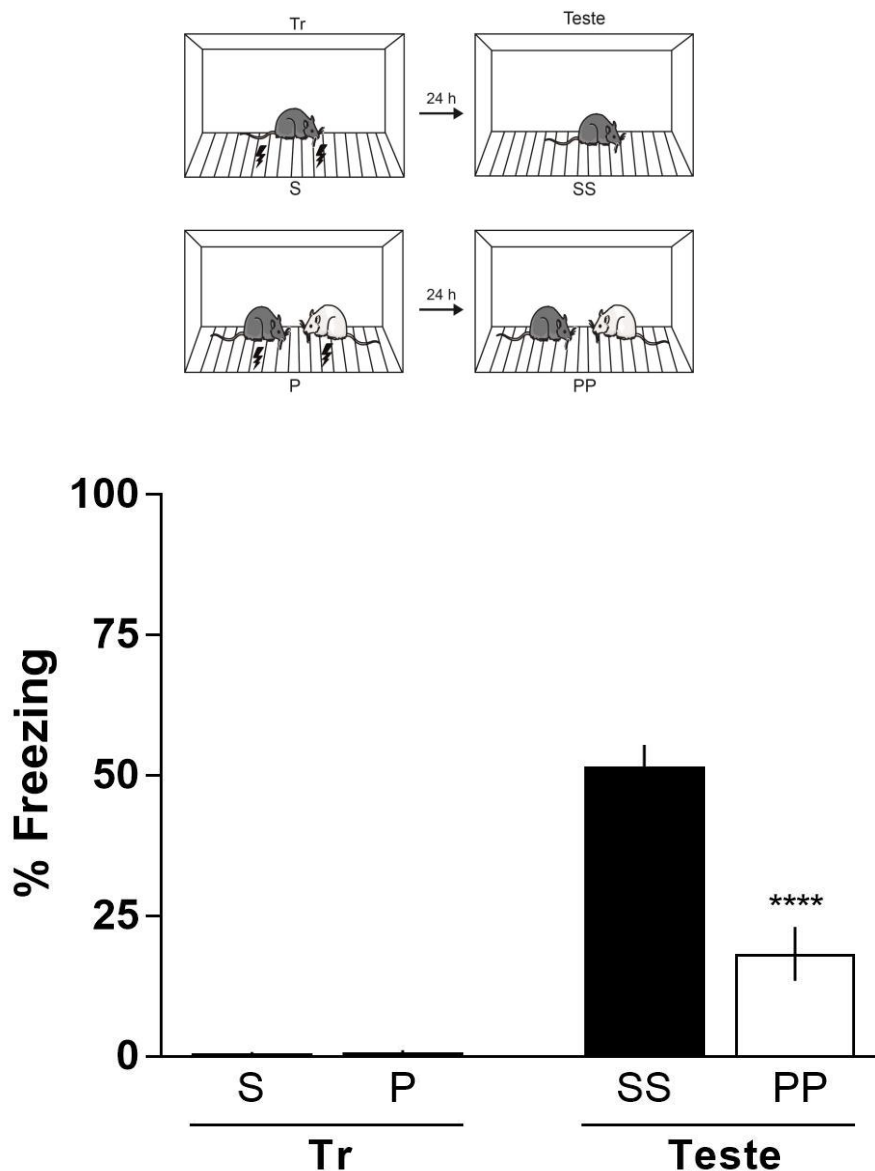


Figura 6: Efeito do suporte social na aquisição da memória de medo condicionado ao contexto. Animais foram submetidos a tarefa de medo condicionado ao contexto (Tr) sozinhos (S) ou em pares (P) e, 24 h depois foram submetidos a um teste de retenção (Teste) sozinhos (SS) ou em pares (PP). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. ANOVA de uma via seguido de Teste de Newman-Keuls **** $p < 0,0001$ SS vs. PP. $n = 12$ animais por grupo. O protocolo utilizado e os grupos experimentais estão representados na ilustração acima.

Com o objetivo de investigar o efeito do suporte social sobre a evocação da memória de medo condicionado ao contexto, os animais foram submetidos a uma sessão de treino (Tr), sozinhos (S) ou em pares (P) e, após 24 h foram submetidos a uma sessão de teste de retenção (Teste). Para a sessão de teste os animais foram divididos randomicamente em 6 grupos: SS (Tr S e teste S),

SP (Tr S e teste P), SN (Tr S e teste N), PP (Tr P e teste P), PS (Tr P e teste S) e PN (Tr P e teste N).

Como pode ser observado na Figura 7, os animais que passaram pela sessão de Tr S ou em P expressaram uma porcentagem de imobilidade significativamente maior na sessão de teste quando comparado com a sessão de Tr. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(7;130)}=56,93$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos S vs. SS $p<0,001$, S vs. SP $p<0,001$, S vs. SN $p<0,001$, P vs. PP $p<0,001$, P vs. PS $p<0,001$ e P vs. PN $p<0,001$, indicando que os animais adquiriram a memória de medo condicionado ao contexto. Ainda, todos os animais que foram submetidos a sessão de Tr em P, na sessão de teste expressaram uma porcentagem de imobilidade significativamente menor quando comparados com os animais que estavam S nas sessões de Tr e teste, assim como, os animais que foram Tr S e submetidos a sessão de teste em P. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(7;130)}=56,93$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos SS vs. SP $p<0,001$, SS vs. SN $p<0,001$, SS vs. PP $p<0,0001$, SS vs. PS $p<0,001$ e SS vs. PN $p<0,001$). Estes resultados indicam que o suporte social é capaz de diminuir a expressão da resposta condicionada na evocação da memória de medo condicionado ao contexto.

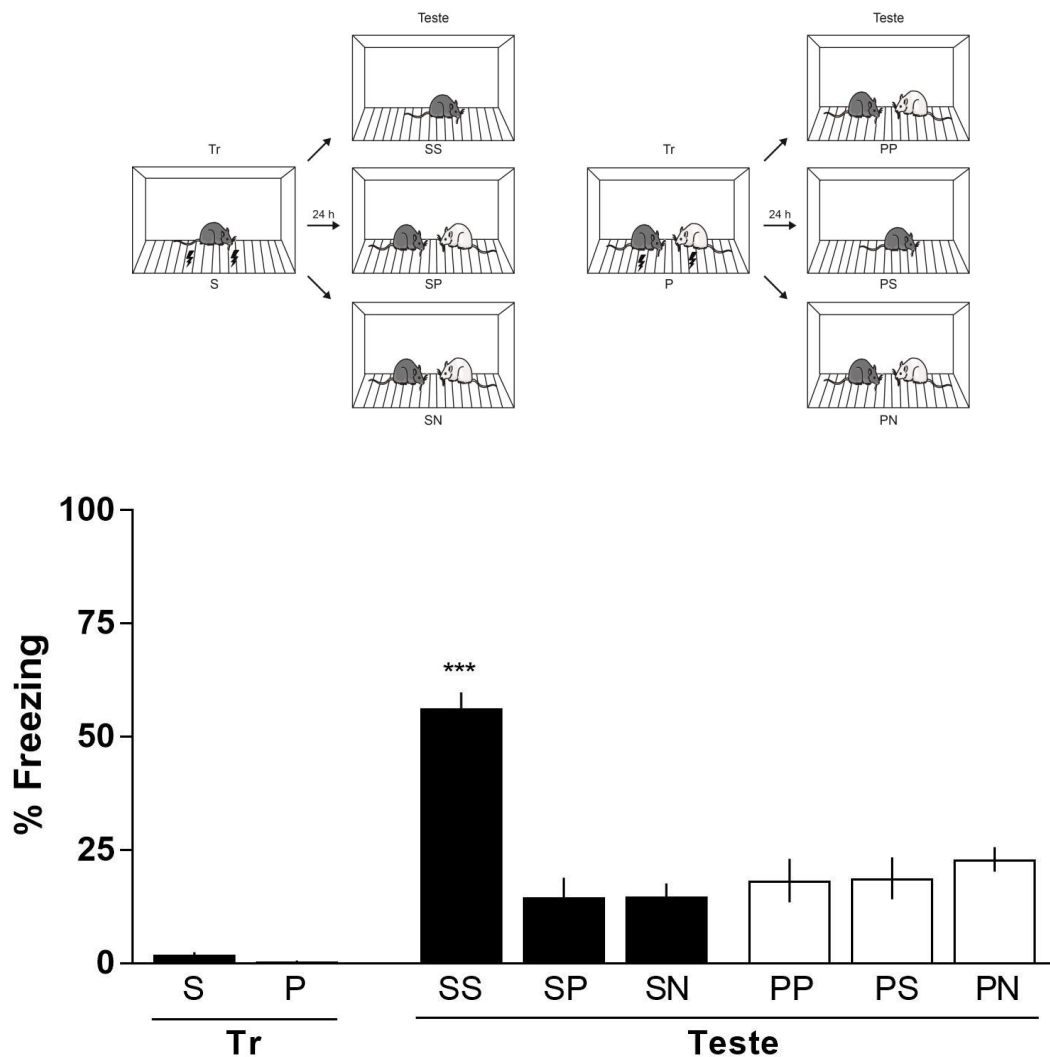


Figura 7: Efeito do suporte social sobre a evocação da memória de medo condicionado ao contexto. Animais foram submetidos a tarefa de medo condicionado ao contexto (Tr), sozinhos (S) ou em pares (P) e, 24 h depois foram submetidos a um teste de retenção. Para a sessão de teste os animais foram divididos randomicamente em 6 grupos: SS (Tr S e teste S), SP (Tr S e teste P), SN (Tr S e teste N), PP (Tr P e teste P), PS (Tr P e teste S) e PN (Tr P e teste N). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. ANOVA de uma via seguido de Teste de Newman-Keuls *** $p < 0,001$ SS vs. SP; *** $p < 0,001$ SS vs. SN; *** $p < 0,001$ SS vs. PP; *** $p < 0,001$ SS vs. PS; *** $p < 0,001$ SS vs. PN. $n = 9-12$ animais por grupo. O protocolo utilizado e os grupos experimentais estão representados na ilustração acima. Legenda: S – sozinho, P – par, N – não treinado.

Com o objetivo de verificar o efeito do suporte social durante o aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto, os animais foram submetidos a uma sessão de treino (Tr) sozinhos (S) e, após 24 h foram submetidos a uma sessão de treino da extinção (Ext), sozinhos (SS; Tr S e Ext S) ou em pares (SN; Tr S e Ext N) e, posteriormente, os animais foram

divididos randomicamente em 4 grupos: SSS (Tr S, Ext S e teste S), SSN (Tr S, Ext S e teste N), SNS (Tr S, Ext N e teste S), SNN (Tr S, Ext N e teste N).

Na Figura 8, observando os primeiros 3 min da sessão de Ext SS nota-se que os animais expressaram um aumento significativo da porcentagem de imobilidade, quando comparado com a sessão de Tr. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(10;179)}=28,39$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos S vs. Ext SS $p<0,001$. Indicando que os animais foram capazes de aprender a tarefa. Entretanto, observando os primeiros 3 minutos da sessão de Ext SN, os animais não expressaram o mesmo comportamento de imobilidade quando comparado com os animais SS da sessão de Ext. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(10;179)}=28,39$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos Ext SS vs. Ext SN $p<0,001$. Ainda, pode-se notar uma diminuição significativa da porcentagem de imobilidade comparando os primeiros 3 min e os últimos 3 min da sessão de Ext SS. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(10;179)}=28,39$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos Ext SS₀₋₃ vs. Ext SS₇₋₁₀ $p<0,01$. Com esses dados pode-se observar o aprendizado da tarefa de extinção dentro do tempo da sessão.

Continuando na Figura 8, observando a sessão de teste (SSS e SSN) dos animais os quais passaram pela sessão de Ext SS percebe-se uma diminuição da porcentagem de imobilidade quando comparado com os primeiros 3 min da sessão de Ext SS. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(10;179)}=28,39$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos Ext SS₀₋₃ vs. SSS $p<0,001$, Ext SS₀₋₃ vs. SSN $p<0,001$. Assim também ocorreu com os animais que foram expostos a sessão de Ext SN, observando os animais na sessão de teste (SNS e SNN) e comparando-os com os primeiros 3 min da sessão de Ext SS. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(10;179)}=28,39$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos Ext SS₀₋₃ vs. SNS $p<0,001$, Ext SS₀₋₃ vs. SNN $p<0,001$. Esses dados indicam que os animais mesmo não expressando comportamento de evocação da memória,

são capazes de aprender a memória de extinção do medo condicionado ao contexto.

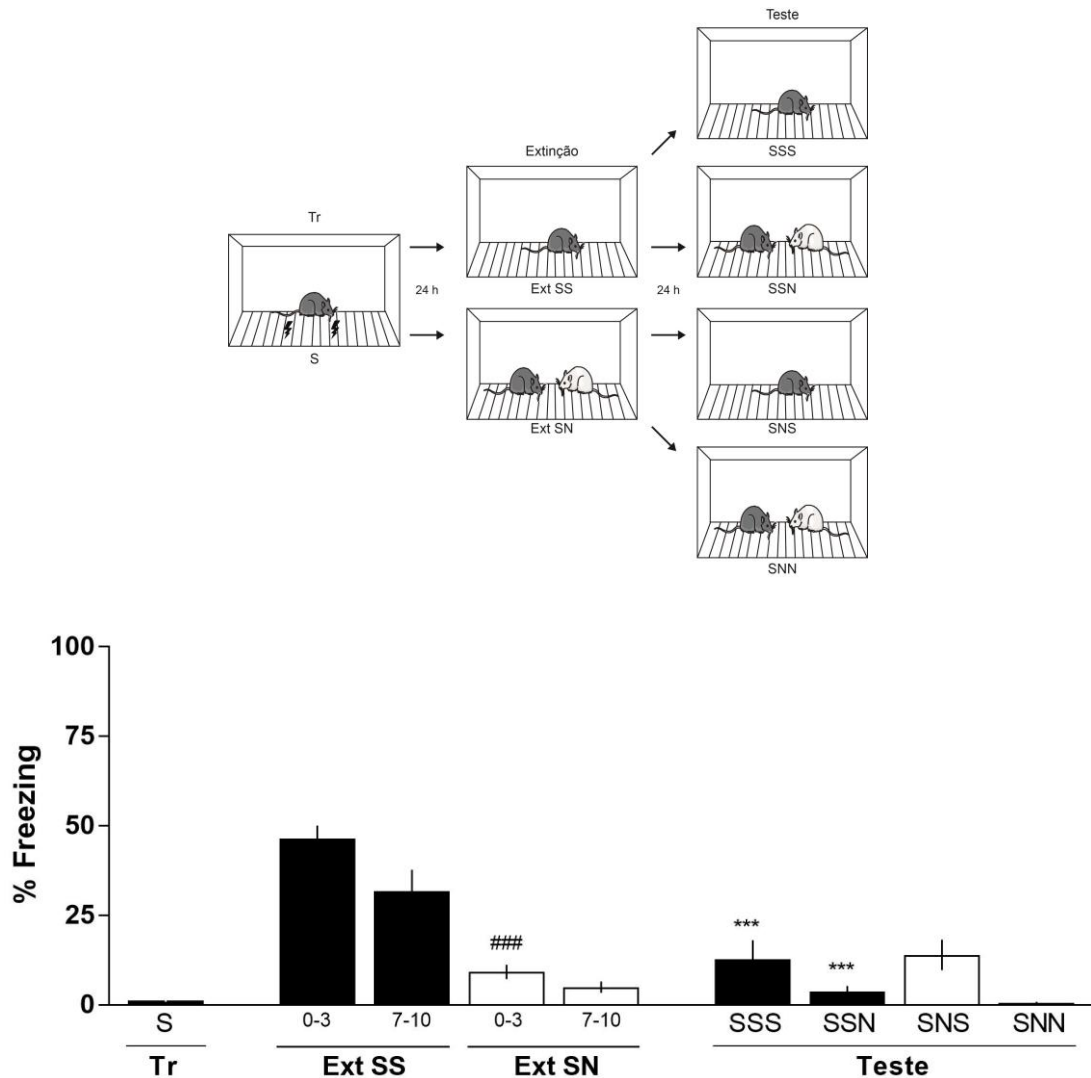


Figura 8: Efeito do suporte social durante o aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Animais foram submetidos a tarefa de medo condicionado ao contexto (Tr), sozinhos (S) e, a uma sessão de Ext, sozinhos (SS) ou em pares (SN). Posteriormente, os animais foram divididos randomicamente em 4 grupos: SSS (Tr S, Ext S e teste S), SSN (Tr S, Ext S e teste N), SNS (Tr S, Ext N e teste S) e SNN (Tr S, Ext N e teste N) e, submetidos a uma sessão de teste de retenção. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de freezing. ANOVA de uma via seguido de Teste de Newman-Keuls ### $p < 0,001$ Ext SS vs. Ext SN, *** $p < 0,001$ Ext SS vs. SSS, *** $p < 0,001$ Ext SS vs. SSN. $n = 6-10$ animais por grupo. O protocolo utilizado e os grupos experimentais estão representados na ilustração acima da figura. Legenda: S – sozinho, N – não treinado.

Ainda com o objetivo de verificar o efeito do suporte social durante o aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto: os

animais foram submetidos à sessão de treino (Tr) sozinhos (S) ou em pares (P) e, após 24h os animais foram randomicamente divididos em grupos e submetidos à sessão de treino de extinção (Ext) sozinhos (SS; Tr S e Ext S; ou PS; Tr P e Ext S) ou em pares (PN; Tr P e Ext N) e, 24h após os animais foram randomicamente divididos em 5 grupos e submetidos a sessão de teste da extinção (Teste): SSS (Tr S, Ext S e Teste S), PNN (Tr P, Ext N e Teste N), PNS (Tr P, Ext N e Teste S), PSS (Tr P, Ext S e Teste S) e PSN (Tr P, Ext S e Teste N).

Na Figura 9, observando os primeiros 3 min da sessão de Ext SS nota-se que os animais expressaram um aumento significativo da porcentagem de imobilidade, quando comparado com a sessão de Tr. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(15;261)}=21,16$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos S vs. Ext SS $p<0,001$. Indicando que os animais foram capazes de aprender a tarefa. Entretanto, observando os primeiros 3 minutos da sessão de Ext PN e Ext PS, os animais não expressaram o mesmo comportamento de imobilidade quando comparado com os animais SS da sessão de Ext. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(15;261)}=21,16$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos Ext SS vs. Ext PN $p<0,01$, Ext SS vs. Ext PS $p<0,001$.

Permanecendo na Figura 9, observando a sessão de teste dos animais os quais passaram pela sessão de Ext SS (SSS), pela sessão de Ext PN (PNN e PNS) e pela sessão de Ext PS (PSS e PSN), apresentaram diminuição significativa na porcentagem de imobilidade no teste, quando comparados com os 3 primeiros minutos da sessão de Ext SS. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(15;261)}=21,16$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferença significativa entre os grupos Ext. SS vs. SSS $p<0,001$, Ext. SS vs. PNN $p<0,001$, Ext. SS vs. PNS $p<0,001$, Ext. SS vs. PSS $p<0,001$, Ext. SS vs. PSN $p<0,001$. Indicando que os animais foram capazes de aprender a tarefa. Estes dados indicam que a aquisição da memória de medo condicionado ao contexto com suporte social modula a extinção da memória.

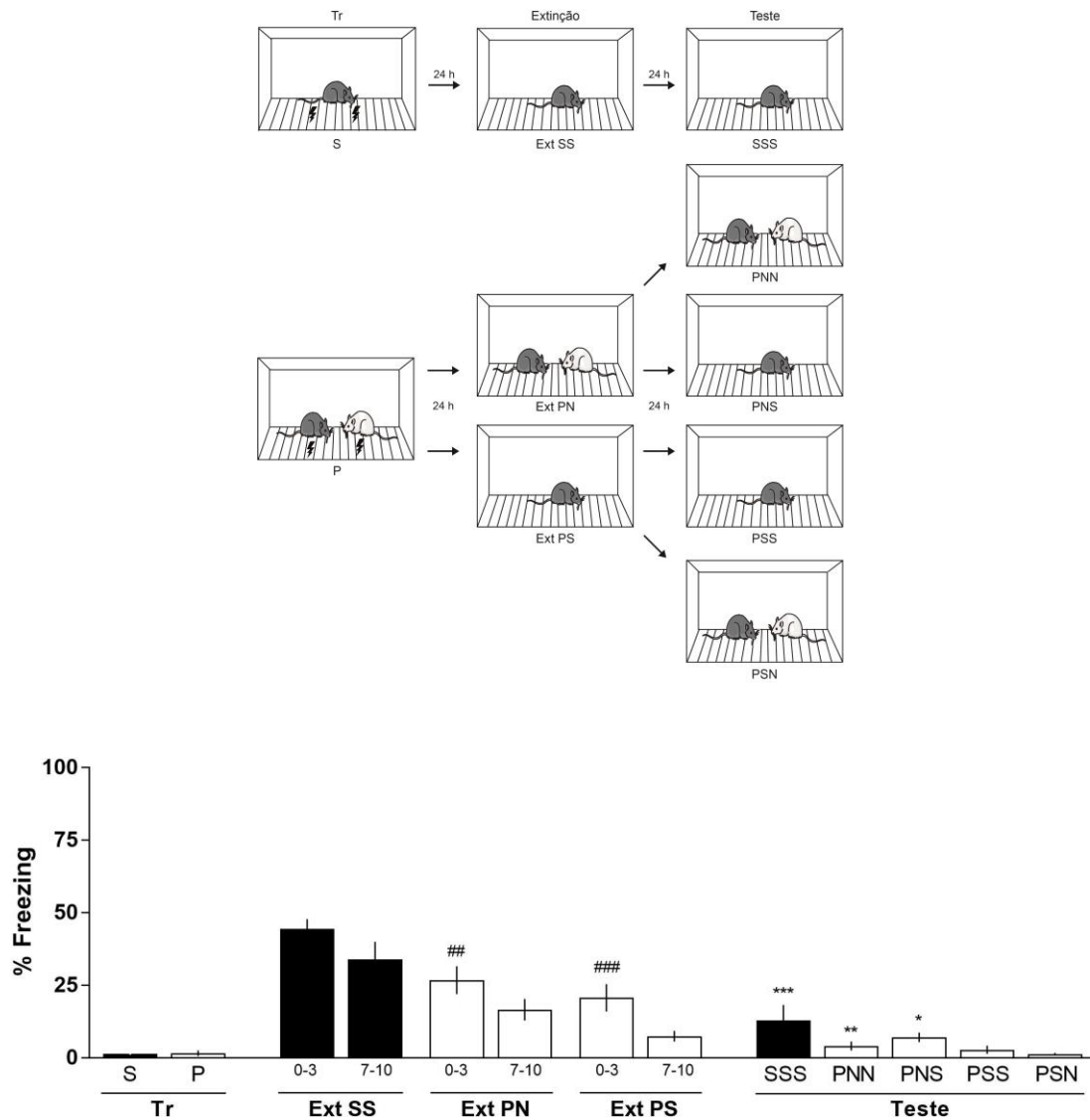


Figura 9: Efeito do suporte social durante a aquisição da memória no aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto. Animais foram submetidos a tarefa de medo condicionado ao contexto (Tr), sozinhos (S) ou em pares (P) e, a uma sessão de Ext, sozinhos (SS ou PS) ou em pares (SN). Posteriormente, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos: SSS (Tr S, Ext S e teste S), PNN (Tr P, Ext N e teste N), PNS (Tr P, Ext N e teste S), PSS (Tr P, Ext S e teste S), PSN (Tr P, Ext S e teste N) e, submetidos a uma sessão de teste de retenção. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de freezing. ANOVA de uma via seguido de Teste de Newman-Keuls ## $p < 0,01$ Ext SS vs. Ext PN, ### $p < 0,001$ Ext SS vs. Ext PS, *** $p < 0,001$ Ext SS vs. SSS, ** $p < 0,01$ Ext PN vs. PNN, * $p < 0,05$ Ext PN vs. PNS. $n = 8-10$ animais por grupo. O protocolo utilizado e os grupos experimentais estão representados na ilustração acima da figura. Legenda: S – sozinho, P – par, N – não treinado.

Com o objetivo de investigar a participação do receptor CB1 no suporte social e a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto, os

animais foram submetidos a uma sessão de treino (Tr) sozinhos (S) ou em pares (P), imediatamente depois, foram infundidos bilateralmente, na região CA1 do hipocampo dorsal (1 μ l/lado) com SAL (salina 0,9%; PSsal), ACEA (PSacea) ou AM251 (PSam). Após 24 h os animais foram submetidos a uma sessão de teste de retenção (Teste) sozinhos.

Pode-se observar na Figura 10 que, na sessão de teste, os animais treinados em P que receberam SAL e AM251 apresentaram porcentagens de imobilidade semelhantes, estes, apresentam diferença significativa em comparação com os animais os quais passaram pela sessão de Tr e Teste sozinhos (SS). A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(5;75)}=59,94$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferenças significativas entre os grupos SS vs. PSsal $p<0,0001$, SS vs. PSam $p<0,0001$. Entretanto, os animais os quais foram treinados em P e receberam ACEA apresentaram baixa porcentagem de imobilidade em comparação com os grupos SAL e SS. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($F_{(5;75)}=59,94$) e o teste de Newman-Keuls indicou diferenças significativas entre os grupos SS vs. PSacea $p<0,0001$, PSsal vs. PSacea $p<0,0001$. Além disso, os animais que receberam ACEA não apresentaram diferença significativa na porcentagem de imobilidade em comparação com a sessão de Tr. Estes dados indicam que os receptores CB1 participam na aquisição da memória de medo condicionado ao contexto com suporte social.

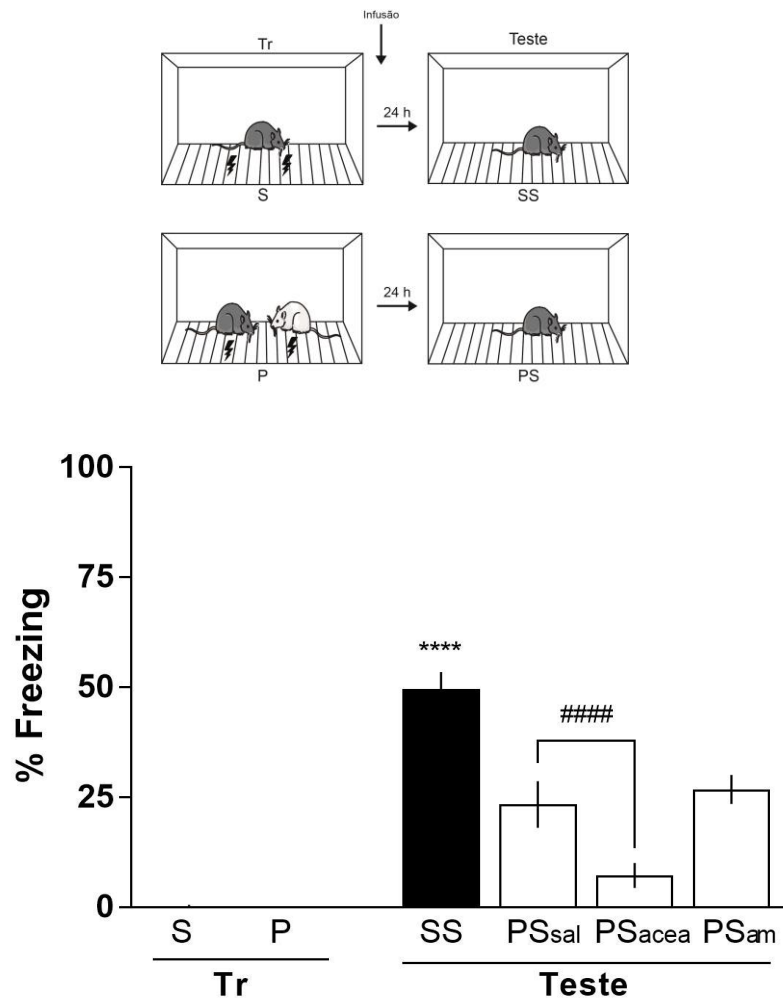


Figura 10: Participação do receptor CB1 no suporte social e a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto. Animais foram submetidos à tarefa de medo condicionado ao contexto (Tr) sozinhos (S) ou em pares (P), imediatamente depois, foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (1 μ l/lado) com Veh (salina 0,9%; PSsal), ACEA (PSacea; 0,01 fmol/ μ l) ou AM25 (PSam; 100 pmol/ μ l). Após 24 h foram submetidos a um teste de retenção (Teste) sozinhos. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de freezing. ANOVA de uma via seguido de Teste de Newman-Keuls ****SS vs. PSsal $p < 0,0001$, ****SS vs. PSacea $p < 0,0001$, ****SS vs. PSam $p < 0,0001$, ####PSsal vs. PSacea $p < 0,0001$. $n = 7-11$ animais por grupo. O protocolo utilizado e os grupos experimentais estão representados na ilustração acima.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que o suporte social durante a aquisição e a evocação da memória de medo condicionado ao contexto diminui a expressão da resposta condicionada. Além disso, a memória de extinção pode ser modulada pelo suporte social, mesmo não havendo evocação da memória. Ainda, os resultados demonstram que os receptores CB1 participam da aquisição da memória de medo condicionado ao contexto quando há suporte social.

No estudo de Lee & Noh (2016) os animais passaram por uma sessão de treino na esquiva passiva sozinhos com ou sem choque nas patas ou em pares com choque nas patas. Na sessão de teste, foi observado que os animais que não haviam levado choque ou que haviam levado choque em pares apresentaram porcentagem de tempo de imobilidade semelhante, e ainda, essas porcentagens foram significativamente menores que dos animais treinados sozinhos com choque. Estes resultados foram semelhantes ao presente estudo: no teste de retenção, os animais que haviam passado pelo treino ou teste em pares demonstraram porcentagens de imobilidade significativamente menores em comparação ao grupo que havia passado por ambas as sessões sozinhas. Tal resultado pode ser justificado pelo desvio de atenção, do contexto em que o animal levou um choque nas patas para um co-específico, levando a uma redução da resposta de medo (DAVITZ; MASON, 1955; HAKE; LAWS, 1967).

A atenuação da respostas de medo pelo suporte social é observado não apenas em memórias aversivas. Latené (1969) observou que quando os animais são colocados em pares em um campo aberto, estes tendem a permanecer pouco distanciados e apresentam menor quantidade de bolos fecais (mensuração complementar de medo) do que animais sozinhos no aparato.

No presente estudo optou-se por utilizar animais da mesma caixa moradia, pois o suporte social por co-específicos familiares mostram-se mais efetivos na inibição das respostas de medo condicionado (JONES et al., 2014; KIYOKAWA

et al., 2014), além de não haver comportamento agressivo (ALBERTS; GALEF, 1973; WONGWITDECHA; MARSDEN, 1996).

Outro fator avaliado neste estudo foi, se seria mais efetivo para o suporte social, um co-específico treinado ou um não treinado. Estudos mostram que a presença de uma companhia calma apresenta maior atenuação nas respostas ao estresse em comparação aos animais que haviam passado por algum evento traumático, uma das explicações para isso é que o animal estressado transfere menos informações ansiolíticas para o companheiro do que os animais não estressados (DAVITZ; MASON, 1955; KIKUSUI; WINSLOW; MORI, 2006; KIYOKAWA et al., 2004). No presente estudo, as porcentagens de imobilidade dos animais que foram submetidos a sessão de treino e os que não treinados foram semelhantes, optando-se por realizar os experimentos com animais não treinados.

Ao observar o aprendizado da memória de extinção, pode-se notar que os animais que passaram pela sessão de extinção em pares apresentaram baixa porcentagem de imobilidade (BRILL-MAOZ; MAROUN, 2016; MIKAMI et al., 2016). Apesar de não ser observada evocação da memória de medo condicionado ao contexto, ocorre o aprendizado da memória de extinção. Estes dados corroboram com pesquisa anterior deste grupo, indicando que não precisa haver evocação de uma memória para que haja o aprendizado da memória de extinção na tarefa de medo condicionado ao contexto (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014a).

Estudos apontam a importância do hipocampo no aprendizado, na evocação (HOLLAND; BOUTON, 1999; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013) e na extinção das memórias aversivas (DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014a; FIORENZA et al., 2012), assim como, em memórias sociais (EICHENBAUM, 1996; KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000). Além disso, os receptores CB1 são abundantemente presentes no cérebro, como no hipocampo (HERKENHAM et al., 1991).

Os resultados do presente trabalho sugerem que há participação dos receptores CB1 na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto. Neste, quando foi administrado o agonista dos receptores CB1, ACEA, imediatamente após o treino, observa-se baixa porcentagem de

imobilidade no teste de retenção. Este resultado corrobora com estudo de Casarotto et al (2012), o qual observou que ACEA em dose moderada pode causar redução da ansiedade e resposta de fuga (SIMONE et al., 2015; SIMONE; MALIVOIRE; MCCORMICK, 2015). Os resultados mostram que quando é administrado o antagonista dos receptores CB1, AM 251, imediatamente após o treino, não houve diferença em comparação à SAL. Estes, vão em desconcontro com estudos em que AM 251 administrado pós-treino intra-CA1, causa efeitos amnésicos em memórias aversivas (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2005, 2006, 2008). Entretanto quando em outra tarefa os resultados são semelhantes, ACEA apresenta prejuízo na aquisição da memória, enquanto AM 251 não apresenta nenhum efeito (CLARKE et al., 2008).

Não foi verificada a presença dos receptores CB1 na extinção da memória, pois estes apresentaram baixas porcentagens de imobilidade durante a sessão, dificultando a modulação da memória.

7. CONCLUSÕES

Os resultados desta dissertação de mestrado demonstram que:

- O suporte social modula a aquisição e a evocação da memória de medo condicionado ao contexto.
- O suporte social modula o aprendizado da extinção da memória de medo condicionado ao contexto.
- Os receptores CB1 participam na aquisição da memória de medo condicionado ao contexto com suporte social.

REFERÊNCIAS

AGREN, T. Human reconsolidation: A reactivation and update. **Brain Research Bulletin**, v. 105, p. 70–82, 2014.

AHI, J.; RADULOVIC, J.; SPIESS, J. The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. **Behavioural Brain Research**, v. 149, n. 1, p. 17–31, 2004.

ALBERINI, C. M. Genes to remember. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. Pt 21, p. 2887–2891, 1999.

ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R746–R750, 2013.

ALBERTS, J. R.; GALEF, B. G. Olfactory cues and movement: stimuli mediating intraspecific aggression in the wild Norway rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 85, n. 2, p. 233–242, 1973.

ALMLI, L. M. et al. Genetic approaches to understanding post-traumatic stress disorder. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 02, p. 355–370, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRIC PUBLISHING. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-V)**. 5th. ed. Washington, DC, USA: APA, 2013.

ANDREWS, G. et al. Life event stress, social support, coping style, and risk of psychological impairment. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 166, n. 5, p. 307–316, 1978.

AVERILL, P. M.; BECK, J. G. Posttraumatic stress disorder in older adults: a conceptual review. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 14, n. 2, p. 133–156, 2000.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Entorhinal cortex contribution to contextual fear conditioning extinction and reconsolidation in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 110, p. 64–71, 2014.

BOSCARINO, J. A. Post-traumatic stress and associated disorders among Vietnam veterans: the significance of combat exposure and social support. **Journal of Traumatic Stress**, v. 8, n. 2, p. 317–336, 1995.

BOUABLOULA, M. et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. n. 312, p. 637–641, 1995.

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

BRUCHEY, A. K.; JONES, C. E.; MONFILS, M.-H. Fear conditioning by-proxy: Social transmission of fear during memory retrieval. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 1, p. 80–84, 2010.

CARVALHO, A. F.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Cannabinoid modulation of noradrenergic circuits: Implications for psychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 59–67, 2012.

CASAROTTO, P. C. et al. Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 478–486, 2012.

CASTANETO, M. S. et al. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. **Drug and Alcohol Dependence**, 2014.

CHEN, Q.; PANKSEPP, J. B.; LAHVIS, G. P. Empathy Is Moderated by Genetic Background in Mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, p. e4387, 2009.

CHHATWAL, J. P. et al. Enhancing Cannabinoid Neurotransmission Augments the Extinction of Conditioned Fear. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 516–524, 2005.

CLARKE, J. R. et al. Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 2, p. 374–381, 2008.

CRYSTAL, J. D.; GEORGE WILSON, A. Prospective memory: A comparative perspective. **Behavioural Processes**, v. 112, p. 88–99, 2015.

DAVITZ, J. R.; MASON, D. J. Socially facilitated reduction of a fear response in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 3, p. 149–151, 1955.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. v. 36, p. 527–538, 2002.

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**, v. 112, n. 2, p. E230–E233, 2014a.

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**, v. 111, n. 12, p. 4572–4577, 2014b.

DE CARVALHO MYSKIW, J.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1071–1076, 2013.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, n. 2, p. 119–124, 2005.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. **Brain Research**, v. 1075, n. 1, p. 60–67, 2006.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 1, p. 1–9, 2008.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 51–86, 2004.

EDELSTEIN, B. A.; SEGAL, D. L. Assessment of Emotional and Personality Disorders in Older Adults. In: **Handbook of the Psychology of Aging**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 325–337.

EGLISTON, K.-A.; RAPEE, R. M. Inhibition of fear acquisition in toddlers following positive modelling by their mothers. **Behaviour Research and Therapy**, v. 45, n. 8, p. 1871–1882, 2007.

EICHENBAUM, H. Is the rodent hippocampus just for “place”? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 187–195, 1996.

EPLEY, S. W. Reduction of the behavioral effects of aversive stimulation by the presence of companions. **Psychological Bulletin**, v. 81, n. 5, p. 271–283, 1974.

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, 2012.

FURINI, C. R. G. et al. D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 212–217, 2014.

GABOR, C. S. et al. Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. **Behavioral Neuroscience**, v. 126, n. 1, p. 97–109, 2012.

GARRIDO ZINN, C. et al. Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 113, n. 33, p. E4914–E4919, 2016.

GLASER, V. et al. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 7, p. 1067–1075, 2010.

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, 2009.

GUZMÁN, Y. F. et al. Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 1185–1187, 2013.

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

HAKE, D. F.; LAWS, D. R. Social facilitation of responses during a stimulus paired with electric shock1. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 10, n. 4, p. 387–392, 1967.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. **CNS spectrums**, v. 14, n. 1 Suppl 1, p. 13–24, 2009.

HEINRICHS, M. et al. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 12, p. 1389–1398, 2003.

HERKENHAM, M. et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 563–583, 1991.

HILLARD, C. J. Stress regulates endocannabinoid-CB1 receptor signaling. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 5, p. 380–388, 2014.

HOLLAND, P. C.; BOUTON, M. E. Hippocampus and context in classical conditioning. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, n. 2, p. 195–202, 1999.

IKEDA, H. et al. Cannabinoid functions in the amygdala contribute to conditioned fear memory in streptozotocin-induced diabetic mice: Interaction with glutamatergic functions. **Experimental Neurology**, v. 269, p. 233–241, 2015.

ISHAC, E. J. et al. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 8, p. 2023–2028, 1996.

IZQUIERDO, I. et al. [Establishment of a trace reflex during natural sleep of cats]. **Actualités Neurophysiologiques**, v. 6, p. 277–296, 1965.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 1998.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2 ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

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

JOHANSEN, J. P. et al. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. **Cell**, v. 147, n. 3, p. 509–524, 2011.

JONES, C. E. et al. Social transmission of Pavlovian fear: fear-conditioning by-proxy in related female rats. **Animal Cognition**, v. 17, n. 3, p. 827–834, 2014.

KANO, M. et al. Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 309–380, 2009.

KATHMANN, M. et al. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 359, n. 6, p. 466–470, 1999.

KELMENDI, B. et al. PTSD: from neurobiology to pharmacological treatments. **European Journal of Psychotraumatology**, v. 7, 2016.

KIKUSUI, T.; WINSLOW, J. T.; MORI, Y. Social buffering: relief from stress and anxiety. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 361, n. 1476, p. 2215–2228, 2006.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5057, p. 675–677, 1992.

KIYOKAWA, Y. et al. Partner's stress status influences social buffering effects in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 4, p. 798–804, 2004.

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, 2014.

KIYOKAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Two types of social buffering differentially mitigate conditioned fear responses. **The European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 12, p. 3606–3613, 2007.

KNAPSKA, E. et al. Social modulation of learning in rats. **Learning & Memory**, v. 17, n. 1, p. 35–42, 2010.

KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Long-Term Memory Underlying Hippocampus-Dependent Social Recognition in Mice. v. 10, p. 47–56, 2000.

KONDO, M. et al. The 5-HT_{3A} receptor is essential for fear extinction. **Learning & Memory**, v. 21, n. 1, p. 740–743, 2013.

KUHNERT, S.; MEYER, C.; KOCH, M. Involvement of cannabinoid receptors in the amygdala and prefrontal cortex of rats in fear learning, consolidation, retrieval and extinction. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 274–284, 2013.

LATANÉ, B. Gregariousness and fear on laboratory rats. n. 5, p. 61 – 69, 1969.

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

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, 2016.

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

LITVIN, Y. et al. CB₁ receptor signaling regulates social anxiety and memory. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, n. 5, p. 479–489, 2013.

MAĆKOWIAK, M. et al. Activation of CB₁ cannabinoid receptors impairs memory consolidation and hippocampal polysialylated neural cell adhesion molecule expression in contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1708–1716, 2009.

MAH, C. J.; ALBERT, D. J.; JAMIESON, J. L. Memory storage: evidence that consolidation continues following electroconvulsive shock. **Physiology & Behavior**, v. 8, n. 2, p. 283–286, 1972.

MARCO, E. M. et al. Social encounter with a novel partner in adolescent rats: Activation of the central endocannabinoid system. **Behavioural Brain Research**, v. 220, n. 1, p. 140–145, 2011.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 897–931, 2001.

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

MAROUN, M. Medial Prefrontal Cortex: Multiple Roles in Fear and Extinction. **The Neuroscientist**, v. 19, n. 4, p. 370–383, 2013.

MARSICANO, G. et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, v. 418, n. 6897, p. 530–534, 2002.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.

MCGAUGH, J. L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. **Science**, v. 153, n. 3742, p. 1351–1358, 1966.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MIKAMI, K. et al. Social buffering enhances extinction of conditioned fear responses in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 163, p. 123–128, 2016.

MILEKIC, M. H.; ALBERINI, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 521–525, 2002.

MINEKA, S.; COOK, M. Mechanisms involved in the observational conditioning of fear. **Journal of Experimental Psychology. General**, v. 122, n. 1, p. 23–38, 1993.

MONFILS, M.-H. et al. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 951–955, 2009.

MORENA, M.; CAMPOLONGO, P. The endocannabinoid system: An emotional buffer in the modulation of memory function. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 30–43, 2014.

MORRISON, F. G.; RESSLER, K. J. FROM THE NEUROBIOLOGY OF EXTINCTION TO IMPROVED CLINICAL TREATMENTS: Neurobiology of Extinction and Improved Clinical Treatments. **Depression and Anxiety**, v. 31, n. 4, p. 279–290, 2014.

MORRISON, J. H.; BAXTER, M. G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. **Nature Reviews Neuroscience**, 2012.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

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

MYSKIW, J. C.; IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G. Modulation of the extinction of fear learning. **Brain Research Bulletin**, v. 105, p. 61–69, 2014.

NATIONAL INSTITUTE ON AGING. **Biology of aging: Research today for a healthier tomorrow**. 11.–7761. ed. Washington, DC, USA: NIH - Turning Discovery into Health, 2011.

PAMPLONA, F. A.; TAKAHASHI, R. N. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. **Neuroscience Letters**, v. 397, n. 1-2, p. 88–92, 2006.

PANKSEPP, J. Toward a cross-species neuroscientific understanding of the affective mind: do animals have emotional feelings? **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 6, p. 545–561, 2011.

PAPALÉO NETTO, M. B. **Urgências em geriatria: epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico e controle terapêutico**. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Atheneu, 2001.

PAVLOV, I. P. **Conditioned Reflexes**. Oxford: Oxford University Press, 1927a.

PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes**. Oxford, England: Oxford University Press, 1927b.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2. ed. San Diego: Acad. Press, 1986.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural Brain Research**, v. 84, n. 1-2, p. 241–246, 1997.

RABINAK, C. A. et al. Cannabinoid facilitation of fear extinction memory recall in humans. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 396–402, 2013.

RADULOVIC, J. et al. Role of regional neurotransmitter receptors in corticotropin-releasing factor (CRF)-mediated modulation of fear conditioning. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 4, p. 707–710, 2000.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RESCORLA, R. A. Are associative changes in acquisition and extinction negatively accelerated? **Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes**, v. 27, n. 4, p. 307–315, 2001.

RESCORLA, R. A. Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. **Learning & Behavior**, v. 32, n. 4, p. 401–408, 2004.

RIBEIRO, W. S. et al. The Impact of Epidemic Violence on the Prevalence of Psychiatric Disorders in Sao Paulo and Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63545, 2013.

RUBINO, T. et al. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 151–160, 2008.

SEROTA, R. G. Acetoxycycloheximide and transient amnesia in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 6, p. 1249–1250, 1971.

SHEN, M. et al. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 14, p. 4322–4334, 1996.

SIMONE, J. J. et al. Differential effects of CB1 receptor agonism in behavioural tests of unconditioned and conditioned fear in adult male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 279, p. 9–16, 2015.

SIMONE, J. J.; MALIVOIRE, B. L.; MCCORMICK, C. M. Effects of CB1 receptor agonism and antagonism on behavioral fear and physiological stress responses in adult intact, ovariectomized, and estradiol-replaced female rats. **Neuroscience**, v. 306, p. 123–137, 2015.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memória da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 773–778, 1997.

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

SZABO, B.; MÜLLER, T.; KOCH, H. Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 3, p. 1084–1089, 1999.

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

ULLMAN, S. E.; FILIPAS, H. H. Predictors of PTSD symptom severity and social reactions in sexual assault victims. **Journal of Traumatic Stress**, v. 14, n. 2, p. 369–389, 2001.

VAN DER KOOIJ, M. A.; SANDI, C. Social memories in rodents: Methods, mechanisms and modulation by stress. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1763–1772, 2012.

VIVEROS, M.; MARCO, E.; FILE, S. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 2, p. 331–342, 2005.

WATSON, J. B.; RAYNER, R. Conditioned emotional reactions. n. 3, p. 1–14, 1920.

WILCOX, B. L. Social support, life stress, and psychological adjustment: a test of the buffering hypothesis. **American Journal of Community Psychology**, v. 9, n. 4, p. 371–386, 1981.

WONGWITDECHA, N.; MARSDEN, C. A. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. **Behavioural Brain Research**, v. 75, n. 1-2, p. 27–32, 1996.

ZAJONC, R. Social facilitation. v. 149, n. 3681, p. 26–74, 1965.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A: Aprovação comissão científica IGG



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6714

Porto Alegre, 16 de setembro de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "A INTERAÇÃO ENTRE: A EXPOSIÇÃO A UM CO-ESPECÍFICO, O RECEPTOR CB1 E A CONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO" coordenado por IVAN ANTONIO IZQUIERDO. 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



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 90/2015 - CEUA

Porto Alegre, 19 de novembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

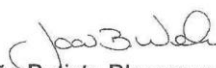
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00474 intitulado **“A interação entre: a exposição a um co-específico, o receptor CB1 e a consolidação e extinção da memória de medo condicionado ao contexto”**.

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
1.188	Rattus norvegicus	03/2015 – 03/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Iván Antônio Izquierdo

IGG

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C: Submissão na Neurobiology of Learning and Memory

Elsevier Editorial System(tm) for
Neurobiology of Learning and Memory
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: SOCIAL BUFFERING EFFECTS ON THE CONSOLIDATION AND EXTINCTION OF
CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING MEMORY INVOLVE HIPPOCAMPAL CB1 RECEPTORS

Article Type: Research paper

Keywords: social buffering; contextual fear conditioning memory;
consolidation; extinction; CB1 receptors; hippocampus.

Corresponding Author: Dr. IVAN A IZQUIERDO, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: PUCRS, Instituto do Cerebro

First Author: Flavia F Ferreira

Order of Authors: Flavia F Ferreira; Fernanda Rodrigues; Scheila D
Schmidt; Lorena Cavalcante; Carolina G Zinn; Cristiane Furini; Jociane
Myskiw; IVAN A IZQUIERDO, MD, PhD

Abstract: Fear memory has an essential role in animal survival: it induces defensive behavior to threats and can be modulated by social buffering, among other factors. Here we examine the role of hippocampal CB1 receptors in this modulation, in relation to both consolidation and extinction of contextual fear conditioning (CFC) with social buffering. Male Wistar rats were submitted to a CFC either one by one or in pairs in training and test sessions and received intra-CA1 infusions of Saline, the CB1 receptor agonist, ACEA (Arachidonyl-2'-chloroethylamide hydrate), or the CB1 receptor antagonist, AM 251 (N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide). The results suggest that CFC memory is modulated by social buffering and, in addition, both at the time of consolidation and during extinction. The extinction effect can take place in a latent form.

Suggested Reviewers: Jelena Radulovic
Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, The Asher Center for
the Study, Northwestern University, Chicago, Illinois, USA
j-radulovic@northwestern.edu

Michel Baudry
Graduate College of Biomedical Sciences, Western University of Health
Sciences, Pomona, California 91766, USA
mbaudry@westernu.edu

Federico Bermúdez-Rattoni
División de Neurociencias, Departamento de Neurociencia Cognitiva,
Instituto de , Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.,
México.
fbermude@ifc.unam.mx

Joseph Huston

APÊNDICE A: Artigo científico original**SOCIAL BUFFERING EFFECTS ON THE CONSOLIDATION AND
EXTINCTION OF CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING MEMORY INVOLVE
HIPPOCAMPAL CB1 RECEPTORS**

Flávia Fagundes Ferreira¹, Fernanda Rodrigues¹, Scheila Daiane Schmidt¹,
Lorena Cavalcante¹, Carolina Garrido Zinn¹, Cristiane Regina Guerino Furini^{1,2},
Jociane de Carvalho Myskiw^{1,2}, Ivan Izquierdo^{1,2}.

¹Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690, 2nd Floor, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

²National Institute of Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Brazil

Corresponding author:

Ivan Izquierdo, PhD.

Address: Av. Ipiranga, 6690 - IPB - 2nd floor, HSL - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), 90.610-000. Porto Alegre - RS, Brazil.

Phone number: (+55) 51 3320-3336

Fax number: (+55) 51 3320-3312

Electronic mail address: izquier@terra.com

Abstract

Fear memory has an essential role in animal survival: it induces defensive behavior to threats and can be modulated by social buffering, among other factors. Here we examine the role of hippocampal CB1 receptors in this modulation, in relation to both consolidation and extinction of contextual fear conditioning (CFC) with social buffering. Male Wistar rats were submitted to a CFC either one by one or in pairs in training and test sessions and received intra-CA1 infusions of Saline, the CB1 receptor agonist, ACEA (Arachidonyl-2'-chloroethylamide hydrate), or the CB1 receptor antagonist, AM 251 (*N*-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide). The results suggest that CFC memory is modulated by social buffering and, in addition, both at the time of consolidation and during extinction. The extinction effect can take place in a latent form.

Keywords: social buffering, contextual fear conditioning memory, consolidation, extinction, CB1 receptors, hippocampus.

1. Introduction

Fear is a subjective physiological state resulting from exposure to real or imaginary threats (Izquierdo, Furini & Myskiw, 2016; LeDoux, 2014). Pavlovian conditioning is the behavioral model most used to study fear memories in rodents (Fanselow, 1980; Fiorenza, Rosa, Izquierdo & Myskiw, 2012; Furini, Myskiw, Benetti, & Izquierdo, 2013). In contextual fear conditioning (CFC) the animals learn the association between a conditioned stimulus (CS; the context) and an unconditioned stimulus (US; one or a few electric footshocks). This generates a conditioned response (CR) which persists when the CS is presented alone (Agren, 2014; Baldi & Bucherelli, 2014; Tovote, Fadok & Lüthi, 2015).

Previous studies have shown that fear responses can be modulated by the presence of conspecifics and by social memory (Bovard, 1959; Bruchey, Jones & Monfils, 2010; Epley, 1974; Van der Kooij & Sandi, 2012), which is called “social buffering” (Kiyokawa, 2015). This involves the behavior of the animal when there is a conspecific (Zajonc, 1965). In CFC, the CR has a reduced expression when the animals are placed in the conditioning chamber together (Brill-Maoz & Maroun, 2016) and the familiarity between animals influences in social transmission of the fear (Jones, Riha, Gore & Monfils, 2014; Kiyokawa, Takeuchi & Mori, 2007; Knapska, Mikosz, Werka & Maren, 2010).

Both fear memory and social buffering can be modulated by different systems, including endocannabinoid system through activation of CB1 and CB2 receptors (Marco, Rapino, Caprioli, Borsini, Maccarrone & Laviola, 2011). Studies in rats suggest that activation of the CB1 receptors have an important role in social interaction (Marco, Rapino, Caprioli, Borsini, Maccarrone & Laviola, 2011), and in the consolidation (Viveros, Marco & File, 2005) and extinction of fear memory (Kuhnert, Meyer & Koch, 2013).

Aversive stimuli and their interaction with a conspecific leads to neuroendocrine, behavioral and emotional changes (Guzmán, Tronson, Guedea, Huh, Gao & Radulovic, 2009), but the mechanisms by which social buffering is able to regulate the response to stress is not known. Here we

investigate the interaction between social buffering during consolidation and extinction of CFC memory and CB1 receptors of the hippocampus in rats.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Male CrlCembe: Wistar rats (3 months old, 300-330 g) were used, purchased from the Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) of this university, our regular provider. The animals were housed 4 to a cage with free access to food and water, under 12/12 h light/dark cycle (light onset at 7:00 a.m.). All behavioral procedures were conducted in the light cycle. The temperature of the animals room was maintained at 22-24 °C. All procedures followed the guidelines of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Bioethics Committee of the University.

2.2. Surgery

At least one week after arrival, the animals were implanted under 75 mg/kg ketamine plus 10 mg/kg xylazine anesthesia with bilateral 22-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the CA1 (A -4.2, L \pm 3.0, V -1.8 mm) taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986). Acrylic cement was used to fix the cannulae to the skull. Immediately, 24 and 48 h after surgery the animals received Meloxicam 0,2 % administered subcutaneously (2 mg/Kg). Animals were allowed to recover from surgery for 7 days prior to behavioral procedures. They were handled once a day for 3 consecutive days and then trained in the contextual fear conditioning.

2.3. Contextual fear conditioning apparatus

The training apparatus was a chamber (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) with black plexiglass walls (50 x 25 x 58 cm) and a transparent plastic front lid. The floor of the chamber consisted of 0.3 cm caliber bronze bars spaced 1.0 cm apart. The bars were connected to a device to deliver the footshock presentations. The box was cleaned with a solution of 70% ethanol after its use

by each animal. The percentage of time that the animals spent freezing (no visible movement except for respiration; Fanselow, 1980) in the apparatus was measured by an automatic device.

2.4. Behavioral procedures

2.4.1. Consolidation of contextual fear conditioning

On the training (Tr) day the animals were allowed to freely explore the apparatus alone (A) or in pairs (P) for 2 min and then received three 0.5 mA (2 s duration) footshocks with a 30 s interval between them. Twenty-four hours after Tr, in the test session (Test), the animals were placed again in the training chamber either A or in P for 3 min, with the absence of footshocks. In order to avoid aggressive behavior all animals that were Tr or Test in pairs were from the same cage (Alberts & Galef, 1973; Wongwitdecha & Marsden, 1996). Some animals were not trained in the CFC and were called Naïve (N). In all sessions, the percentage of freezing was measured.

2.4.2. Extinction of the contextual fear conditioning

The Tr day was the same as above. After 24 h, the animals were placed in the same chamber for 10 min extinction training (Ext) either A or in P, with no footshocks. Twenty-four hours later, the animals were placed again in the same apparatus for a 3 min extinction retention test (Test) either A or in P, also with no footshocks. Some animals were not trained in the CFC and were called Naïve (N). In all sessions, the percentage of time spent freezing was measured.

2.5. Pharmacological treatments

Microinjections were administered less than 1 min after the contextual fear conditioning training or extinction training sessions. The animals were gently restrained by hand, and the injection needle (30-gauge) was fitted tightly into the guides, extending 1 mm from the tip of the guide cannulae. The injection needle was connected to a 10 µl Hamilton micro syringe and the infusions were performed at a rate of 0.5 µl/30 s. The micro infusion volume used was 1.0 per side into the dorsal CA1 area of the hippocampus. At the end

of the micro infusion, the injection needle was left in place 1 min to allow the solution to diffuse away from the cannulae tip, then carefully withdrawn and inserted on the other side.

The drugs and the doses used were: the CB1 receptor agonist, ACEA (Arachidonyl-2'-chloroethylamide hydrate, Tocris), 0.01 fmol/ μ l; and the CB1 receptor antagonist, AM 251 (*N*-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide; Tocris), 100 pmol/ μ l. Controls received saline (SAL). The doses used were based on previous research from this laboratory (Clarke, Rossato, Monteiro, Bevilaqua, Izquierdo & Cammarota, 2008). All drugs were freshly dissolved in SAL.

2.6. Cannulae placement

Correct cannulae placements were verified 2-4 days after the end of the behavioral procedure, as follows. Animals were infused with a 4% methylene blue solution over 30 s into the CA1 region of the dorsal hippocampus (1.0 μ l/side) through the implanted cannulae (de Carvalho Myskiw, Benetti & Izquierdo, 2013; Fiorenza, Rosa, Izquierdo & Myskiw, 2012). Thirty min later, the animals were sacrificed by excess anesthesia and the brains were removed and kept in 10% formalin. The extension of the spread of the dye was considered to represent an estimate of the amount of drug infused. Cannulae placement was considered correct when the spread was \leq 1 mm from the intended infusion side; this occurred in 98% of the animals.

2.7. Statistics

Data are presented as means \pm standard errors, and were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls Tests using Graphpad Prism® software. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of social buffering on memory consolidation of contextual fear conditioning

The animals were submitted to a Tr session either alone (A) or in pairs (P) and 24 h later were subjected to a 3-min Test A or in P: AA (Tr A and Test A), PP (Tr P and Test P). In the Test both groups expressed higher percentage of freezing than during Tr. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(3;44)}=60.36$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was a significant difference between the A vs. AA ($p<0.0001$) and P vs. PP ($p<0.001$) groups. However, animals that were exposed in P to Tr and Test sessions expressed a significantly lower percentage of freezing in the Test when compared to the those exposed A. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(3;44)}=60.36$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups AA vs. PP ($p<0.0001$). These results suggest that the social buffering is able to decrease the expression of the CR in CFC in the retention test session (Fig. 1).

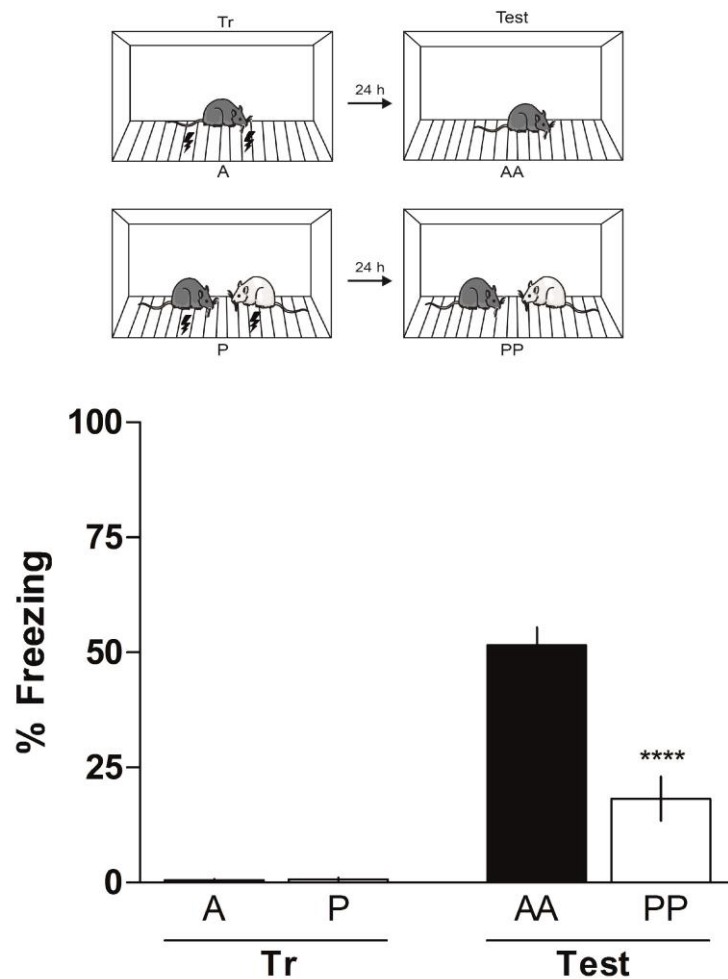


Figure 1. Effect of social buffering in the acquisition of contextual fear conditioning memory. The animals were submitted to a training session (Tr) alone (A) or in pairs (P) and 24 h later they were subjected to a 3 min retention test (Test) A or in P: AA (Tr A and Test A), PP (Tr P and Test P). Data (means \pm SEM) are presented as the percentage of freezing. One-way ANOVA followed Newman-Keuls test **** $p < 0.0001$ AA vs. PP. $n = 12$ per group. This and following figures include a diagram of the training/test conditions.

The animals were submitted to a Tr session alone (A) or in pairs (P) and 24 h later were subjected to a 3-min Test. For the test session the animals were randomly divided into 6 groups: AA (Tr A and Test A), AP (Tr A and Test P), AN (Tr A and Test N), PP (Tr P and Test P), PA (Tr P and Test A) and PN (Tr P and Test N). In the Test all groups expressed higher percentage of freezing comparing with Tr. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(7;130)}=56.93$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups A vs. AA $p < 0.001$, A vs. AP $p < 0.001$,

A vs. AN $p < 0.001$, P vs. PP $p < 0.001$, P vs. PA $p < 0.001$ e P vs. PN $p < 0.001$ (Fig. 2).

However, animals that were submitted in P on Tr expressed a significantly lower percentage of freezing when compared to the A animals, as well as those that were A on Tr and in P on the Test (Fig. 2). A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(7;130)}=56.93$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups AA vs. AP $p < 0.001$, AA vs. AN $p < 0.001$, AA vs. PP $p < 0.0001$, AA vs. PA $p < 0.001$ and AA vs. PN $p < 0.001$). These results suggest that social buffering is able to decrease the expression of the CR in the retrieval of CFC memory.

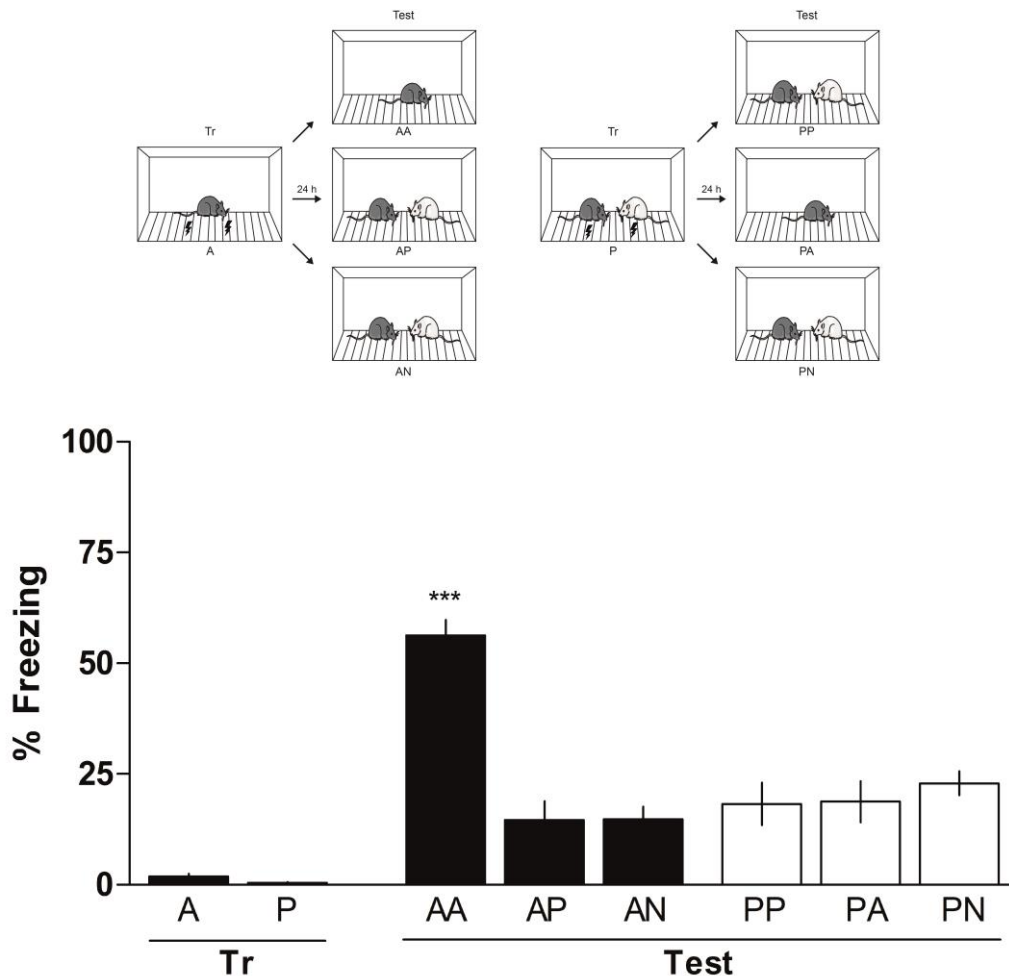


Figure 2. Effect of social buffering on the retrieval of contextual fear conditioning memory. The animals were submitted to training session (Tr) alone (A) or in pairs (P) and 24 h later they were subjected to a 3 min retention test (Test). For the test session the animals were randomly divided into 6 groups: AA (Tr A and Test A), AP (Tr A and Test P), AN (Tr A and Test N), PP (Tr P and Test P), PA (Tr P and Test A) and PN (Tr P and Test N). Data (means \pm SEM) are presented as the percentage of freezing. One-way ANOVA followed Newman-Keuls test *** $p < 0.001$ AA vs. AP; *** $p < 0.001$ AA vs. AN; *** $p < 0.001$ AA vs. PP; *** $p < 0.001$ AA vs. PA; *** $p < 0.001$ AA vs. PN. $N = 9-12$ animals per group.

3.2. Effects of social buffering on extinction memory of contextual fear conditioning

The animals were submitted to a Tr alone (A) and 24 h later were subjected to a 10 min Ext A (AA; Tr A and Ext A) or in P (AN; Tr A or Ext N). The animals were then randomly divided into groups and subjected to a 3 min Test: AAA (Tr A, Ext A and Test A), AAN (Tr A, Ext A and Test N), ANA (Tr A, Ext N and Test A), ANN (Tr A, Ext N and Test N). In the first 3 min of the Ext AA session the animals expressed higher percentage of freezing comparing with

Tr. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(10;179)}=28.39$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups A vs. Ext AA $p<0.001$. However, in the first 3 min of the Ext AN the animals not expressed the same percentage of freezing as AA group. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(10;179)}=28.39$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups Ext AA vs. Ext AN $p<0.001$ (Fig. 3).

In the Test the animal groups AAA and AAN presented a decrease in percentage of freezing comparing with the first 3 min of the Ext AA. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(10;179)}=28.39$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups Ext AA 0-3 vs. AAA $p<0.001$, Ex AA 0-3 vs. AAN $p<0.001$. In the Test the animals groups ANA and ANN presented a decrease in percentage of freezing comparing with the first 3 min of the Ext AA. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(10;179)}=28.39$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups Ext AA 0-3 vs. ANA $p<0.001$, Ex AA 0-3 vs. ANN $p<0.001$. These results suggest that animals, even if they do not express CR, are able to learn the memory of extinction of CFC (Fig. 3).

The animals were submitted to a Tr alone (A) or in pairs (P) and 24 h later were randomly divided into groups and submitted to a 10 min Ext A (AA; Ext A; or PA; Tr P and Ext A) or in P (PN, Tr P and Ext N) and then 24 h later were randomly divided into groups and submitted to the Test session: AAA (Tr A, Ext A e Test A), PNN (Tr P, Ext N e Test N), PNA (Tr P, Ext N e Test A), PAA (Tr P, Ext A e Test A) and PAN (Tr P, Ext A e Test N). In the first 3 min of the Ext AA the animals expressed higher percentage of freezing comparing with Tr. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(15;261)}=21.16$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was a significant difference between groups A vs. Ext AA $p<0.001$. However, in the first 3 min of the Ext PN and Ext PA the animals showed less freezing than the AA group. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(15;261)}=21.16$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was

difference between groups Ext AA vs. Ext PN $p < 0.01$, Ext AA vs. Ext PA $p < 0.001$ (Fig. 3).

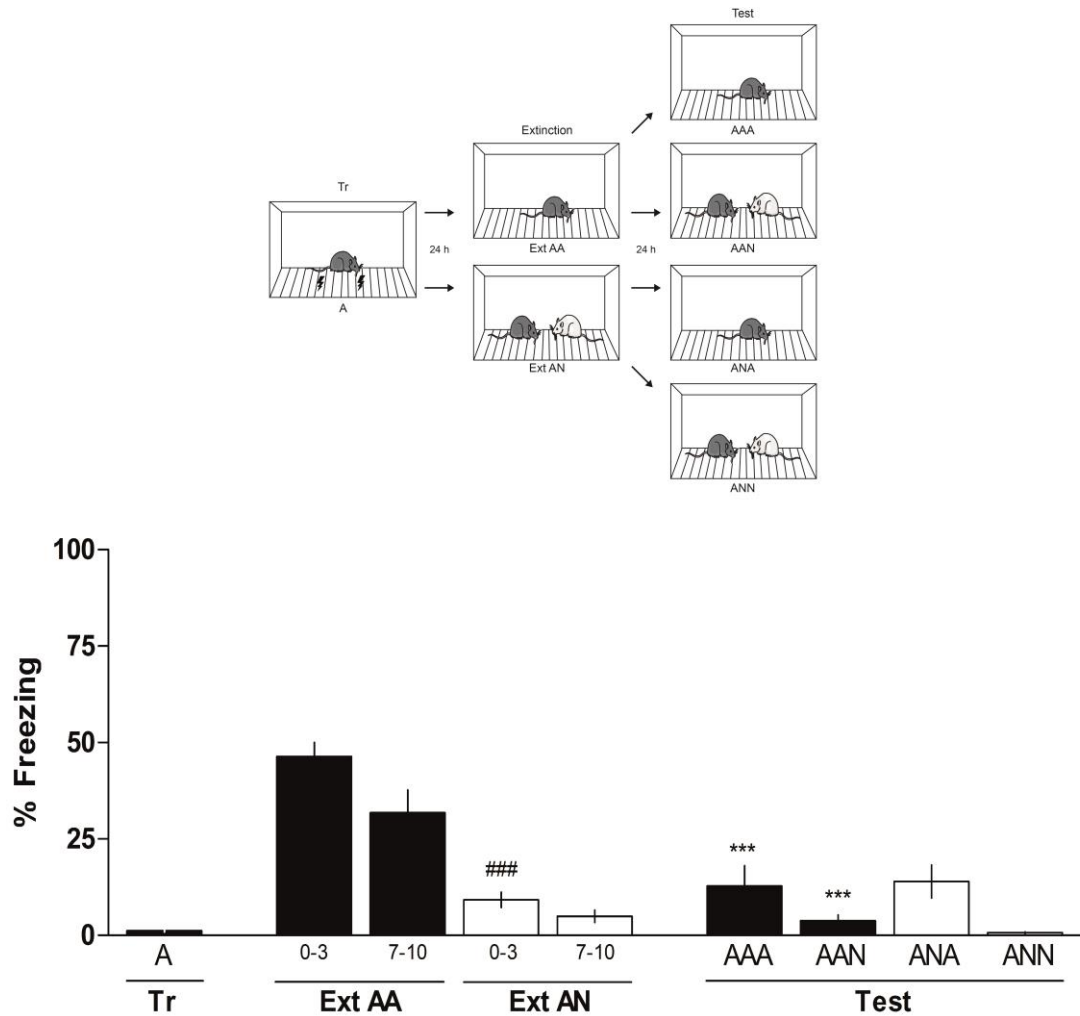


Figure 3. Effect of social buffering on the extinction of contextual fear conditioning memory. The animals were submitted to training session (Tr) alone (A) and 24 h later were subjected to a 10 min extinction training (Ext) alone (AA) or in pairs (AN) and 24 h later were subjected to a 3 min retention test (Test). For the test session, the animals were randomly divided into groups: AAA (Tr A, Ext A and Test A), AAN (Tr A, Ext A and Test N), ANA (Tr A, Ext N and Test A), ANN (Tr A, Ext N and Test N). Data (means \pm SEM) are presented as the percentage of freezing. One-way ANOVA followed Newman-Keuls test ### $p < 0.001$ Ext AA vs. Ext AN, *** $p < 0.001$ Ext AA 0-3 vs. AAA $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ Ext AA 0-3 vs. AAN $p < 0.001$. N = 6-10 animals per group.

In the Test, all the animal groups AAA, PNN, PNA, PAA and PAN showed a decrease in freezing relative to the first 3 min of the Ext AA. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(15;261)}=21.16$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between

groups Ext. AA vs. AAA $p < 0.001$, Ext. AA vs. PNN $p < 0.001$, Ext. AA vs. PNA $p < 0.001$, Ext. AA vs. PAA $p < 0.001$, Ext. AA vs. PAN $p < 0.001$. These results suggest that the acquisition memory of CFC with social buffering modulates extinction memory (Fig. 4).

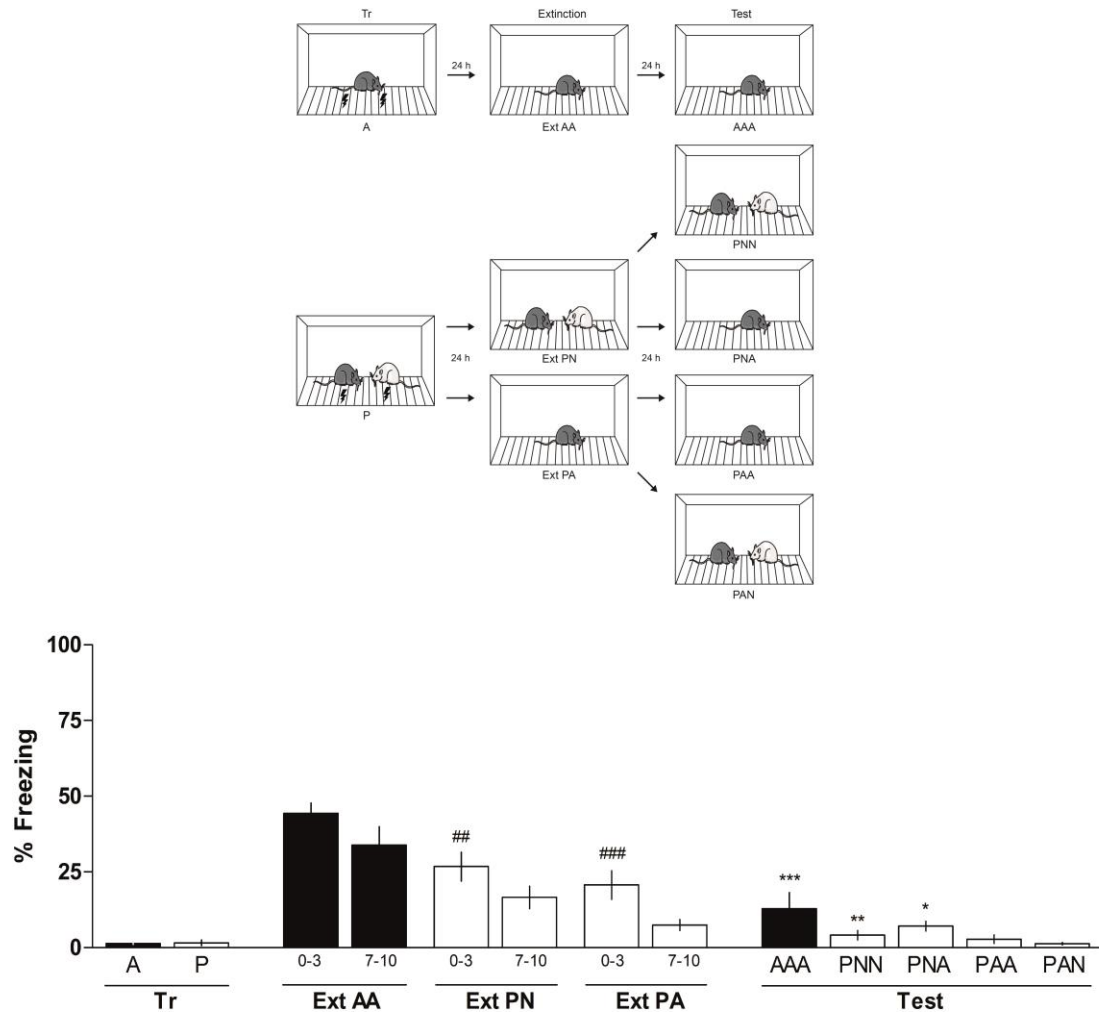


Figure 4. Effect of social buffering during the acquisition of memory in the learning of the extinction of contextual fear conditioning memory. The animals were submitted to training session (Tr) alone (A) or in pairs (P) and 24 h later were subjected to a 10 min extinction training (Ext) alone (AA or PA) or in pairs (AN) and 24 h later were subjected to a 3 min retention test (Test). For the Test session, the animals were randomly divided into groups: AAA (Tr A, Ex A and Test A), PNN (Tr P, Ext N and Test N), PNA (Tr P, Ext N and Test A), PAA (Tr P, Ext A and Test A), PAN (Tr P, Ext A and Test N). Data (means \pm SEM) are presented as the percentage of freezing. One-way ANOVA followed Newman-Keuls test ## $p < 0.01$ Ext AA vs. Ext PN, ### $p < 0.001$ Ext AA vs. Ext PA, *** $p < 0.001$ Ext AA vs. AAA, ** $p < 0.01$ Ext PN vs. PNN, * $p < 0.05$ Ext PN vs. PPA. $n = 8-10$ animals per group.

3.3. Participation of the CB1 receptors on social buffering and memory consolidation of contextual fear conditioning

The animals were submitted to a Tr alone (A) or in pairs (P). Immediately after the CFC Tr, the animals received bilateral intra-CA1 infusion of saline (SAL), ACEA (0.01 fmol/ μ l) or AM 251 (100 pmol/ μ l) and 24 h later were subjected A to a 3 min Test.

In the Test, the PAsal and PAam expressed similar percentages of freezing and a significant difference comparing with AA. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(5;75)}=59.94$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups AA vs. PAsal $p<0.0001$, AA vs. PAam $p<0.0001$. However, the PAacea expressed a significantly lower percentage of freezing when compared to the AAsal and AA groups. A one-way ANOVA showed significant differences ($F_{(5;75)}=59.94$) among groups; the Newman-Keuls *post hoc* analysis indicated that there was difference between groups AA vs. PAacea $p<0.0001$, PAsal vs. PAacea $p<0.0001$. The PAacea group did not show significant difference of freezing relative to Tr. These results clearly suggest that CB1 receptors participate in the acquisition of CFC memory with social buffering (Fig. 5).

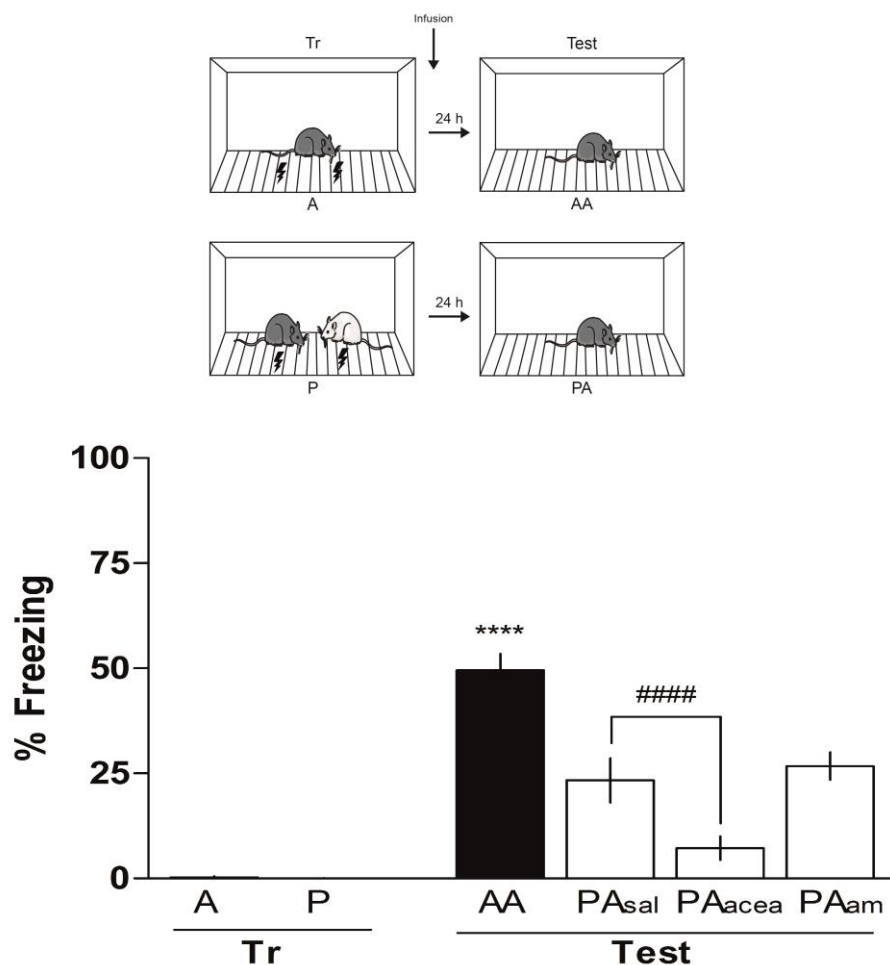


Figure 5. Participation of the CB1 receptors in social buffering and memory consolidation of contextual fear conditioning memory. The animals were submitted to a training session (Tr) alone (A) or in pairs (P). Immediately after the CFC Tr, the animals received bilateral intra-CA1 infusion of saline (SAL), ACEA (0.01 fmol/ μ l) or AM 251 (100 pmol/ μ l) and 24 h later were subjected to a 3 min retention test (Test) alone. Data (means \pm SEM) are presented as the percentage of freezing. One-way ANOVA followed Newman-Keuls test ****AA vs. PAsal $p < 0.0001$, ****AA vs. PAacea $p < 0.0001$, ****AA vs. PAam $p < 0.0001$, ####PAsal vs. PAacea $p < 0.0001$. $n = 7-11$ animals per group.

4. Discussion

The results show that social buffering during the acquisition and retrieval of CFC memory decreases expression of the CR. In addition, social buffering, even if there is no retrieval memory, can modulate the extinction memory. Furthermore, the results demonstrate that CB1 receptors participate in the acquisition of CFC memory when there is social buffering.

Throughout this work, we chose to use animals from the same cage, because social buffering by family conspecifics is more effective in inhibiting fear CR (Jones, Riha, Gore & Monfils, 2014; Kiyokawa, Honda, Takeuchi & Mori, 2014) and this avoid aggressive behavior (Alberts & Galef, 1973; Wongwitdecha & Marsden, 1996).

Lee & Noh (2016) submitted animals to inhibitory avoidance training sessions either alone with or without footshocks or in pairs with footshocks. They observed that animals that had not been shocked or that had received shocks in pairs had a similar percentage of freezing, but these percentages were significantly lower than those of animals trained alone with shock, which fits with our findings (see above). This may be due to the deviation of attention towards the conspecific receiving a shock, leading to a reduction of the fear response (Davitz & Mason, 1955; Hake & Laws, 1967).

The attenuation of fear responses by social buffering is observed not only in aversive memories. Latené (1969) reported that when the animals are placed in pairs in an open field, they tend to remain close to each other and defecate less than animals placed alone in the apparatus.

Another factor evaluated in the present research was which conspecific would be most effective in social buffering, one that had been trained or one that had not been trained. Studies show that the presence of a calm companion presents a greater attenuation of the responses to the stress in comparison to companions that had been through some traumatic event. One explanation for this is that the stressed animal transfers less anxiolytic information to the companion than non-stressed animals (Davitz & Mason, 1955; Kikusui, Winslow & Mori, 2006; Kiyokawa, Kikusui, Takeuchi & Mori, 2004). In the present study,

the percentages of freezing of the animals that had and those that e ones that had not been trained were similar.

In the results on extinction it was observed that the animals that went through the extinction session in pairs had a low percentage of freezing (Brill-Maoz & Maroun, 2016; Mikami, Kiyokawa, Takeuchi & Mori, 2016). As previously described by our group (de Carvalho Myskiw, Furini, Schmidt, Ferreira & Izquierdo, 2014) the performance of CFC retrieval was not necessary for the learning of extinction.

The hippocampus has important roles in learning and retrieval (Holland & Bouton, 1999; Izquierdo, Furini & Myskiw, 2016; Maren, Phan & Liberzon, 2013) and in the extinction of aversive memories (de Carvalho Myskiw, Furini, Schmidt, Ferreira & Izquierdo, 2014; Fiorenza, Rosa, Izquierdo & Myskiw, 2012) social memories (Eichenbaum, 1996; Garrido Zinn, Clairis, Silva Cavalcante, Furini, de Carvalho Myskiw & Izquierdo, 2016; Kogan, Frankland & Silva, 2000). CB1 receptors are abundantly expressed in the hippocampus (Herkenham, Lynn, Johnson, Melvin, de Costa & Rice, 1991).

The results shows a participation of the CB1 receptors in CFC memory consolidation. When the ACEA agonist was administered immediately after Tr, a low percentage of freezing was observed in the Test. This result corroborates a study by Casarotto et al (2012), that ACEA in a moderate dose can cause reduction of anxiety and leakage response (Simone, Green, Hodges & McCormick, 2015; Simone, Malivoire & McCormick., 2015). When the AM 251 antagonist is administered immediately after Tr, there was no difference compared to SAL. This disagrees with some studies in which AM 251 administered post-training intra-CA1 causes amnesia for aversive memories (de Oliveira Alvares, de Oliveira, Camboim, Diehl, Genro, Lanziotti & Quillfeldt, 2005; de Oliveira Alvares, Genro, Diehl & Quillfeldt, 2008; de Oliveira Alvares, Pasqualini Genro, Vaz Breda, Pedroso, Costa Da Costa & Quillfeldt., 2006). This, however, appears not to be the rule (see Clarke et al., 2008).

5. Conclusion

Our main conclusion are that social buffering modulates the acquisition, retrieval, and extinction of CFC memory, and CB1 receptors participate in the acquisition of CFC memory with social buffering.

Acknowledgments: Work supported by grants and fellowships from the National Research Council of Brazil (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Agren, T., (2014). Human reconsolidation: A reactivation and update. *Brain Res. Bull.* 105, 70–82. doi:10.1016/j.brainresbull.2013.12.010
- Alberts, J.R., Galef, B.G., (1973). Olfactory cues and movement: stimuli mediating intraspecific aggression in the wild Norway rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 85, 233–242.
- Baldi, E., Bucherelli, C., (2014). Entorhinal cortex contribution to contextual fear conditioning extinction and reconsolidation in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 110, 64–71. doi:10.1016/j.nlm.2014.02.004
- Bovard, E.W., (1959). The effects of social stimuli on the response to stress. *Psychol. Rev.* 66, 267–277.
- Brill-Maoz, N., Maroun, M., (2016). Extinction of fear is facilitated by social presence: Synergism with prefrontal oxytocin. *Psychoneuroendocrinology* 66, 75–81. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.01.003
- Bruchey, A.K., Jones, C.E., Monfils, M.-H., (2010). Fear conditioning by-proxy: Social transmission of fear during memory retrieval. *Behav. Brain Res.* 214, 80–84. doi:10.1016/j.bbr.2010.04.047
- Casarotto, P.C., Terzian, A.L.B., Aguiar, D.C., Zangrossi, H., Guimarães, F.S., Wotjak, C.T., Moreira, F.A., (2012). Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. *Neuropsychopharmacology* 37, 478–486. doi:10.1038/npp.2011.207
- Clarke, J.R., Rossato, J.I., Monteiro, S., Bevilacqua, L.R.M., Izquierdo, I., Cammarota, M., (2008). Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 374–381. doi:10.1016/j.nlm.2008.04.009
- Davitz, J.R., Mason, D.J., (1955). Socially facilitated reduction of a fear response in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48, 149–151.
- de Carvalho Myskiw, J., Benetti, F., Izquierdo, I., (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1071–1076. doi:10.1073/pnas.1220875110
- de Carvalho Myskiw, J., Furini, C.R.G., Schmidt, B., Ferreira, F., Izquierdo, I., (2014). Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E230–E233. doi:10.1073/pnas.1423465112

de Oliveira Alvares, L., de Oliveira, L.F., Camboim, C., Diehl, F., Genro, B.P., Lanzotti, V.B., Quillfeldt, J.A., (2005). Amnesic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83, 119–124. doi:10.1016/j.nlm.2004.10.002

de Oliveira Alvares, L., Genro, B.P., Diehl, F., Quillfeldt, J.A., (2008). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 1–9. doi:10.1016/j.nlm.2008.01.009

de Oliveira Alvares, L., Pasqualini Genro, B., Vaz Breda, R., Pedroso, M.F., Costa Da Costa, J., Quillfeldt, J.A., (2006). AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res.* 1075, 60–67. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.101

Eichenbaum, H., (1996). Is the rodent hippocampus just for “place”? *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 187–195.

Epley, S.W., (1974). Reduction of the behavioral effects of aversive stimulation by the presence of companions. *Psychol. Bull.* 81, 271–283.

Fanselow, M.S., (1980). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 15, 177–182.

Fiorenza, N.G., Rosa, J., Izquierdo, I., Myskiw, J.C., (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav. Brain Res.* 232, 210–216. doi:10.1016/j.bbr.2012.04.015

Furini, C.R.G., Myskiw, J.C., Benetti, F., Izquierdo, I., (2013). New frontiers in the study of memory mechanisms. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 35, 173–177. doi:10.1590/1516-4446-2012-1046

Garrido Zinn, C., Clairis, N., Silva Cavalcante, L.E., Furini, C.R.G., de Carvalho Myskiw, J., Izquierdo, I., (2016). Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E4914–E4919. doi:10.1073/pnas.1609883113

Guzmán, Y.F., Tronson, N.C., Guedea, A., Huh, K.H., Gao, C., Radulovic, J., (2009). Social modeling of conditioned fear in mice by non-fearful conspecifics. *Behav. Brain Res.* 201, 173–178. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.024

Hake, D.F., Laws, D.R., (1967). Social facilitation of responses during a stimulus paired with electric shock¹. *J. Exp. Anal. Behav.* 10, 387–392. doi:10.1901/jeab.1967.10-387

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 563–583.

Holland, P.C., Bouton, M.E., (1999). Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 195–202. doi:[http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80027-0](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80027-0)

Izquierdo, I., Furini, C.R.G., Myskiw, J.C., (2016). Fear Memory. *Physiol. Rev.* 96, 695–750. doi:10.1152/physrev.00018.2015

Jones, C.E., Riha, P.D., Gore, A.C., Monfils, M.-H., (2014). Social transmission of Pavlovian fear: fear-conditioning by-proxy in related female rats. *Anim. Cogn.* 17, 827–834. doi:10.1007/s10071-013-0711-2

Kikusui, T., Winslow, J.T., Mori, Y., (2006). Social buffering: relief from stress and anxiety. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 2215–2228. doi:10.1098/rstb.2006.1941

Kiyokawa, Y., (2015). Social Odors: Alarm Pheromones and Social Buffering. doi:10.1007/7854_2015_406.

Kiyokawa, Y., Honda, A., Takeuchi, Y., Mori, Y., (2014). A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behav. Brain Res.* 267, 189–193. doi:10.1016/j.bbr.2014.03.043

Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., (2004). Partner's stress status influences social buffering effects in rats. *Behav. Neurosci.* 118, 798–804. doi:10.1037/0735-7044.118.4.798

Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Mori, Y., (2007). Two types of social buffering differentially mitigate conditioned fear responses. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3606–3613. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05969.x

Knapska, E., Mikosz, M., Werka, T., Maren, S., (2010). Social modulation of learning in rats. *Learn. Mem.* 17, 35–42. doi:10.1101/lm.1670910

Kogan, J.H., Frankland, P.W., Silva, A.J., (2000). Long-Term Memory Underlying Hippocampus-Dependent Social Recognition in Mice. *Hippocampus* 10, 47–56. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6

Kuhnert, S., Meyer, C., Koch, M., (2013). Involvement of cannabinoid receptors in the amygdala and prefrontal cortex of rats in fear learning, consolidation,

retrieval and extinction. *Behav. Brain Res.* 250, 274–284. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.002

Latané, B., (1969). Gregariousness and fear on laboratory rats. *Journal of Experimental Social Psychology* 61 – 69.

LeDoux, J.E., (2014). Coming to terms with fear. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2871–2878. doi:10.1073/pnas.1400335111

Lee, H., Noh, J., (2016). Pair exposure with conspecific during fear conditioning induces the link between freezing and passive avoidance behaviors in rats. *Neurosci. Res.* 108, 40–45. doi:10.1016/j.neures.2016.01.005

Marco, E.M., Rapino, C., Caprioli, A., Borsini, F., Maccarrone, M., Laviola, G., (2011). Social encounter with a novel partner in adolescent rats: Activation of the central endocannabinoid system. *Behav. Brain Res.* 220, 140–145. doi:10.1016/j.bbr.2011.01.044

Maren, S., Phan, K.L., Liberzon, I., (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 417–428. doi:10.1038/nrn3492

Mikami, K., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Mori, Y., (2016). Social buffering enhances extinction of conditioned fear responses in male rats. *Physiol. Behav.* 163, 123–128. doi:10.1016/j.physbeh.2016.05.001

Paxinos, G., Watson, C., (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, (2nd ed.) Sydney: Acad. Press.

Simone, J.J., Green, M.R., Hodges, T.E., McCormick, C.M., (2015). Differential effects of CB1 receptor agonism in behavioural tests of unconditioned and conditioned fear in adult male rats. *Behav. Brain Res.* 279, 9–16. doi:10.1016/j.bbr.2014.11.012

Simone, J.J., Malivoire, B.L., McCormick, C.M., (2015). Effects of CB1 receptor agonism and antagonism on behavioral fear and physiological stress responses in adult intact, ovariectomized, and estradiol-replaced female rats. *Neuroscience* 306, 123–137. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.08.032

Tovote, P., Fadok, J.P., Lüthi, A., (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 317–331. doi:10.1038/nrn3945

van der Kooij, M.A., Sandi, C., (2012). Social memories in rodents: Methods, mechanisms and modulation by stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1763–1772. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.10.006

Viveros, M., Marco, E., File, S., (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 331–342. doi:10.1016/j.pbb.2005.01.029

Wongwitdecha, N., Marsden, C.A., (1996). Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav. Brain Res.* 75, 27–32.

Zajonc, R., (1965). Social facilitation. *Science* 149, 26–74.