

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

JESSICA ROSA

**A DEPENDÊNCIA DE ESTADO NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIA  
AVERSIVA: PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO,  
HIPOCAMPO E AMÍGDALA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE

2014

JESSICA ROSA

**A DEPENDÊNCIA DE ESTADO NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIA  
AVERSIVA: PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO,  
HIPOCAMPO E AMÍGDALA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Iván Izquierdo

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

PORTO ALEGRE

2014

#### DADOS DE CATALOGAÇÃO

**R788d** Rosa, Jessica

A dependência de estado na extinção de memória aversiva: participação do núcleo do trato solitário, hipocampo e amígdala / Jessica Rosa. Porto Alegre: PUCRS, 2014.

97 f.: il.; tab. Inclui artigo submetido ao periódico *Neurobiology of Learning and Memory*.

Orientador: Prof. Dr. Iván Izquierdo.

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

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências.

1. EXTINÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA. 2. DEPENDÊNCIA DE ESTADO. 3. ADRENALINA. 4. NORADRENALINA. 5. NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO. 6. HIPOCAMPO. 7. AMÍGDALA BASOLATERAL. I. Izquierdo, Iván. II. Myskiw, Jociane de Carvalho. III. Título.

**CDD** 612.825

**CDU** 612.821.2(043.3)

**NLM** WM 173.7

Isabel Merlo Crespo  
Bibliotecária CRB 10/1201

JESSICA ROSA

**A DEPENDÊNCIA DE ESTADO NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIA  
AVERSIVA: PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO,  
HIPOCAMPO E AMÍGDALA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin – UFRGS

---

Profa. Dra. Nadja Schröder – PUCRS

---

Profa. Dra. Pâmela Billig Mello Carpes – UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Fernando Benetti – PUCRS (Suplente)

---



Dedico esta dissertação à minha mãe, que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos e ao meu irmão Felipe, com todo o meu amor!

À Izaque Maciel, por contemplarmos juntos as coisas belas e simples da vida!

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico especial agradecimento aos meus professores orientadores, Dr. Iván Izquierdo, e Dra. Jociane de Carvalho Myskiw. Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte do Centro de Memória desde minha Iniciação Científica e, por dirigirem meus passos para que a conclusão deste mestrado se tornasse realidade! Obrigada pelo auxílio, pela paciência, pela oportunidade de aprender e por me conduzirem diversas vezes a uma resposta ou a um caminho! Foram inúmeros os aprendizados, desde o âmbito profissional até o âmbito pessoal, pelos quais sou muito grata! E além de conquistar um mestrado ao ser orientada por vocês, creio que também me tornei uma profissional muito mais preparada para atuar no meio científico! Conviver com grandes mestres como vocês, em um grupo de pesquisa tão conceituado foi uma oportunidade única! Sem dúvida, minha passagem pelo Centro de Memória será inesquecível! Foi emocionante aprender com vocês! Pela imensurável contribuição à minha formação acadêmica, muito obrigada!

Aos colegas do Centro de Memória, pessoas especiais, com quais aprendi muito e compartilhei meus dias durante o período em que realizei o curso de mestrado: Dra. Cristiane R. G. Furini, Dra. Natália Gindri Fiorenza, Prof. Dr. Fernando Benetti, Bianca Schmidt, Eduardo de Assis Brasil, Guilherme Sápiras, Lorena Evelyn, Lucas Marcondes, Luiza Fortes, Scheila Schmidt e mais recentemente, Carolina Zinn. Desejo para vocês muito sucesso em suas carreiras e felicidade em suas vidas! Agradeço em especial à Dra. Cristiane Furini por estar sempre disposta a uma boa discussão científica! Por dividirmos aprendizados, dúvidas, e por sempre estar disposta a compartilhar seus conhecimentos e sua experiência! Obrigada pelas contribuições à minha dissertação, pelo apoio e carinho! Também agradeço de forma especial ao aluno de iniciação científica Guilherme Sápiras por se mostrar disposto a entender e contribuir com os experimentos. Mesmo em meio a tantas disciplinas e compromissos da faculdade, sempre esteve dedicado e responsável com as atividades do laboratório e em especial com o projeto que envolveu o desenvolvimento de minha dissertação! Fico muito feliz por ter participado de tua formação acadêmica no Centro de Memória e fico muito grata pela sua companhia em longas horas de experimento e também pela amizade!

À minha amada mãe, obrigada por me apoiar, por confiar em mim, por ser forte, pelo teu amor incondicional, dedicação e por me fazer acreditar que o melhor momento ainda está por vir!

Ao meu irmão Felipe, por ser a minha maior motivação para querer ser alguém melhor a cada dia, por me ensinar que com amor podemos ser capazes de superar nossos limites!

À Izaque de Sousa Maciel, meu melhor amigo, um grande amor, minha paz, meus melhores momentos! Foram tantas as adversidades e decepções que enfrentei durante este período, que a conclusão desta etapa só foi possível com teu apoio. Obrigada por acrescentar beleza e razão aos meus dias, por ser tão especial e presente em minha vida!

Ao Vô Mozart e Vó Ina, obrigada por me acolherem com tanto amor e carinho em suas vidas! Obrigada pelo companheirismo e conselhos que me deram muita coragem e determinação para seguir em busca de meus ideais!

À Querida Prof. Dra. Temis Furlanetto Corte, agradeço muito por me proporcionar um grande amadurecimento profissional, e também, pessoal! Estar ao seu lado neste ano de 2013 na realização de meu estágio docente e também além deste período, foi uma experiência muito enriquecedora e fico grata e feliz por isso! Prof. Temis, agradeço por confiar em meu trabalho, pela paciência, pela alegria, por me motivar, por dividir suas experiências comigo, enfim, por me receber com tanto apreço em seu laboratório! Foi muito divertido e prazeroso aprender contigo mais uma vez, primeiro em minha graduação e agora no mestrado! Obrigada pelos seus valiosos ensinamentos que levarei comigo e aplicarei em minha vida profissional futura! Obrigada por me motivar, pelas palavras positivas, por me inspirar confiança e esperança! És um exemplo de sabedoria e humildade!

À Professora Dóris Helena Della Velentina pelas valiosas palavras que me conduziram a enxergar verdades sobre mim e sobre o mundo, a refletir e a realizar mudanças positivas!

À Prof. Dra. Maria Martha Campos, pelas inúmeras contribuições desde o período de minha iniciação científica! Obrigada pelo carinho, por sempre me receber tão bem em seu laboratório, pela companhia nos congressos de Farmacologia e pela disposição em me auxiliar nas minhas mais diversas dúvidas! Muito obrigada pelos seus ensinamentos e pelo seu exemplo de pesquisadora e professora!

Ao Prof. Dr. Weber Cláudio, meus sinceros agradecimentos por me auxiliar em inúmeras dúvidas! Fico muito grata, pois, sempre esteve disposto a dedicar seu tempo para me transmitir conhecimentos, sejam eles de neurociências, de estatística ou de cálculos farmacêuticos. Suas explicações sempre trouxeram paz a minha curiosidade, clareza aos meus pensamentos e confiança na aplicação de meus conhecimentos teóricos!

Ao Prof. Dr. Geraldo Attílio De Carli, fico muito grata e feliz por ter sido sua aluna de iniciação científica! Obrigada por incentivar meus acertos e corrigir meus erros! Através de sua orientação e dedicação me tornei alguém melhor e a profissional que sou hoje! Raros são os professores que dedicam alguns minutos do seu dia para saber como seus alunos se sentem em relação às atividades do laboratório ou para tomar um café e conversar um pouco, e o senhor sempre o fez com muita alegria! Sempre se mostrou próximo e amigo de seus alunos, dividindo seus magníficos conhecimentos de parasitologia e também sua experiência de vida! Pelo seu exemplo, pelos ensinamentos, muito obrigada!

A todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica desde a graduação até a conclusão do mestrado nesta instituição. Vocês me disponibilizaram todas as ferramentas necessárias para que eu pudesse crescer profissionalmente! Muito obrigada!

Aos professores que aceitaram fazer parte da comissão examinadora e contribuir com seus conhecimentos para enriquecer esta dissertação!

Agradeço também a todos os professores que estiveram presentes em minha formação no ensino fundamental e médio, sem vocês a conclusão desta etapa não seria possível!

Aos colegas e amigos que torceram por mim!

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) por me proporcionar a conquista de mais um ideal com toda infraestrutura necessária e oportunidades. Tenho muita estima e carinho pela Universidade que, durante a conclusão de minha graduação em Farmácia e agora com a conclusão do Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde, sempre me acolheu muito bem e foi minha segunda casa durante mais de sete anos!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de ensino superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão desta dissertação se tornasse possível.

Àquele que é infinitamente superior a tudo, obrigada pelo milagre da vida!

Apreendi que nossas qualidades podem atrair hostilidade, que dizer não é necessário em vários momentos, que errar nos torna humano e que recomeçar todos os dias é preciso! O que fica ao passarmos pelas adversidades é a experiência e o amadurecimento, fica a gratidão pela oportunidade de adquirir sabedoria! Agradeço à vida por fazer de mim uma eterna aprendiz!

Jessica Rosa

*“Muitas coisas da natureza, entre elas os estados hormonais, neuro-humorais ou emocionais e tantas outras que independem de nossa vontade, envolvem arte. Há arte no caminhar, na maneira de se mexer, na maneira de reagir, no recordar, e essa arte é sustentada, em parte, pelos hormônios e pela química peculiar do cérebro, que depende das emoções e dos estados de ânimo. Só que é uma arte da qual seu criador não é consciente. Como muitas “artes” das crianças, não por acaso chamadas assim.”*

(Izquierdo, 2010, p. 51)

## RESUMO

O desenvolvimento desta dissertação teve como objetivo investigar se a dependência de estado endógena ocorre durante a extinção de memória aversiva através de injeções sistêmicas de adrenalina, e, havendo esta constatação, analisar se a noradrenalina e a via do Núcleo do Trato Solitário (NTS) → Hipocampo/Amígdala Basolateral (HIP/ABL) participam deste processo. Para responder às questões levantadas nesta dissertação, ratos *Wistar* machos foram treinados na tarefa de esquiva inibitória (EI; 0,5 mA/2s). Após 24 h os animais foram expostos ao mesmo aparato, na ausência do estímulo elétrico (sessão de extinção). Para retenção da memória de extinção (sessão de teste) os animais foram novamente expostos à caixa de EI na ausência de estímulo elétrico, 24 h após a sessão de extinção. Foi observado que os animais que receberam a administração intraperitoneal (i.p.) de adrenalina (50 ou 100 µg/Kg) imediatamente após a sessão de extinção apresentaram um prejuízo na evocação da memória de extinção e este efeito é revertido pela administração i.p. de adrenalina (50 µg/Kg) 6 min antes da sessão de teste. Isto sugere dependência de estado. A noradrenalina (1 µg/lado) quando infundida intra-NTS antes da sessão de teste reverte o prejuízo da evocação da memória de extinção causado pela adrenalina i.p. quando administrada após a sessão de extinção. E a infusão intra-NTS de muscimol (0,01 µg/lado) antes da sessão de teste impede a dependência de estado induzida pela adrenalina. Além disso, os animais que receberam adrenalina i.p. após a sessão de extinção e, infusão intra-NTS de muscimol seguido da administração de noradrenalina intra-HIP ou intra-ABL antes da sessão de teste, restauraram a capacidade de evocar a memória de extinção que havia sido prejudicada pelo muscimol. Os resultados sugerem que a dependência de estado ocorre durante o processo de extinção da memória de EI e que a noradrenalina e a via NTS → HIP/ABL desempenham um papel importante na evocação da memória de extinção.

Palavras-chave: Extinção de memória aversiva. Dependência de estado. Adrenalina. Noradrenalina. Núcleo do Trato Solitário. Hipocampo. Amígdala Basolateral.

## ABSTRACT

We investigate whether the extinction of inhibitory avoidance (IA) learning can be subjected to endogenous state-dependence with systemic injections of epinephrine (E), and whether endogenous norepinephrine (NE) and the Nucleus Tractus Solitarius NTS → Hippocampus/Amygdala (HIPPP/BLA) pathway participate in this. Thus, rats trained in Inhibitory Avoidance Learning (IA; 0,5 mA/2s) were submitted to session of extinction 24 h apart: the animals were placed to the same apparatus but without the footshock. 24 h after the extinction session, they were tested for the retention of extinction. Results indicate that post-extinction training E (50 or 100 µg/kg) induced a poor retrieval of extinction in the test session of this task unless an additional E injection (50 µg/kg) was given prior to the extinction test. This suggested state-dependence. Muscimol (0,01 µg/side) microinfused into the NTS prior to the extinction test session blocked E-induced state-dependence. Norepinephrine (NE, 1 µg/side) infused bilaterally into NTS restores the extinction impairment caused by post-extinction training i.p. E. In animals that received post-extinction training injections E and 6 min before the extinction test bilateral NTS blockade induced by muscimol plus NE (1 µg/side) into the CA1 region of the dorsal hippocampus or into the basolateral amygdala restored the normal extinction levels that had been impaired by muscimol. These findings suggest that the state-dependence occurs during the extinction of the fear memory and that are a role for the NTS → HIPPP/BLA pathway in the retrieval of extinction.

Keywords: Fear extinction. State-dependence. Peripheral epinephrine. Central norepinephrine. NTS → hippocampus/amygdala pathway.



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DOS COMPONENTES DA MEMÓRIA COM RELAÇÃO À NATUREZA DE SEU CONTEÚDO .....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURA 2 - DIVISÃO DA MEMÓRIA DE TRABALHO QUANTO AO TEMPO DE DURAÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURA 3 - DESENHO ESQUEMÁTICO RELACIONADO AS FASES DA MEMÓRIA COM O TEMPO QUE PERDURAM .....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DOS PRINCIPAIS CIRCUITOS NEURAIS ENVOLVIDOS NA CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO E NA SUA EVOCAÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>FIGURA 5 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ATIVAÇÃO DA VIA NTS → HIP/ABL .....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 6 - MOMENTOS DE MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA NAS DIFERENTES FASES DA MEMÓRIA .....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 7 - VISTA GERAL DO EQUIPAMENTO DE CIRURGIA ESTEREOTÁXICA .....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA 8 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO PROTOCOLO COMPORTAMENTAL DE ESQUIVA INIBITÓRIA .....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 9 - DESENHO ESQUEMÁTICO DOS MOMENTOS DE INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA DURANTE A EXECUÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ESQUIVA INIBITÓRIA. ....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 10 - ESTRUTURA MOLECULAR EM 2D DA ADRENALINA E DA NORADRENALINA.....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 11 - ESTRUTURA MOLECULAR 2D DO COMPOSTO FARMACOLÓGICO MUSCIMOL ....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 12 - DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DA MANCHA DE AZUL DE METILENO .....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- µl – Microlitros
- ABL – Amígdala Basolateral
- ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
- AP – Antero-posterior
- CA – *Cornu Ammonis*
- cm – Centímetros
- CPF – Córtex Pré-frontal
- CRF – Hormônio liberador de corticotrofina
- DV – Dorso-ventral
- EI – Esquiva Inibitória
- GABA – Ácido gama-aminobutírico
- HIP – Hipocampo
- i.p. – Intraperitoneal
- Kg – Kilograma
- LC – Locus Coeruleus
- LL – Latero-lateral
- mA – Miliampére
- MCD – Memória de curta duração
- mg – Miligrama
- min – Minutos
- MLD – Memória de longa duração
- mm – Milímetros
- mm – Milímetros
- MT – Memória de trabalho
- NTS – Núcleo do Trato Solitário
- PGi – Nucleus Paragigantocellularis
- SNC – Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	Memória: Conceito, classificação e fases de formação	15
1.2	Estruturas encefálicas envolvidas na extinção de memórias	20
1.3	Modulação de memórias	24
1.4	A dependência de estado	27
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
4.1	Objetivo geral	33
4.2	Objetivos específicos	33
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
5.1	Amostra	34
5.2	Cirurgia estereotáxica	34
5.3	Manipulação dos animais	36
5.4	O paradigma de esquiva inibitória	36
5.5	Intervenção farmacológica	39
5.6	Histologia	43
5.7	Análise estatística	44
<b>6</b>	<b>ARTIGO ORIGINAL</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO A</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXO B</b>	<b>82</b>
	<b>ANEXO C</b>	<b>96</b>
	<b>ANEXO D</b>	<b>97</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

A introdução desta dissertação apresenta os conceitos que formaram a base para o desenvolvimento deste estudo. Com o objetivo de facilitar o entendimento do leitor, a mesma foi dividida em cinco sessões secundárias. Inicialmente será descrito o conceito de memória, sua classificação e fases de formação. A segunda sessão comenta sobre o papel de algumas estruturas encefálicas importantes para o processo de extinção da memória aversiva, tais como o Hipocampo e a Amígdala, bem como a via de conexão entre elas. Para finalizar, a terceira e a quarta sessões abordam os temas norteadores desta dissertação: modulação de memórias e os mecanismos de dependência de estado.

### **1.1 Memória: Conceito, classificação e fases de formação**

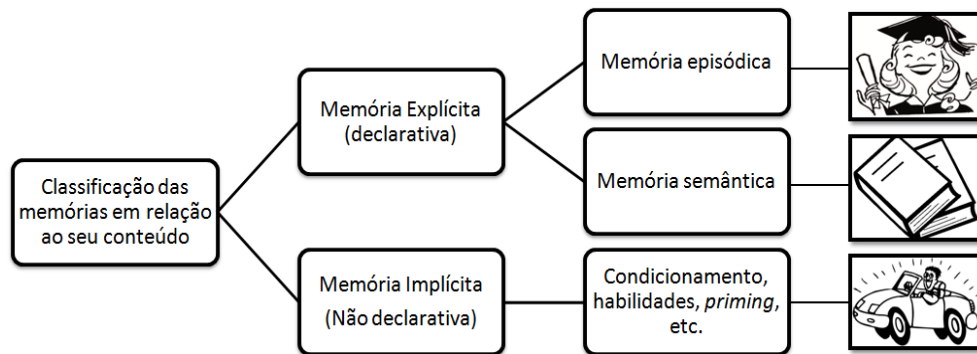
A memória, sob a perspectiva neurobiológica, pode ser definida como a retenção da informação aprendida (ANDERSON; SLOTKIN, 1975; BEAR, 2002). Podemos dizer que a memória é resultante da capacidade de lembrarmos experiências/aprendizados previamente adquiridos e armazenados (IZQUIERDO, 2002; KOLB; WHISHAW, 2002). Sabemos quem somos e onde estamos devido a nossa capacidade de aprender e lembrar. Nosso conhecimento sobre o mundo, a nossa identidade, a forma como nos relacionamos com outros seres humanos e o nosso meio, são consequências da formação de memórias (IZQUIERDO, 2002; SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010; SQUIRE et al., 2003).

É importante destacar que o aprendizado e a memória estão intimamente conectados (SQUIRE et al., 2003) que não há memória sem que ocorra o aprendizado, entretanto, nem todo aprendizado forma uma memória. A diferença entre aprendizado e memória é sutil. O aprendizado refere-se à aquisição de novos saberes ou novas capacidades, contudo, nem sempre armazenamos todas as informações aprendidas ao longo da vida, muitas são filtradas pelo nível de alerta, ansiedade e estado de ânimo (IZQUIERDO, 2002). As informações que são registradas pelo sistema nervoso central (SNC) e posteriormente podem ser lembradas, referem-se à memória (BEAR, 2002; IZQUIERDO, 2002; SQUIRE et al., 2003)(ANDERSON; SAAD; CALVANO, 2005; BEAR, 2002).

Os avanços nos estudos sobre a memória permitiram à neurociência classificá-la em relação à natureza de seu conteúdo ou em relação ao seu tempo de duração. Quanto à natureza de seu conteúdo, as memórias podem ser divididas em memórias explícitas ou declarativas, e memórias implícitas ou não declarativas (BEAR, 2002; IZQUIERDO, 2002; SQUIRE et al., 2003).

As memórias explícitas dependem da atividade neuronal do hipocampo e estruturas relacionadas ao lobo temporal (IZQUIERDO et al., 2006) e podem ser subdivididas em episódica e semântica. As memórias episódicas nos permitem evocar detalhes sobre eventos ocorridos no passado e responder perguntas como “o que”, “onde” e “quando” (SANDRINI et al., 2013). São memórias em que o indivíduo esteve presente passiva ou ativamente, por exemplo, assistir a formatura de um filho ou a sua própria formatura (eventos autobiográficos) (BURIANOVA; MCINTOSH; GRADY, 2010; CONWAY, 2009; IZQUIERDO, 2002; KOMPUS et al., 2009; RENOULT et al., 2012). Enquanto a memória semântica refere-se a conhecimentos de ordem geral desde que não tenham referências espacial ou temporal, tais como a língua portuguesa, a filosofia e os conceitos de palavras (BURIANOVA; MCINTOSH; GRADY, 2010; DICKERSON; EICHENBAUM, 2009; IZQUIERDO, 2002; KOMPUS et al., 2009; RENOULT et al., 2012).

As memórias implícitas requerem a atividade do *striatum* e suas conexões (IZQUIERDO et al., 2006). Compreendem as memórias para habilidades motoras, a habituação (decréscimo da resposta a estímulos benignos repetidos), o *priming*, (evocação de memórias sob a apresentação de uma dica) e também aquelas decorrentes do treinamento em tarefas de condicionamento clássico, que será explicado na próxima sessão desta introdução (BEAR, 2002; IZQUIERDO, 2002; SCHUCHARD; THOMPSON, 2013).



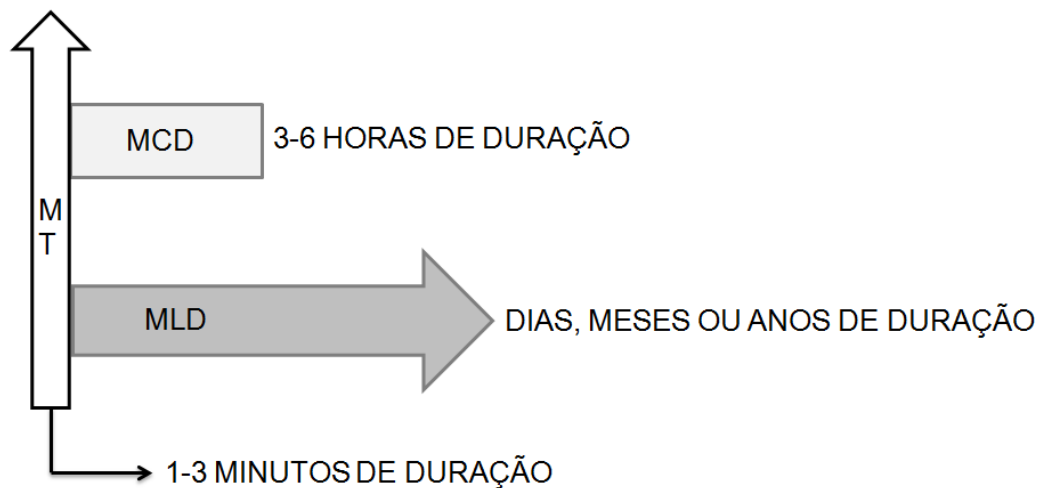
**Figura 1 - Desenho esquemático dos componentes da memória com relação à natureza de seu conteúdo.** Fonte: Adaptado de Baddeley et al., 2011.

Quanto ao tempo de duração e função, as memórias podem ser: memória de trabalho, memórias de curta duração e memórias de longa duração. A memória de trabalho (MT) é processada pela atividade neural no córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2002; ZANTO et al., 2011). Quando escutamos uma frase, não lembramos exatamente de todas as palavras ditas, porém a memória de trabalho nos fornece, em questão de segundos, a informação proveniente da frase dita. É este tipo de memória que determina se a informação é nova para o indivíduo e se deve ser armazenada. Seu papel é unicamente analisar as informações provenientes do ambiente, e não perdura mais do que 1 - 3 minutos (BADDELEY, 1992; D'ESPOSITO et al., 1995; IZQUIERDO, 2002; SCHUCHARD; THOMPSON, 2013).

As memórias de curta duração (MCD) armazenam poucas informações por um período de 3 a 6 horas. Formamos continuamente memórias de curta duração e a usamos para lembrarmos o que aconteceu há algumas horas atrás e darmos continuidade ao nosso tempo presente (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE et al., 2003).

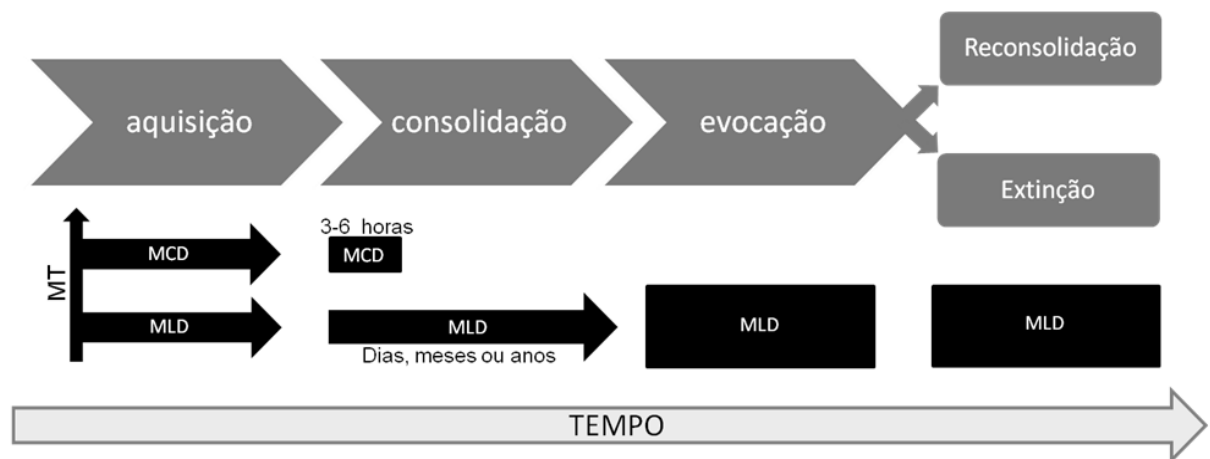
Já as memórias de longa duração (MLD) referem-se àquelas armazenadas durante um longo período de tempo, podem durar dias, meses ou anos (Izquierdo et al., 1999; Quevedo et al., 2002). A sua formação envolve a ocorrência de eventos bioquímicos na região CA1 do hipocampo dorsal e em suas projeções (Izquierdo et al., 1999), originando novas conexões sinápticas (IZQUIERDO et al., 1999; QUEVEDO et al., 2003) (IZQUIERDO, 2002; KANDEL, 1997; MCGAUGH, 2000).

Durante muitos anos foi discutido se a MCD e a MLD eram processos consecutivos (se a MCD era uma fase inicial da MLD) ou se eram processos independentes. Izquierdo e colaboradores (1998) demonstraram que alguns tratamentos farmacológicos que bloqueiam a MCD deixam a MLD intacta. Assim, mesmo que estes sistemas de memória compartilhem algumas estruturas encefálicas para o seu processamento, tais como a região CA1 do hipocampo dorsal, o córtex entorrinal e córtex parietal (IZQUIERDO et al., 1999; QUEVEDO et al., 2003), são separados em algum grau. Outra característica marcante que diferencia a MCD da MLD é a propriedade particular desta última em requerer a síntese de novas proteínas em sua formação (BEKINSCHTEIN et al., 2008; MYSKIW, 2008; ROSSATO et al., 2007).



**Figura 2 - Divisão da memória quanto ao tempo de duração.** MT = Memória de trabalho; MCD = Memória de curta duração; MLD = Memória de longa duração. Adaptado de Izquierdo, 2002.

O processo de formação e conservação da memória de longa duração envolve algumas fases. A fase de aquisição constitui a fase em que ocorre a aprendizagem, cujo conceito foi abordado anteriormente nesta introdução. Em seguida inicia-se a fase denominada consolidação, processo pelo qual as memórias são armazenadas de forma estável (AKIRAV; MAROUN, 2012, 2012; ALBERINI; LEDOUX, 2013; DE LA CRUZ et al., 2008; IZQUIERDO et al., 2006; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Uma vez consolidada, as memórias podem ser evocadas, fase que envolve a rápida recapitulação de uma informação previamente armazenada (MEI et al., 2011), e isto comprova que o aprendizado realmente gerou uma memória (IZQUIERDO, 2002). A memória evocada torna-se instável (IZQUIERDO; BEVILAQUA; CAMMAROTA, 2006) e esta pode seguir por dois processos distintos: a reconsolidação ou a extinção. No processo de reconsolidação, novas informações podem ser integradas ao conteúdo de uma memória, permitindo a sua modificação (ALBERINI; LEDOUX, 2013; CURRAN; ROBBINS, 2013; SANDRINI et al., 2013). Já o processo de extinção consiste em um novo aprendizado que se sobrepõe ao aprendizado original, ou seja, uma nova memória que inibe a evocação de uma determinada memória previamente consolidada (FIORENZA et al., 2011, 2012; FURINI et al., 2013). Ambos os processos dependem da síntese de novas proteínas (BAILEY; BALSAM, 2013; MAMIYA et al., 2009; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; VIANNA et al., 2001).



**Figura 3 - Desenho esquemático relacionado as fases da memória com o tempo que perduram.** MT: memória de trabalho; MCD: memória de curta duração; MLD: memória de longa duração. Fonte: Adaptado de Mello-Carpes, 2010.

O processo de extinção foi documentado pela primeira vez em 1927 pelo cientista russo Iván Pavlov. Inicialmente este observou que ao apresentar um pedaço de carne para cães, estes salivavam (resposta incondicionada). Em seu experimento pareou diversas vezes um som (estímulo neutro/condicionado) com a apresentação da carne (estímulo biologicamente significativo/incondicionado), e descobriu que ao apresentar somente o som (na ausência da apresentação do alimento) aos cães, esses emitiam uma resposta condicionada de salivação. Este processo denomina-se condicionamento Pavloviano ou condicionamento clássico. Interessantemente, observou também que a repetida apresentação do estímulo condicionado na ausência do estímulo incondicionado produzia um gradual decréscimo na resposta condicionada, processo que recebeu o nome de extinção (FURINI et al., 2013; MUELLER; CAHILL, 2010; ORSINI; MAREN, 2012; RESCORLA, 2004).

Um fator determinante para que o processo de extinção ocorra é o tempo de exposição ao estímulo condicionado, que precisa ser longo, caso contrário, se a exposição for breve, não será suficiente para formar a memória de extinção (MUELLER; CAHILL, 2010; PEDREIRA; MALDONADO, 2003; SUZUKI et al., 2004). Ainda, é importante destacar que a extinção não é uma forma de esquecimento (não se deve a perda de memória), mas sim uma diminuição da resposta condicionada devido à apresentação do estímulo condicionado na ausência do estímulo incondicionado, desvinculado de recompensas ou punição (BENTZ et al., 2013;



FIORENZA et al., 2011; KAPLAN; MOORE, 2011; MONFILS et al., 2009; ORSINI; MAREN, 2012; PIZZORUSSO, 2009). No esquecimento real as memórias desaparecem pela ausência prolongada de sua evocação, por atrofia sináptica (IZQUIERDO; BEVILAQUA; CAMMAROTA, 2006) ou ocasionadas por patologias, como na doença de Alzheimer (EL HAJ; KESSELS, 2013).

A extinção possui uma enorme importância fisiológica e/ou adaptativa, visto que evocar excessivos detalhes de memórias com conteúdo emocional doloroso ou aterrorizante de forma recorrente causaria estragos em nossa saúde emocional, viveríamos em constante estado de depressão (IZQUIERDO, 2002).

Por tratar-se de um novo aprendizado, a memória de extinção necessita ser consolidada (BERLAU; MCGAUGH, 2006; WICHERT; WOLF; SCHWABE, 2013), e requer a participação de diversas estruturas encefálicas para o seu processamento, tais como o hipocampo e a amígdala (BERLAU; MCGAUGH, 2006; FIORENZA et al., 2012; KAPLAN; MOORE, 2011; ORSINI; MAREN, 2012), cuja importância será abordada na próxima sessão desta introdução.

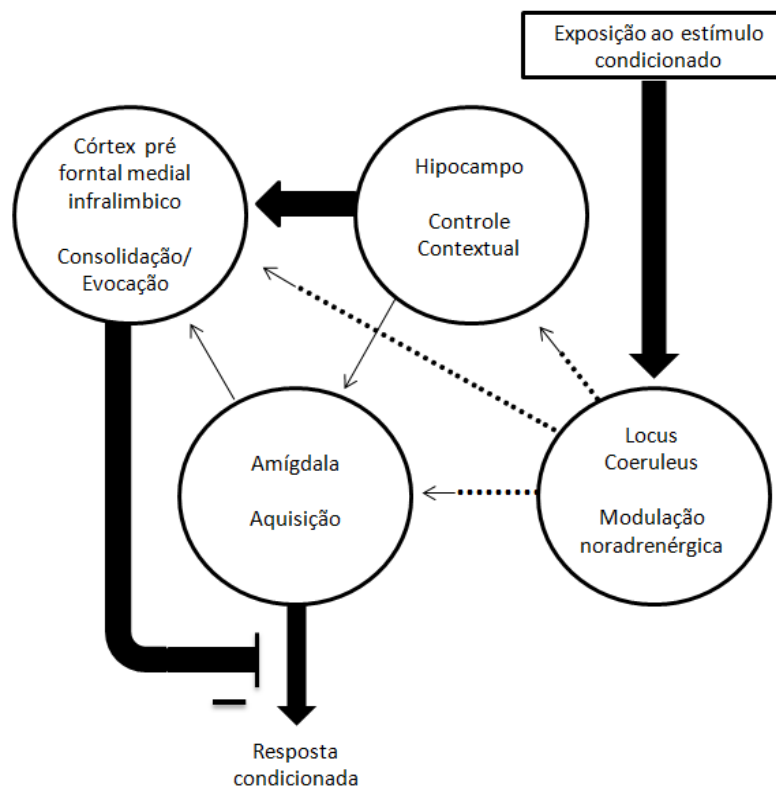
## **1.2 Estruturas encefálicas envolvidas na extinção de memórias**

O Hipocampo e a Amígdala desempenham um papel crucial na consolidação de memória aversiva (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000), e também participam do processo de evocação juntamente com o Córtex Pré-frontal (BARROS et al., 2001; RISIUS et al., 2013). Estas mesmas estruturas também são essenciais para o processo de extinção (FIORENZA et al., 2012; MUELLER; CAHILL, 2010; MUELLER; PORTER; QUIRK, 2008; ORSINI; MAREN, 2012; ORSINI; YAN; MAREN, 2013; PARSONS; RESSLER, 2013; VIANNA; COITINHO; IZQUIERDO, 2004).

O Hipocampo é uma estrutura em forma de um “C” situado na parte caudal do cérebro, e é dividido em três sub-regiões: o Giro Denteado (DG), o Subículo e o Hipocampo (HIP) propriamente dito, que consiste das regiões CA1, CA2 e CA3 (Strien et al., 2009). A denominação CA para classificar as regiões do HIP vem do termo em latim *Cornu Ammonis*, que significa Corno de Ammon (PORTO, 2006). Das três regiões, a CA1 é a que parece realmente estar envolvida com funções cognitivas de aprendizado e memória (FIORENZA et al., 2012; MYSKIW et al., 2010; MELLO-CARPES, 2010).

Outra estrutura que estrutura cerebral que participa das funções cognitivas junto com o HIP é amígdala (ABL), sendo esta, uma estrutura em forma de amêndoa, bem delimitada, localizada no lobo temporal (LEDOUX, 2000; PORTO, 2006). Consiste de aproximadamente 12 diferentes regiões que são divididas em sub-regiões, sendo a basolateral, a de maior relevância para o estudo dos processos envolvidos na extinção de memórias (LEDOUX, 2000; ORSINI; MAREN, 2012; ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009), pois, está envolvida no aprendizado de condicionamento ao medo, regulando a formação e o armazenamento de memórias, através de suas conexões com outras áreas do cérebro, tais como o Hipocampo e o Córtex Pré-frontal infralímbico (BERLAU; MCGAUGH, 2006; BOCCIA et al., 2009; MCGAUGH, 2002, 2004).

Há uma robusta e recíproca conexão entre a região CA1 do Hipocampo e a ABL (ORSINI; MAREN, 2012; ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009) conforme ilustra o desenho esquemático abaixo:



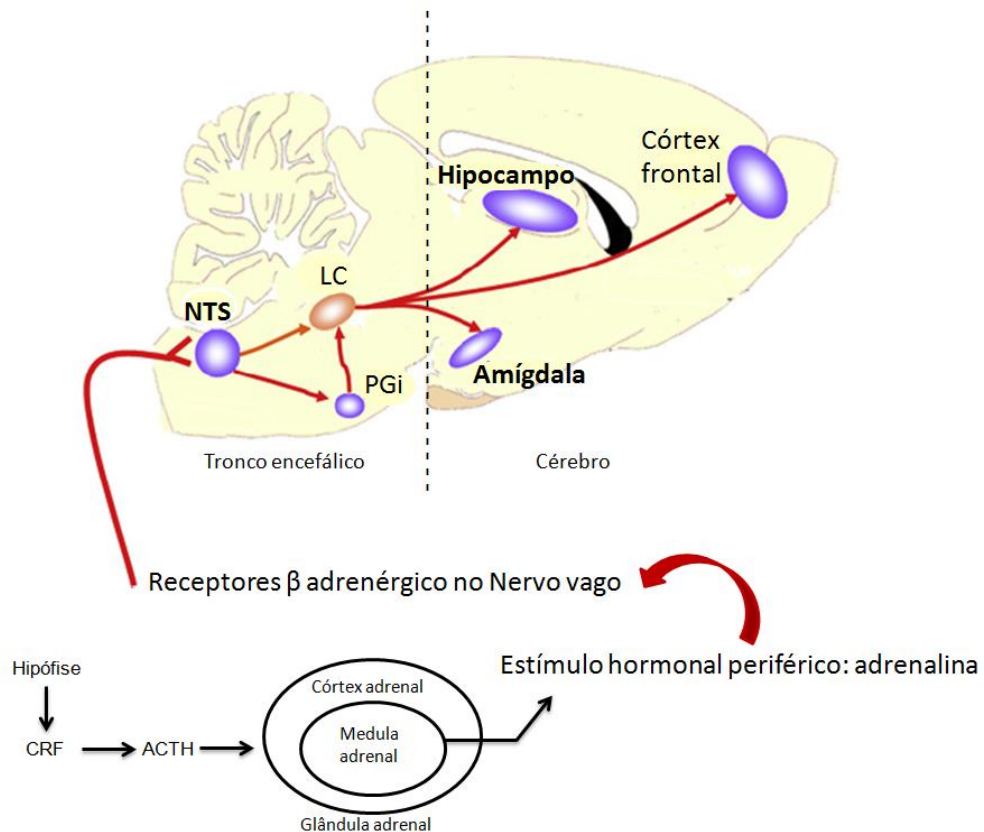
**Figura 4 - Desenho esquemático dos principais circuitos neurais envolvidos na consolidação da extinção e na sua evocação.** A exposição ao estímulo condicionado faz com que o *Locus Coeruleus* ative as principais estruturas responsáveis pela extinção através da liberação de noradrenalina. A amígdala está envolvida e faz a associação/dissociação entre o estímulo condicionado e o estímulo incondicionado. O córtex pré-frontal infralímbico integra a informação do estímulo condicionado com a informação contextual oriunda do hipocampo e determina a evocação da memória de extinção. Adaptado de Mueller & Cahill, 2010.

Além do HIP e da ABL, outra estrutura encefálica que merece destaque é o *Locus Coeruleus* (LC). Considerado o maior núcleo produtor de noradrenalina do sistema nervoso central e, seus milhares de neurônios noradrenérgicos se projetam por todo o encéfalo (MUELLER; CAHILL, 2010). A noradrenalina é extremamente importante para a modulação de diferentes processos relacionados à plasticidade sináptica, em especial a memória, no qual tem sido bastante investigada. Estudos em animais evidenciaram que a infusão de noradrenalina intra-ABL melhora a consolidação da extinção, de uma maneira dose e tempo dependentes (BERLAU; MCGAUGH, 2006; KAPLAN; MOORE, 2011; MIYASHITA; WILLIAMS, 2004; MUELLER; CAHILL, 2010). Williams e colaboradores (1998) demonstraram que há um aumento nos níveis de noradrenalina na amígdala após a administração periférica de adrenalina, mas este efeito não é observado quando o Núcleo do Trato Solitário (NTS) é inativado, sugerindo assim, que o NTS, parece ser a interface entre a ativação adrenérgica periférica e os processos que regulam a consolidação de memórias (FERRY; L., 2012; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011).

A adrenalina, hormônio liberado na circulação periférica em resposta do organismo a eventos com conteúdo emocional (positivo ou negativo) não atravessa a barreira hematoencefálica. Seus efeitos mnemônicos parecem depender, pelo menos em parte, da ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no nervo vago ascendente (MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013; ROESLER; SCHRÖDER, 2011; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011; WONG et al., 2011). A possibilidade de que fibras ascendentes do nervo vago pudessem provocar efeitos no sistema nervoso central, mediado por mecanismos adrenérgicos periféricos, foi originalmente proposta por Izquierdo e colaboradores em 1959 (IZQUIERDO et al., 1959; MCINTYRE; MCGAUGH; WILLIAMS, 2012; PEÑA; ENGINEER; MCINTYRE, 2013), sendo que, até hoje essa hipótese vem sendo sustentada por diversos trabalhos (CLAYTON; WILLIAMS, 2000b, 2000c; MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013; PEÑA; ENGINEER; MCINTYRE, 2013).

Ainda, estudos sugerem que o estímulo decorrente da ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no nervo vago ascendente, segue através de sinapses glutamatérgicas até o NTS (MCINTYRE; MCGAUGH; WILLIAMS, 2012; MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013). O NTS regula a atividade noradrenérgica no prosencéfalo, através de projeções neuronais ao *Nucleus paragigatocellularis* (PGi). Tanto o PGi, quanto o NTS, possuem conexões sinápticas com o LC

(ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011), e este por sua vez, projeta fibras noradrenérgicas ao Hipocampo e a Amígdala (FERRY; L., 2012; MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013). Assim, o NTS, o HIP e a ABL parecem formar um circuito neural importante para a formação de memórias (WONG et al., 2011).



**Figura 5 - Desenho esquemático da ativação da via NTS → HIP/ABL.** Em experiências com forte conteúdo emocional o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na circulação hipotálamo-hipofisária, estimulando a liberação de do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para a circulação geral e este, por sua vez, estimula a liberação de adrenalina pela medula adrenal. A adrenalina ativa os receptores β – adrenérgicos localizados no nervo vago ascendente, e o estímulo segue pelas projeções do Núcleo do Trato Solitário (NTS) resultando na ativação do sistema noradrenérgico no Hipocampo e na Amígdala. Adaptado de: Mello-Carpes, 2010 e Christa et al., 2012.

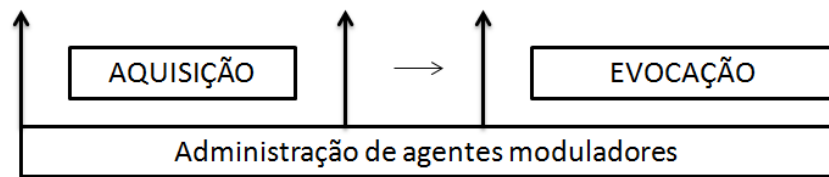
Estudos já demonstram a importância da via do NTS → HIP/ABL no processo de consolidação de memórias (CLAYTON; WILLIAMS, 2000a, 2000b; MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013; WILLIAMS et al., 1998), mas não tem sido estudado o seu papel na extinção e evocação de memórias aversivas.

### 1.3 Modulação de memórias

Um estudo publicado por Lashey, em 1917, demonstrou que a administração subcutânea de estriquinina em ratos, antes do treino na tarefa de labirinto gráfico circular, facilitava a consolidação dessa memória. Após esse estudo, foi compreendido que substâncias exógenas podiam agir sobre os mecanismos de formação de memória, ou seja, que a memória pode ser modulada (LASHLEY, 1917; MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2009; ROESLER; SCHRÖDER, 2011; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011).

Desde então, muitos pesquisadores, de diferentes partes do mundo, têm dedicado esforços para investigar a neurofisiologia da modulação da memória, que conceitualmente refere-se a influência de drogas, neurotransmissores ou hormônios sobre as fases de formação e conservação da memória (CAHILL; MCGAUGH, 1996; MCGAUGH, 2004; QUEVEDO et al., 2003; ROESLER; SCHRÖDER, 2011; TULLY; BOLSHAKOV, 2010). Este sistema é considerado uma ferramenta muito útil, apesar de indireta, para se estudar as bases neurobiológicas envolvidas nas diferentes fases de processamento da memória (QUEVEDO et al., 2003). Isso é possível porque durante os estágios iniciais da aquisição e consolidação, e após a evocação, a memória encontra-se labilizada e pode, então, ser modificada (BARROS et al., 2001; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000; MONFILS et al., 2009; NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; SZAPIRO et al., 2003; WICHERT; WOLF; SCHWABE, 2013).

Agentes neuromodulatórios, como por exemplo agonistas noradrérgicos (MUELLER; PORTER; QUIRK, 2008) ou agonistas colinérgicos (BOCCIA et al., 2009), podem produzir diferentes efeitos, deletérios ou benéficos, dependendo da estrutura encefálica, fatores ambientais/emocionais e da fase do processo mnemônico em que estão agindo: aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e/ou extinção (ROESLER; SCHRÖDER, 2011; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011).



**Figura 6 - Momentos de modulação farmacológica nas diferentes fases da memória.** A administração de agentes moduladores antes da fase aquisição afeta tanto o aprendizado quanto a consolidação deste. Já a administração unicamente após a aquisição, afeta exclusivamente a consolidação. Os tratamentos administrados antes das sessões de evocação são usados para investigar a influência destes sobre a expressão de memórias. Adaptado de Roeler & Shröder, 2011.

A extinção, assim como outras formas de aprendizado, pode ser modulada por um sistema neuro-humoral endógeno (KISHIMOTO; KANO, 2006; LI et al., 2014), por tratamentos farmacológicos ou agentes exógenos (BENETTI; IZQUIERDO, 2013; BEVILAQUA et al., 2008), por mecanismos de *synaptic tagging* (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2012), e mecanismos epigenéticos (MAREK et al., 2011).

Com o objetivo de verificar os efeitos de diferentes sistemas sobre a memória de extinção, Fiorenza e colaboradores (2012) desenvolveram um estudo em que administraram diferentes tratamentos, individualmente, logo após a sessão de extinção em três regiões cerebrais distintas, em ratos: região CA1 do Hipocampo dorsal, Amígdala Basolateral e Córtex Pré-Frontal Ventromedial. Os efeitos sobre a consolidação da memória de extinção, dos diferentes tratamentos, nas diferentes estruturas encefálicas foram observados em duas tarefas aversivas distintas: condicionamento clássico e condicionamento operante. Os pesquisadores concluíram que a memória de extinção pode ser modulada pelos sistemas histaminérgico, dopaminérgico, glutamatérgico e noradrenérgico, e que os efeitos destes sistemas variam conforme a tarefa comportamental empregada e também os sítios cerebrais estudados.

A memória também poder ser modulada pelas emoções e pelos estados de ânimos. Estes possuem grande capacidade de influenciar os processos mnemônicos (IZQUIERDO, 2002). As respostas fisiológicas iniciadas durante a exposição a eventos com conteúdo emocional, negativo ou positivo, modulam fortemente a consolidação de novas memórias (FERRY; L., 2012; MCGAUGH, 2004; MUELLER; CAHILL, 2010), ou seja, a emoção determina a qualidade do armazenamento (MUELLER; PORTER; QUIRK, 2008). Quanto maior o impacto emocional, mais

intenso é o registro da memória. A consolidação de uma memória aversiva, por exemplo, pode ser facilitada por um sistema modulatório endógeno, mediado pela liberação de hormônios do estresse e pela ativação da amígdala cerebral no momento de sua aquisição (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011). De um modo geral o estresse pode melhorar ou prejudicar a formação e evocação de memórias em animais e em humanos (CHEN; WILLIAMS, 2012; KAOUANE et al., 2012; OLVER et al., 2014). Seus efeitos dependem do tempo de exposição ao fator estressante, da natureza da experiência vivida e de características do indivíduo como sexo e idade (AKIRAV; MAROUN, 2012; IZQUIERDO, 2002; MERZ et al., 2013).

A modulação da memória emocional envolve a liberação de noradrenalina em diferentes estruturas encefálicas (MUELLER; CAHILL, 2010; MUELLER; PORTER; QUIRK, 2008), de hormônio adrenocorticotrófico pela hipófise anterior, de vasopressina pela hipófise posterior, e de glicocorticoides e adrenalina pela glândula supra-renal (CAHILL; MCGAUGH, 1996; IZQUIERDO; DIAS, 1983a, 1983b; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000; WONG et al., 2011).

O papel da adrenalina na modulação de memórias tem sido amplamente estudado (CLAYTON; WILLIAMS, 2000a; INTROINI-COLLISON; MCGAUGH, 1986; IZQUIERDO; DIAS, 1983b; JACOTTE-SIMANCAS et al., 2013; LIANG; BENNETT; MCGAUGH, 1985; WILLIAMS et al., 1998). Gold e Van Buskirk (1975) foram os primeiros a reportar que a administração periférica de adrenalina em ratos, após o treino na tarefa de esquiva inibitória, melhora a retenção da memória aversiva (ROESLER; SCHRÖDER, 2011; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011). Estudos seguintes confirmaram que o aumento nos níveis de adrenalina periférica, induzido por um impacto emocional ou pela administração exógena, modula fortemente as memórias provenientes de experiências marcantes em ratos (CHEN; WILLIAMS, 2012) e em humanos (CAHILL; ALKIRE, 2003). Utilizando técnicas bioquímicas de microdiálise e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pesquisadores conseguiram demonstrar que os efeitos mnemônicos deste hormônio parecem depender da ativação do sistema noradrenérgico na amígdala (CHEN; WILLIAMS, 2012; WILLIAMS et al., 1998) e também de uma coativação do sistema noradrenérgico no hipocampo (MIYASHITA; WILLIAMS, 2004).

Além dos exemplos aqui apresentados, uma importante forma de modulação da memória é a dependência de estado, cujo tema encerra a introdução desta dissertação.

#### 1.4 A dependência de estado

A dependência de estado refere-se a substâncias exógenas ou endógenas, que são capazes de modular a memória em dois momentos: durante a consolidação e durante a evocação. Neste processo, a recordação de determinadas memórias somente é possível se o sujeito estiver em um contexto sensorial e estado fisiológico muito semelhante ao que ocorreu durante a fase de aquisição/consolidação (IZQUIERDO, 2002; JAMALI-RAEUFY et al., 2011; MUELLER; CAHILL, 2010; OVERTON, 1978; SHULZ et al., 2000), ou seja, quando o conjunto das alterações endógenas (estado neuro-humoral e hormonal) provocadas no momento em que estas foram adquiridas se repete .

Dados da literatura científica da década de 60 e 70 já descreviam o processo de dependência de estado. Porém, esses estudos se referiam somente à influência de agentes como benzodiazepínicos e anfetaminas (BUSTAMANTE et al., 1970), álcool (GOODWIN et al., 1969), e também de hormônios periféricos (GRAY, 1975) modulando a consolidação e evocação de memórias. Zornetzer, em 1978, propôs que um padrão de ativação específico presente no cérebro durante a fase de aquisição de uma memória, poderia se tornar um componente integral de seu armazenamento. Assim, para que essa memória pudesse ser evocada de forma efetiva, o cérebro deveria “reproduzir” esse padrão de ativação. Este foi o primeiro relato propondo a participação de neurotransmissores no processo de dependência de estado, ao que o autor chamou de “novo fenômeno neurofarmacológico” (IZQUIERDO; DIAS, 1983a; ZORNETZER, 1978).

A dependência de estado ocorre geralmente através de experiências emocionais. Nestas ocasiões há hipersecreção de neurotransmissores ou neuromoduladores ( $\beta$ -endorfina, noradrenalina, serotonina) e hormônios do estresse (adrenalina, glucocorticóides, vasopressina e ACTH) (IZQUIERDO; DIAS, 1983a, 1983b; IZQUIERDO, 2002; MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1997; ROOZENDAAL, 2003). Assim, o conjunto de alterações fisiológicas decorrentes da resposta do organismo a situações adversas, funciona como uma “pista” para posterior evocação (IZQUIERDO, 2010).

As pessoas e os animais evocam melhor uma memória ansiogênica, aversiva ou estressante, quando colocadas novamente numa situação ansiogênica, aversiva ou estressante, similar a da fase de aquisição/consolidação da memória ou então,



quando recebem uma administração de hormônios do estresse, em uma dose que faça a concentração sanguínea se aproximar a da fase de aquisição (IZQUIERDO; DIAS, 1983a, 1983b; IZQUIERDO; FERREIRA, 1989; IZQUIERDO; NETTO, 1985).

Izquierdo e colaboradores (1983) demonstraram que a administração intraperitoneal (i.p.) em ratos, de agentes como o hormônio adrenocorticotrófico, a  $\beta$ -endorfina, a adrenalina e a tiramina, antes da sessão de teste em esQUIVA inibitória, reverte o prejuízo observado na evocação da memória causado pela administração da mesma substância após a sessão de treino. Evidenciando assim, a dependência de estado no processo de consolidação de memória aversiva. Isto ocorre porque as memórias submetidas à dependência de estado ficam inacessíveis à evocação (IZQUIERDO, 2010), e somente podem ser evocadas mediante a recriação das condições específicas presentes no momento da aquisição (IZQUIERDO, 1984).

As alterações fisiológicas que compõem um determinado estado neuro-humoral e hormonal endógeno podem ser provocadas por experiências emocionais, conforme abordado anteriormente, ou por agentes exógenos, tais como: a morfina (COLPAERT, 1991; MARIANI et al., 2011; PATTI et al., 2005), os peptídeos opióides (IZQUIERDO; DIAS, 1981), os antagonistas do receptor de glutamato N-metil D-aspartato (NMDA) (JACKSON; KOEK; COLPAERT, 1992), o etanol (REZAYOF et al., 2008; SANDAY et al., 2013a), anfetamina (SANDAY et al., 2013b), entre outros (ALIJANPOUR; REZAYOF, 2013; JAMALI-RAEUFY et al., 2011; PETERSEN; GHONEIM, 1980).

A modulação da memória emocional através da dependência de estado possui grande importância adaptativa/evolutiva, permitindo o reforço de memórias relevantes para a nossa sobrevivência, tais como a detecção de ameaças, permitindo que ativemos os mecanismos de defesa necessários para nos mantermos a salvo (BILKEI-GORZO et al., 2012; IZQUIERDO, 2002; WONG et al., 2011). Contudo, a evocação destas memórias, em momentos inapropriados e de forma recorrente, induz a distúrbios de ansiedade, síndrome do pânico e transtorno de estresse pós-traumático (CALISKAN; ALBRECHT, 2013; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2012; PIZZORUSSO, 2009; QUEVEDO et al., 2003), e a incapacidade de extinguir este tipo de memória constitui um sintoma chave em desordens psiquiátricas (MORRISON; RESSLER, 2013).

A literatura científica que aborda os mecanismos envolvidos no processo de dependência de estado ainda é escassa, e os circuitos neurais envolvidos neste

processo foram pouco analisados. Ainda há muito a ser elucidado a respeito deste tema, tão importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na etiologia e tratamento de desordens cognitivas e psiquiátricas. A grande relevância deste estudo se respalda na falta de dados científicos, capazes de comprovar a existência da dependência de estado na consolidação da extinção de memória aversiva.

## 2 HIPÓTESE

Em situações de estresse o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina na circulação hipotálamo-hipofisária, estimulando a liberação de ACTH para a circulação geral e este, por sua vez, estimula a liberação de adrenalina pela medula adrenal (AKIRAV; MAROUN, 2012; BREMNER, 2006; WONG et al., 2011).

Izquierdo e colaboradores (1983) demonstraram que a administração de adrenalina i.p. em ratos antes da sessão de teste em esQUIVA inibitória, reverte o prejuízo observado na evocação da memória causado pela administração desta mesma substância após a sessão de treino, evidenciando a dependência de estado no processo de consolidação de memória aversiva. Uma das maiores questões acerca deste processo: como a adrenalina, uma catecolamina polar, que não atravessa a barreira hematoencefálica, exceto em uma pequena região no hipotálamo (FERRY; L., 2012; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011; WEIL-MALHERBE; AXELROD; TOMCHICK, 1959; WONG et al., 2011), pode ser capaz de afetar processos cognitivos, tal como o armazenamento de informações para posterior evocação. Seu efeito na consolidação da memória parece depender da ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos localizados no nervo vago ascendente, e o estímulo segue pelas projeções do NTS resultando na ativação do sistema noradrenérgico no prosencéfalo (ROESLER; SCHRÖDER, 2011; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011; WONG et al., 2011), mais precisamente nas seguintes estruturas: NTS, HIP, ABL (CLAYTON; WILLIAMS, 2000a, 2000b; MELLO-CARPES et al., 2013; WILLIAMS et al., 1998).

Por tratar-se de um novo aprendizado, a memória de extinção precisa passar pelo processo de consolidação (BERLAU; MCGAUGH, 2006; WICHERT; WOLF; SCHWABE, 2013), assim, os processos de consolidação e extinção de uma memória podem partilhar alguns mecanismos (MUELLER; CAHILL, 2010; MYSKIW et al., 2010). Portanto, nossa hipótese de trabalho é que assim como, na consolidação da memória aversiva, durante a consolidação da extinção da memória de medo, possa ser estabelecida a dependência de estado, pela administração periférica de adrenalina, e esta seria capaz de ser “incorporada” ao aprendizado da extinção e, então, agir como uma “pista” para posterior evocação desta memória. Isto seria possível através da ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentes no

nervo vago e pela ativação da via NTS → HIP/ABL, resultando na liberação central de noradrenalina.

### 3 JUSTIFICATIVA

Estima-se que 90% da população mundial será exposta a pelos menos um evento traumático grave durante toda a sua vida. Esta exposição pode desencadear o surgimento de desordens psiquiátricas como o transtorno de estresse pós-traumático, que hoje afeta de 5 a 10% da população em geral, mas este número é maior, de 20 a 30%, em grupos de risco: pessoas de baixa renda e soldados com traumas pós-guerra (MORRISON; RESSLER, 2013; PARSONS; RESSLER, 2013).

Uma maneira de tratar as desordens psiquiátricas e devolver aos pacientes a estabilidade emocional, tão necessária à qualidade de vida, adaptação e sobrevivência humana, é através da terapia de exposição (FITZGERALD; SEEMANN; MAREN, 2013), técnica muito utilizada na clínica e baseada na extinção (ABRAMOWITZ, 2013; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2012; FIORENZA et al., 2012; MIYASHITA; WILLIAMS, 2004; RAUCH et al., 2009; THORP et al., 2012). O estudo da extinção de memória aversiva em animais de laboratório é o modelo experimental mais aceito pela comunidade científica com o objetivo de compreender os mecanismos comportamentais e neurais envolvidos na terapia de exposição em humanos (FITZGERALD; SEEMANN; MAREN, 2013; SCHILLER et al., 2013). Ambas consistem em expor o sujeito ao estímulo aversivo, sem as suas consequências perigosas ou assustadoras, resultando em um gradual decréscimo do comportamento de medo (KAPLAN; MOORE, 2011; ORSINI; MAREN, 2012).

Investigar se a dependência de estado ocorre durante a consolidação da extinção de memória aversiva, permite conhecer melhor os mecanismos neurobiológicos e comportamentais do processo de extinção, tão difundido no comportamento humano e animal, e de tanta importância terapêutica para o tratamento de patologias ocasionadas pelas memórias de medo em humanos. Também contribui para que surjam novos estudos na área que possam maximizar a efetividade da terapia de exposição, bem como auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos, seja utilizando substâncias medicamentosas psicoativas ou controlando a liberação de reguladores endógenos.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Verificar a ocorrência da dependência de estado na extinção de memória aversiva em ratos.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Verificar o efeito da administração periférica de adrenalina na consolidação da extinção da memória de esquiva inibitória.
- Verificar se a administração periférica de adrenalina é capaz de promover a dependência de estado no processo de consolidação da extinção da memória de esquiva inibitória.
- Verificar se a administração intra-NTS de noradrenalina mimetiza a dependência de estado, estabelecida na extinção da memória de esquiva inibitória, devido à administração periférica de adrenalina.
- Verificar se a via NTS → HIP/ABL está envolvida na dependência de estado durante a extinção de memória aversiva, induzida pela administração periférica de adrenalina.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para responder às questões levantadas nesta dissertação, realizou-se um estudo experimental *in vivo*, com o objetivo de obter uma análise farmacológica e comportamental dos processos envolvidos na possível ocorrência da dependência de estado endógena na consolidação da extinção de memória aversiva.

### 5.1 Amostra

Ratos *Wistar* machos (2,5-3 meses de idade; 290-330 g) foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O tamanho amostral (número de animais por grupo) foi definido com base em estudos da área publicados em revistas internacionais indexadas (*qualis* A1), totalizando 316 animais (10-12 animais por grupo experimental) (ATSAK et al., 2012; CLARKE et al., 2010; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2012; DIEKELMANN et al., 2011; ROSSATO et al., 2009).

Durante toda a fase experimental os animais foram mantidos na sala de alojamento do Centro de Memória, Instituto do Cérebro (InsCer), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Estes foram alojados em caixas plásticas especiais forradas com maravalha, com capacidade para 4 animais, em condições controladas de luz (ciclo 12 horas claro/escuro - luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas) e temperatura (21-23°C), recebendo água e ração *ad libitum*. As caixas de alojamento foram trocadas e limpas a cada dois dias, e as tarefas comportamentais foram todas realizadas durante a fase clara do ciclo dos animais. Os procedimentos experimentais apresentados nesta dissertação foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, sob registro: CEUA 0104/12 (ANEXO A).

### 5.2 Cirurgia estereotáxica

Para viabilizar a infusão farmacológica intra-estrutura e verificar se as diferentes regiões de estudo participam no processo de dependência de estado endógena na consolidação da extinção de memória aversiva induzida pela

administração sistêmica de adrenalina, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas guia de 22 gauge (G) posicionadas 1,0 mm acima das seguintes estruturas: núcleo do trato solitário (NTS) região CA1 do hipocampo dorsal (HIP) e amígdala basolateral (ABL). As coordenadas para as diferentes regiões de estudo, segundo o Atlas Paxinos e Watson (1986) foram:

- NTS: Antero-posterior (AP) -13.3, Latero-lateral (LL)  $\pm 1.0$ , Dorso-ventral (DV) -6.9 mm.
- HIP: AP: -4.2; LL:  $\pm 3.0$ ; DV: -1.8 mm.
- ABL: AP: -2.8; LL:  $\pm 4.7$ ; DV: -7.5 mm.

Todos os procedimentos foram realizados com os animais previamente anestesiados com ketamina (Cristália), um anestésico de ação rápida, juntamente com Xilazina (Syntec), um sedativo/miorrelaxante/analgésico, ambos administrados via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente.

Ao término da realização da cirurgia estereotáxica e após a completa recuperação da anestesia, os animais foram recolocados em suas respectivas caixas moradia. Durante toda a fase experimental não houve troca entre os animais em cada caixa.



**Figura 7 - Vista geral do equipamento de cirurgia estereotáxica (KOPF®).**



### **5.3 Manipulação dos animais**

Após 4-7 dias de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais passaram por uma sessão de manipulação, com a finalidade de acostumá-los a serem manejados, ou seja, para se familiarizarem com o pesquisador e evitar a ansiedade e o estresse durante o experimento. Para isso, os animais foram transportados da sala de alojamento do Centro de Memória para a sala onde se realizavam os experimentos, retirados individualmente de sua caixa moradia e manuseado por 5 minutos. 24 horas após a sessão de manipulação foi empregado o protocolo experimental de esquiva inibitória.

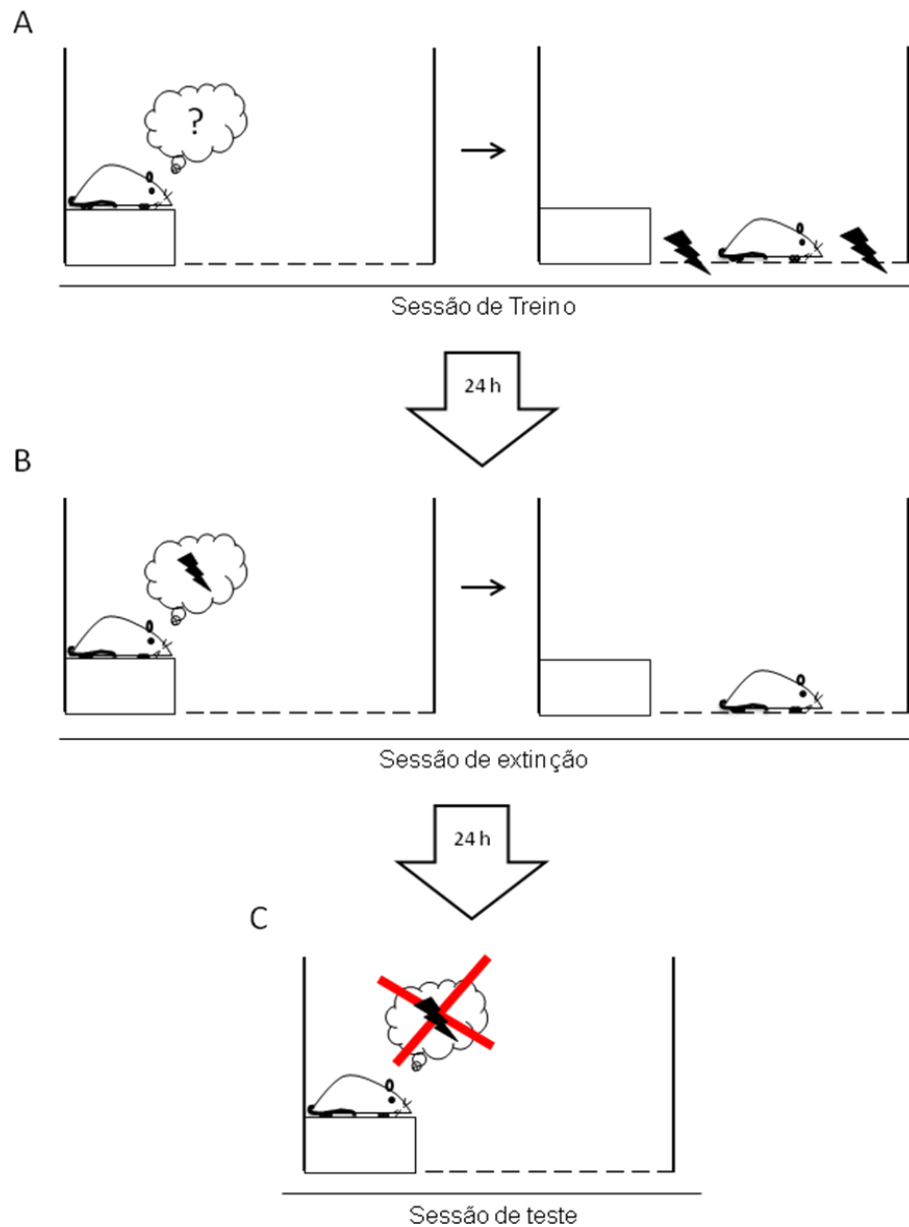
### **5.4 O paradigma de esquiva inibitória**

A esquiva inibitória (EI) é um paradigma muito utilizado para estudar memória aversiva (BARROS et al., 2001; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; FIORENZA et al., 2012). É um dos modelos favoritos para análise de eventos bioquímicos e farmacológicos envolvidos na formação da memória, pois, sua aquisição é rápida (em segundos), e necessita de uma única e breve sessão de treinamento (IZQUIERDO et al., 2006a). A aquisição da tarefa de esquiva inibitória depende da atividade integrada da região CA1 do hipocampo com o córtex entorrinal e parietal posterior, sendo modulada no início pelo septo medial e amígdala e indiretamente por hormônios do estresse (CAMMAROTA et al., 2007; IZQUIERDO; BEVILAQUA; CAMMAROTA, 2006). Este é um paradigma que permite examinar experimentalmente os mecanismos envolvidos na aquisição, armazenamento e expressão de memórias emocionais associadas com eventos estressantes, intimidadores ou atemorizantes (PORTO, 2006). Em humanos, a esquiva inibitória é representada por um tipo de memória que utilizamos diariamente e é muito importante para a nossa sobrevivência, pois evita, por exemplo, que coloquemos o dedo na tomada ou andemos por lugares perigosos (QUEVEDO et al., 2003)

O aparato de esquiva inibitória consiste em uma caixa de madeira (50 x 25 x 50 cm) com a parte frontal feita de acrílico (Albarsch, Porto Alegre, Brasil). O assoalho do aparelho é feito de barras de bronze paralelas, com 0,3 cm de calibre

cada. No lado esquerdo da caixa, há uma plataforma de 5 cm de altura por 7 cm de largura.

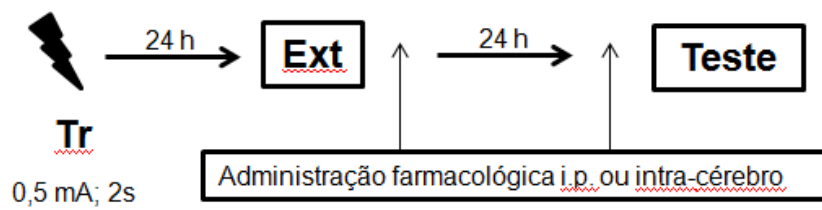
Antes de iniciar o protocolo de EI, os animais foram transportados da sala de alojamento até a sala onde os experimentos eram conduzidos e aguardava-se cerca de 20 min para adaptação (importante para evitar que os animais ficassem estressados pela mudança de ambiente). Durante a sessão de treino, no dia 1, os animais foram cuidadosamente colocados sobre a plataforma elevada e, quando desceram com as quatro patas no assoalho de barras de bronze eletrificáveis receberam um estímulo elétrico de 0,5 mA por 2 s, sendo imediatamente recolocados nas caixas moradia (BONINI et al., 2007; SZAPIRO et al., 2003). Após 24 horas da sessão de treino, no dia 2, os animais foram recolocados na plataforma para a sessão de extinção, onde os procedimentos foram idênticos àqueles empregados na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebeu o estímulo elétrico e explorou livremente o assoalho de barras de bronze, por um período de 60 s, tempo eficaz para a extinção da memória de esQUIVA inibitória (nas condições de treino aqui apresentada), determinado por estudo prévio (FIORENZA et al., 2012). No dia 3, para avaliar a extinção da memória aversiva, os animais foram gentilmente colocados na plataforma elevada e foi observada a latência de descida. Em todas as sessões (treino, extinção e teste) foram cronometradas as latências de descida da plataforma com as 4 patas no assoalho de barras de bronze como variável (medida de memória), e os tempos limites foram de 30 s para a sessão de treino e 300 s para as sessões de extinção e teste. Os animais que não desceram da plataforma na sessão de treino até 30 s foram automaticamente excluídos do estudo. E os animais que no segundo dia de exposição ao aparato de EI não desceram até 300 s, foram conduzidos até o assoalho de barras eletrificáveis na ausência de estímulo elétrico para a sessão de extinção (60 s). Se algum animal retornasse para a plataforma elevada durante a sessão de extinção, travava-se o cronômetro, conduzia-o novamente ao assoalho de barras de bronze eletrificáveis e acionava-se novamente o cronometro até que o animal completasse o tempo de extinção exclusivamente no assoalho de barras eletrificáveis.



**Figura 8 - Desenho esquemático do protocolo comportamental de Esquiva Inibitória.** (A) Sessão de treino: Ratos *Wistar* machos foram individualmente colocados na plataforma elevada. Quando eles desceram com as quatro patas no assoalho de barras de bronze receberam um estímulo elétrico de 0,5 mA durante 2s. (B) Sessão de Extinção: após 24 horas os animais foram recolocados individualmente na plataforma e ao descerem, não receberam o estímulo elétrico e exploraram livremente o assoalho de barras de bronze por um período de 60 s. (C) Sessão de teste: para retenção da memória de extinção os animais foram novamente expostos à caixa de EI na ausência de estímulo elétrico, 24 h após a sessão de extinção, e ocorrendo a consolidação da memória de extinção os animais tendem a descer da plataforma rapidamente. Durante as sessões de treino, extinção e teste foram cronometrados as latências de descida da plataforma elevada como medida de memória. Adaptado de Mello-Carpes et al., 2013.

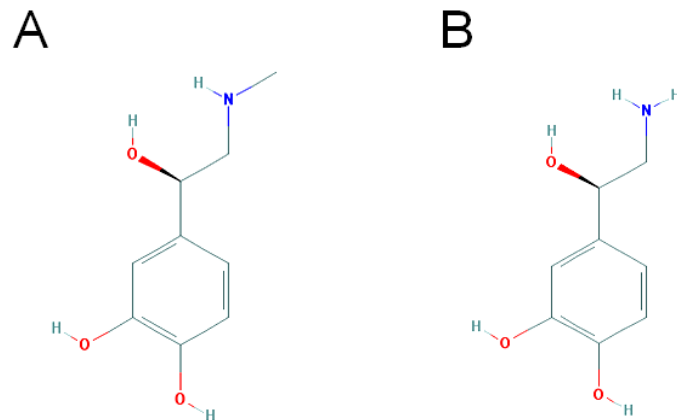
## 5.5 Intervenção farmacológica

Os compostos farmacológicos empregados neste estudo foram adrenalina, noradrenalina e muscimol, todos adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA), dissolvidos em salina estéril 0,9% (veículo) e guardados protegidos da luz a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso. Os fármacos ou salina foram administrados i.p. (salina e adrenalina) ou intra-cérebro (salina, muscimol e noradrenalina) em dois diferentes momentos: imediatamente após a sessão de extinção e 6 min antes da sessão de teste (tempo apropriado para a absorção dos compostos farmacológicos propostos do sítio de injeção) (IZQUIERDO; DIAS, 1983a, 1983b; IZQUIERDO; FERREIRA, 1989; IZQUIERDO; NETTO, 1985) na tarefa de EI.



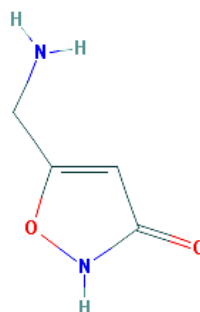
**Figura 9 - Desenho esquemático dos momentos de intervenção farmacológica durante a execução do protocolo experimental de Esquiva Inibitória.**

A adrenalina (o principal hormônio da medula adrenal) e a noradrenalina (o transmissor da maioria das fibras simpáticas pós-ganglionares) são agonistas diretos de células efectoras, sendo ambas equipotentes em estimular receptores  $\beta_1$ , mas sua ação difere-se na proporção de sua eficácia em estimular receptores  $\alpha$  e  $\beta_2$ . A noradrenalina é um potente agonista de receptores  $\alpha$  e apresenta pouca ação sobre os receptores  $\beta_2$ , contudo, é menos potente do que a adrenalina sobre os receptores  $\alpha$  da maioria dos órgãos. Estruturalmente a noradrenalina difere-se da adrenalina apenas pela falta do substituto metil no grupo amino (GOODMAN; GILMAN; GILMAN, 1990).



**Figura 10 - Estrutura molecular em 2D da adrenalina e da noradrenalina.** Note-se a ausência do substituto metil no grupo amino na noradrenalina. (A) adrenalina, fórmula molecular  $C_9H_{13}NO_3$  e peso molecular de 183.20442 g/mol. (B) Noradrenalina fórmula molecular  $C_8H_{11}NO_3$  e peso molecular de 169.17784 g/mol. Fonte: PubChem Compound – NCBI.

O muscimol é um agonista dos receptores GABAérgicos do tipo A ( $GABA_A$ ). Seu mecanismo de ação está relacionado a potencialização da inibição neural mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do SNC. É amplamente utilizado em estudos farmacológicos com a finalidade de causar uma inativação reversível de determinadas estruturas cerebrais associadas com funções cognitivas. Ou seja, O muscimol reduz a atividade elétrica espontânea ou provocada dos neurônios de grosso calibre na região em que é administrado e tal fenômeno envolve a um aumento na condutância dos íons cloretos, mediado pelo GABA (GOODMAN; GILMAN; GILMAN, 1990; MISANE et al., 2013).



**Figura 11 - Estrutura molecular 2D do composto farmacológico muscimol.** Fórmula molecular  $C_4H_6N_2O_2$  e peso molecular de 114.10264 g/mol. Fonte: PubChem Compound – NCBI.

A adrenalina nas doses de 5, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ou salina 0,9 % na dose de 1 ml/Kg foram administradas via i.p. imediatamente após a sessão de extinção e/ou 6 min antes da sessão de teste da tarefa de EI. A Noradrenalina na dose de 1  $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}/\text{lado}$  em NTS e ABL e 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{lado}$  em CA1, muscimol na dose de 0,01  $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$  em NTS e ABL e 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{lado}$  em CA1, e salina 0,9% no volume de 0,5  $\mu\text{l}$  em NTS e ABL e 1  $\mu\text{l}$  em CA1, foram administrados 6 min antes da sessão de teste, podendo ser administrados em mais de uma estrutura ou juntamente com a infusão i.p. de adrenalina ou salina. A escolha das doses dos compostos farmacológicos utilizados nesta dissertação foi baseada em estudos prévios e na vasta literatura disponível (FIORENZA et al., 2012; IZQUIERDO; DIAS, 1983a, 1983b; IZQUIERDO; FERREIRA, 1989; IZQUIERDO; NETTO, 1985; MELLO-CARPES et al., 2013).

Para a administração i.p. dos compostos farmacológicos foi utilizado uma seringa hipodérmica com agulha estéril de 1 ml (27,5G x  $\frac{1}{2}$ " ) da marca BD Biosciences. Para realizar o procedimento, o animal foi cuidadosamente imobilizado com uma compressa estéril e a agulha foi introduzida no quadrante inferior esquerdo do abdômen do animal, fazendo um ângulo de 20-45° com a parede abdominal. Antes de dispensar o fármaco foi aspirado o conteúdo para verificar se a agulha não atingiu bexiga, intestinos ou algum vaso, e estando a agulha em local certo, foi executada a injeção do fármaco.

Para a infusão farmacológica intra-cérebro uma guia de 30 G foi acoplada a um tubo de polietileno (0,15" x 0,43" x 10') e este sistema foi acoplado a uma micro-seringa adquirida da empresa Hamilton Company, Estados Unidos, modelo 95 RN SYR, ideal para dispensar volumes de 0,5  $\mu\text{l}$  até 5  $\mu\text{l}$ . No momento da infusão o animal foi cuidadosamente imobilizado com uma compressa estéril e a guia de 30 G foi introduzida na cânula guia de 22 G implantadas na calota craniana dos animais anteriormente mediante cirurgia estereotáxica, e então dispensado o fármaco ou salina, ambos administrados obedecendo a uma média de velocidade de infusão de 0,5  $\mu\text{l}/30$  s. Após o término da infusão intra-cérebro a guia de infusão foi mantida por mais 60 s dentro das cânulas guia para evitar o refluxo de líquido (a pressão intracraniana é superior a pressão do meio externo), e após, cuidadosamente retirada, colocada na outra cânula e o processo foi repetido (infusões bilaterais).

As injeções periféricas foram administradas até 30 s antes das infusões intra-cérebro, quando ambas eram requeridas, conforme a tabela a seguir.

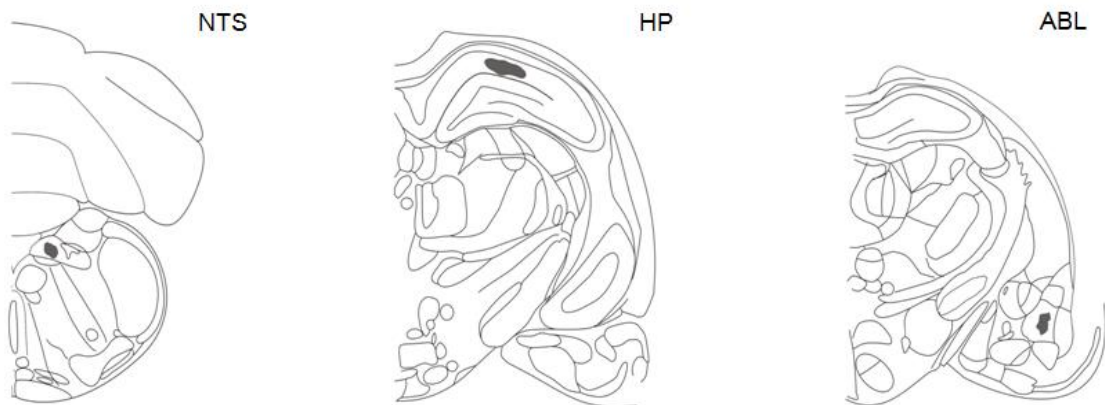
<b>TRATAMENTOS:</b>		
<b>Após sessão de treino</b>	<b>Após sessão de extinção</b>	<b>Pré sessão de Teste</b>
<b>Grupo 1</b>		
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)
Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina (5 µg/Kg)	Salina (1 ml/Kg)
Salina (1ml/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg)	Salina (1ml/Kg)
Salina (1ml/Kg)	Adrenalina (100 µg/Kg)	Salina (1ml/Kg)
<b>Grupo 2</b>		
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg)
Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg)	Salina (1 ml/Kg)
Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg)
<b>Grupo 3</b>		
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg) + Salina 1 µl/lado intra-NTS
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg) + Muscimol (0,01 µg/lado) intra-NTS
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg) + Noradrenalina (1 µg/lado) intra- NTS
Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg) + Muscimol (0,01 µg/lado) intra-NTS
Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina (50 µg/Kg)	Salina (1 ml/Kg) + Noradrenalina (1µg/lado) intra-NTS
<b>Grupo 4</b>		
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg) + Salina (1µl/lado) intra-NTS + Salina (1µl/lado) intra-HIP
Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina	Salina (1 ml/Kg) + Muscimol (0,01 µg/lado) intra-NTS + Noradrenalina (1µg/lado) intra-HIP
Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg)	Salina (1 ml/Kg) + Salina (1µl/lado) intra-NTS + Salina (1µl/lado) intra-ABL
Salina (1 ml/Kg)	Adrenalina	Salina (1 ml/Kg) + Muscimol (0,01 µg/lado) intra-NTS + Noradrenalina (1µg/lado) intra-ABL

**Tabela 1 - Delineamento dos grupos experimentais.**

## 5.6 Histologia

A verificação do posicionamento anatômico das cânulas foi realizado *post mortem*: 2-4 dias após o término dos procedimentos experimentais, os animais receberam uma solução de azul de metileno 4 % (1  $\mu$ l em CA1; 0,5  $\mu$ l no NTS e ABL) através das mesmas cânulas em que foram infundidos os compostos farmacológicos (noradrenalina e muscimol) ou veículo (salina 0,9%). Após 15 min da infusão, estes foram sacrificados pela administração i.p. de uma overdose de pentobarbital (100 mg/Kg) e decapitados para retirada dos cérebros que foram mantidos em solução de formol a 4%. Após 48 horas, as estruturas cerebrais eram analisadas com auxílio do atlas de Paxinos e Watson (1986) e de um microscópio óptico.

Somente animais onde a localização da mancha de azul de metileno encontrou-se dentro de um raio de 1 mm do local desejado foram considerados na análise estatística dos dados (BARROS et al., 2001; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2012; FIORENZA et al., 2012; FURINI et al., 2010; MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013).



**Figura 12 – Desenho mostrando a localização da mancha de azul de metileno.** Esquema procedente dos planos A -13.3 (NTS), -4.2 (HIP) e - 2.8 (ABL) adaptado do Atlas Paxinos & Watson (1986), mostrando a localização da mancha de azul de metileno dentro de um raio de 1 mm do local desejado (infusão de 0.5  $\mu$ l de azul de metileno a 4% no NTS e ABL e de 1  $\mu$ l de azul de metileno a 4% no HP). Desenho de Maria Eduarda Izquierdo.



## 5.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* PrismGraph 5.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). A variável em estudo (latência de descida da plataforma) não segue uma distribuição normal (Gaussiana) e requer técnicas de inferência estatística não paramétrica. Assim, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn, sendo expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes (CALLEGARI-JACQUES, 2007).

**6 ARTIGO ORIGINAL**

Regular article to Neurobiology of Learning and Memory ◆

FEAR EXTINCTION CAN BE MADE STATE-DEPENDENT ON PERIPHERAL  
EPINEPHRINE: ROLE OF NOREPINEPHRINE IN THE NUCLEUS TRACTUS  
SOLITARIUS

Jessica Rosa<sup>1</sup>, Jociane C. Myskiw<sup>1,2</sup>, Cristiane R. G. Furini<sup>1,2</sup>, Gerson G. Sapias<sup>1</sup>  
and Ivan Izquierdo<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Memória, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Neurociência Translacional, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Av. Ipiranga, 6690, 90610-600 Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding autor: Iván Izquierdo, PhD.

Centro de Memória, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 60, 2º andar, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +5551 33203312

E-mail adress: lzquier@terra.com.br

---

◆ As normas de publicação encontram-se no ANEXO B

## Abstract

We investigate whether the extinction of inhibitory avoidance (IA) learning can be subjected to endogenous state-dependence with systemic injections of epinephrine (E), and whether endogenous norepinephrine (NE) and the nucleus tractus solitarius (NTS) → locus coeruleus → hippocampus/amygdala (HIPPP/BLA) pathway participate in this. Rats trained in IA were submitted to two sessions of extinction 24 h apart: In the first, the animals were submitted to a training session of extinction, and in the second they were tested for the retention of extinction. Saline or E were given i.p. immediately after the extinction training (post-extinction training injections) and 6 min before the extinction test (pre-extinction test). Post-extinction training E (50 or 100 µg/Kg) induced a poor retrieval of extinction in the test session of this task unless an additional E injection (50 µg/Kg) was given prior to the extinction test. This suggested state-dependence. Muscimol (0.01 µg/side) microinfused into the NTS prior to the extinction test session blocked E-induced state-dependence. Norepinephrine (NE, 1 µg/side) infused bilaterally into NTS restores the extinction impairment caused by post-extinction training i.p. E. In animals with bilateral NTS blockade induced by muscimol, NE (1 µg/side) given prior to the extinction test into the CA1 region of the dorsal hippocampus or into the basolateral amygdala restored the normal extinction levels that had been impaired by muscimol. These results suggest a role for the NTS → locus coeruleus → HIPPP/ BLA pathway in the retrieval of extinction, as it has been shown to have in the consolidation of inhibitory avoidance and of object recognition learning.

**Key words:** Fear extinction State-dependence Peripheral epinephrine Central norepinephrine NTS → hippocampus/amygdala pathway

## Introduction

Ascending noradrenergic fibers originating in the locus coeruleus (LC) modulate hippocampal memory processing both during consolidation (Gold & McGaugh, 1977; Gold & Zornetzer, 1983; Izquierdo, 1984; Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 2000; Prado de Carvalho & Zornetzer, 1981; Sara, 2009) and at the time of retrieval (Barros, Mello e Souza, De David, Choi, Aguzzoli, Madche, Ardenghi, Medina, & Izquierdo, 2001). These fibers also innervate the basolateral amygdala (BLA), which has a key modulatory role of its own on memory processing by the hippocampus (HIPP) (Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 2000). In turn, the LC is innervated by central catecholaminergic nuclei activated by vagal afferents (Browning & Travagli, 2010; Izquierdo et al., 1959). These are sensitive to circulating epinephrine (E) levels and effects (McGaugh, 2000; Mravec, 2011; Wong et al., 2012). The vagal afferents activate a pathway initiated by the nucleus of the solitary tract (NTS) through locally released norepinephrine (NE) (Clayton & Williams, 2000 a,b,c; Mello Carpes & Izquierdo, 2013; Williams et al., 1996; Wong, Tai, Wong-Faull, Claycomb, Meloni, Myers, Carlezon, & Kvetnansky, 2012; see also Paschalis, Churchill, Marina, Kasymov, Gourine, & Ackland, 2009, Thoa & Davidson, 1982; Yao, 2009). The NTS projects to the nucleus paragigantocellularis, which in turn innervates the LC (Ennis & Aston-Jones, 1988; Reyes & Van Bockstaele, 2006). The LC sends noradrenergic fibers to many areas of the brain including the basolateral amygdala (BLA) and hippocampus (HIPP) (see Gold & Zornetzer, 1983; McGaugh, 2000; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013). The connection of the LC with the BLA and HIPP is believed to play a key role in the regulation of memory processes (Gold & McGaugh, 1975; Gold & Zornetzer, 1983; McGaugh, 2000; Prado de Carvalho & Zornetzer, 1981; Sara, 2009).

In some cases, the actions of the modulatory pathways and substances may actually be incorporated to the tasks being learned as part of the constellation of conditioned stimuli, and then act as retrieval cues (Izquierdo, 1984; Izquierdo & Dias, 1983). This establishes state-dependence (Izquierdo, 1984; Colpaert, 1990). The possibility of state-dependence on endogenous substances, particularly brain neurotransmitters, was first postulated by Zornetzer (1978). The dependence of memories on endogenous substances has been considered to play a major role both in the action of peripheral hormones (Izquierdo, 1984), and in that of a variety of drugs, including

opioid peptides (Izquierdo et al., 1981), morphine (Colpaert, 1990, 1991), NMDA antagonists (Jackson, Koek & Colpaert, 1992), ethanol (Rezayof, Alijanpour, Zarrindast, & Rassouli, 2008), and others (Izquierdo, 1984; Jamali-Raeufy et al., 2011). State-dependence on exogenous substances has been proposed to result from the matching of the drug states at the time of acquisition and at that of retrieval (Overton, 1978, Jamali-Raeufy et al., 2011; Rezayof et al., 2008).

In endogenous state-dependence the states believed to be important are instead the one present during the post-extinction training period in which consolidation occurs (Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 2000) and the one prevalent at the time of retrieval (Barros et al., 2001; Izquierdo, 1984; Zornetzer, 1978). A sufficient similarity between those two states fosters retrieval (Izquierdo, 1984; Izquierdo & Dias, 1983; Zornetzer, 1978). Cerebral NE and peripheral E are released at the time of training (Izquierdo, 1984; McCarty & Gold, 1981; Zornetzer, 1978). Peripherally administered E adds to that released endogenously by the training procedure and modulates consolidation. In the IA task, training with a strong footshock leads to a higher E release (McCarty & Gold, 1981) and a higher retention test performance; in these animals E injected systemically post-training usually reduces consolidation and this is overcome by pre-test E administration (Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo, 1984). In animals trained in IA with a low footshock the endogenous E release is lower (McCarty and Gold, 1981), the retention performance is lower (Izquierdo, 1984) and post-training E usually increases this performance (Izquierdo, 1984; Dias & Izquierdo, 1983). Thus, the effect of peripherally injected E on consolidation varies with the amount of endogenous E released by training; this being one of the reasons that actually led to the postulation of the process of memory modulation by endogenous substances (Cahill & McGaugh, 1996; McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2006). The recovery of memory by pre-test E in animals in which injection of this drug causes retrograde amnesia suggests endogenous state-dependence (Dias & Izquierdo, 1983; Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo, 1984).

The brain sites involved in endogenous state-dependence must obviously participate both in consolidation and in retrieval (Izquierdo, 1984; Zornetzer, 1978). HIPPO and BLA are crucial both for consolidation (Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 2000) and retrieval. In retrieval, however, many other brain structures are also involved (Barros et al., 2001; Risius et al., 2013). The pathway NTS → LC → HIPPO/BLA can be important for consolidation (Clayton & Williams, 2000a,b,c; Mello-Carpes &

Izquierdo, 2013; Williams et al., 1996) but it has not been studied before for a possible role in retrieval.

Here we investigate, first, whether extinction learning can be subjected to endogenous state-dependence with systemic injections of E and, second, whether endogenous NE and the NTS, HIPP or BLA pathway participate in this. The task chosen is the extinction of one trial inhibitory avoidance (IA) in rats.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Subjects

Male Wistar rats (2.5-3 months old, 290-330 g) purchased from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil were used. They were housed 4 to a cage and maintained with free access to food and water under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 07:00 hours). All behavioral experiments were carried out during the light phase of the cycle. The temperature of the animal room was maintained at 21-23 °C. All procedures were in accordance with the National Institutes of Health's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and were approved by the Bioethics Commission of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

### 2.2. Surgery.

To study the role of the NTS, BLA and HIPP in the behavioral situations analyzed, rats were deeply anesthetized with 75 mg/kg ketamine (Cristalia) plus 10 mg/kg xylazine (Syntec), and placed in a stereotaxic apparatus. Stainless steel 22-gauge guide cannulae were stereotaxically implanted bilaterally 1.0 mm above the pyramidal cell layer of the dorsal CA1 region of HIPP (A -4.2, L  $\pm$ 3.0, V -1.8 mm), and/or BLA (A -2.8, L  $\pm$ 4.7, V -7.5 mm), and/or NTS (A -13.3, L  $\pm$ 1.0, V -6.9 mm). Coordinates are from the atlas by Paxinos & Watson (1986). The animals were allowed to recover from surgery for 4-7 days before submitting them to any other procedure. In some of the animals (see Results) the cannulae were implanted both in the NTS and in HIPP or BLA.

### *2.3. Inhibitory avoidance (IA) training, extinction training and extinction testing.*

IA training, as is customary in this laboratory (Barros et al., 2001; Fiorenza, Rosa, Izquierdo & Myskiw, 2012) was in a 50 cm x 25 cm x 25 cm plexiglass box with 5 cm high, 7 cm wide and 25 cm long formica platform at the left end of a series of 0.3 cm caliber bronze bars spaced 1.0 cm apart that made up the floor of the box. For IA training (day 1), the animals were placed on the platform facing the rear left corner of the training box. When they stepped down placing their four paws on the grid they received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock and then withdrawn immediately from the apparatus and returned for their cage. Twenty-four hours later (day 2), the animals were placed again on the platform as described, and when they stepped down they were allowed to explore the box freely for 60 s without footshocks. This was the extinction training session. Twenty-four hours later (day 3) the animals were submitted to a second, identical extinction session (extinction test). This was the second or test extinction session (Fiorenza et al., 2012). Step-down latencies were measured in the IA session, extinction training session and extinction test session with a stopwatch.

Drug or saline treatments were administered i.p. (E, saline) or infused (Saline, muscimol, NE) at two different times: Immediately after the extinction training session (post-extinction training treatments) or 6 min prior to the extinction test session (pre-extinction test treatments), as is customary in other forms of learning (Barros et al., 2001; Clayton & Williams, 2000a,b,c; Fiorenza et al., 2012; García-Delatorre, Rodríguez-Ortiz, Balderas, & Bermúdez-Rattoni, 2010; see McGaugh, 2000, 2013 and Izquierdo & Medina, 1997 for references). The post-training treatments were aimed at the post-training consolidation period of extinction learning (García-Delatorre et al., 2010; Fiorenza et al., 2012), and the pre-test treatments were aimed at the retrieval of extinction.

### *2.4. Drug Treatments*

The doses were chosen from pilot experiments based on the vast literature in the field (Barros et al., 2001; Clayton & Williams, 2000a,b; Gold & Zornetzer, 1983; Fiorenza et al., 2012; Izquierdo, 1984; Izquierdo & Dias, 1983; McGaugh, 2000). All drugs were dissolved in sterile 0.9% saline. Drugs used were epinephrine (E),

muscimol and norepinephrine (NE), all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

At the time of drug microinfusions (immediately after extinction training, and/or 6 min before test sessions), 30-gauge infusion cannulae were fitted into the guides. Infusions were 0.5  $\mu$ l in volume for the BLA, NTS and 1.0  $\mu$ l for HIPP. The drug or vehicle infusions were performed at rate of 0.5  $\mu$ l/30s. The infusion cannulae was left in place for an additional 60 s after infusion to minimize backflow, then carefully withdrawn and placed on the other side, after which the procedure was repeated.

The doses used were: i.p. E, 5, 50 or 100  $\mu$ g/Kg; central nervous system infusions, NE, 1  $\mu$ g/side, and muscimol, 0.01  $\mu$ g/side. Saline was used for controls. I.p. injection volume was 1 ml/Kg. Brain microinfusion volume of saline was 0.5  $\mu$ l. The peripheral injections were always performed less than 30 sec after the brain infusions when both were required.

### *2.5. Cannulae localizations in the NTS, BLA and HIPP.*

Localization of cannulae aimed at HIPP and BLA were as in Fiorenza et al. (2012) and locations into NTS was as in Mello-Carpes & Izquierdo (2013). Location of cannulae was verified post-mortem: 2-4 days after the end of the last behavioral procedure, a 4% methylene blue solution was infused into each implanted site at the same volume that had been used for drug or saline microinfusion. Thirty min later, the animals were sacrificed by excess anesthesia and the brains were removed and kept in 10% formalin. The extension of the dye in each case was taken as a measure of the probable extension of the drug or saline infusions. Cannula placement was considered correct when the spread was  $\leq 1$  mm<sup>3</sup> from the intended infusion site (Barros et al., 2001; Fiorenza et al., 2012; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013; Myskiw et al., 2013) (Fig. 1).

### *2.6 Statistics*

One trial inhibitory avoidance data were analyzed by Kruskal–Wallis non-parametric one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's multiple comparison tests, because latencies in the extinction sessions of this task did not follow a normal distribution. Data were expressed as medians  $\pm$  interquartile ranges.



### 3. Results

#### *3.1. Induction of state dependent extinction of IA by peripheral epinephrine.*

At the doses of 50 or 100, but not 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , E given i.p. after the extinction training session attenuated the performance of test session (Fig. 2). When the animals received E 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  post-extinction training and were tested after giving pre-extinction test E at the same dose, the latter reversed the retrograde amnesic effect of post-extinction training E (Fig. 3). Pre-test E (50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) had no effect of its own on extinction retrieval in the test session (Fig. 3). E given i.p. does not cross the blood-brain barrier except at the hypothalamus, which is a long distance from the NTS, HIPP or BLA studied in the present paper (Weil-Malherbe, 1959). These results indicate that extinction learning, like other forms of learning (Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo, 1984) can be made state-dependent by the post extinction systemic administration of E.

It must be noted that in this and in all following experiments (Figs. 2 to 5) the performance in the extinction training session directly reflects the high criterion to which the animals had been trained in the preceding IA procedure: the median step-down latency was maximum (300 s). In animals trained to high criterion in the IA task even a low dose of E (5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) given post-extinction training reduces the subsequent retrieval seen in control animals (Izquierdo & Dias, 1983). In such conditions, post-extinction training E is amnesic in the original task (IA), and, as seen in Fig. 2, post-extinction training E (at much higher doses, 50 or 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) it is also amnesic for the extinction task.

#### *3.2. The NTS and NE in the NTS may participate in the state-dependence caused by post-extinction training E given peripherally.*

The bilateral microinfusion of muscimol (0.01 $\mu\text{g}/\text{side}$ ) into the NTS is supposed to block this nucleus (Mello-Carpes & Izquierdo, 2013). Here we found that pre-extinction test muscimol given into the NTS blocks both the retrieval of extinction in saline-treated animals, and the state-dependence caused by post-extinction training and pre-n extintiotest i.p. E (Fig. 4).

Since peripheral E can induce the release of NE at various brain sites, including the NTS (Clayton & Williams, 2000a,b,c; Mravec, 2011; Wong et al., 2012), we decided to test whether NE itself given into the NTS at a dose of 1.0 µg/side could mimic the pre-extinction test effects of peripheral E administration on the memory of extinction of IA learning. Fig. 4 shows that it does: Pre-extinction test NE restores the extinction impairment caused by post-extinction training i.p. E injection. Therefore, it seems plausible to postulate that the state-dependence induced by E given i.p. after extinction training may be mediated by NE released at the NTS.

### *3.3. Effects of NE infused into HIPP or BLA on IA retrieval in animals with inhibition of the NTS by muscimol.*

The NTS projects to the nucleus paragigantocellularis (Ennis & Aston-Jones, 1988; Reyes & Van Bockstaele, 2006), which in turn projects to, and activates, the LC, which sends noradrenergic fibers to the amygdala (Clayton & Williams, 2000) and hippocampus (Mello-Carpes & Izquierdo, 2013). These connections are involved in the modulation of memory consolidation (Prado de Carvalho & Zornetzer, 1983; Sara, 2009). We explored whether, in the presence of an inhibition of the NTS caused by muscimol infused into it prior to extinction test at a dose of 0.01 µg/side (Mello-Carpes & Izquierdo, 2013), the pre-extinction test infusion of NE (1.0 µg/side) into the HIPP or BLA at the time of extinction test could overcome the deleterious effect of post-extinction training E and restore the state-dependence induced by it. Fig. 5 shows that it does, in HIPP and BLA respectively.

Thus, the findings shown in Figs. 4 and 5 suggest a role for the NTS → LC → HIPP/BLA pathway, or, alternatively, for noradrenergic receptors in the NTS and in the HIPP and BLA by separate in retrieval. This pathway has been shown to play a role in the consolidation of different memories, aversive and non-aversive (Clayton & Williams, 2000a,b,c; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013; Williams et al., 1996).

## **Discussion**

The present findings show that memory of the extinction of IA can be made dependent on peripheral E levels. At a dose of 50 or 100 µg/Kg, E given i.p. immediately after a training session of extinction of IA hinders retrieval of that

extinction in a subsequent test carried out 24 h after training. The effect is overcome by another similar injection of the drug 6 min prior to a test session (Fig. 3). The recovery of extinction by pre-extinction test E in animals treated with post-extinction training E is mimicked by the microinfusion of NE into the NTS (1 µg/side in 0.5 µl of saline bilaterally). Blockade of the NTS with muscimol infused bilaterally into that nucleus blocks retrieval effects of pre-extinction test E (Fig 4), but this can be overcome by intra-HIPP or intra-BLA (Fig. 5) administration of NE. Peripheral E administration probably releases NE at the NTS, HIPP and BLA (Williams et al., 1996; Mravec, 2011; Wong et al., 2012). Thus, it seems likely that the post-extinction training and pre-extinction test effects of peripheral E that bring about state-dependence (Fig. 3) may in part be due to NE released at these brain sites. In normal conditions, NE would carry out its effects when released in the NTS. When this nucleus is blocked, NE will act only when microinfused into HIPP and/or BLA. The isolated effects of intracerebral NE and of systemic E agrees with many previous data in the literature (Gold et al., 1975; Gold & van Buskirk, 1976; Izquierdo, 1984; McGaugh, 2000). Here we show that there can be state-dependence both with peripheral E and with central NE administration, and discuss the possibility that the effect of the former may be the drug mediated at least in part by centrally released NE acting on the NTS and/or HIPP and/or BLA.

Thirty years ago we established the possibility of state-dependence for peripherally administered E in fear-motivated tasks (Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo, 1984). Here we show that there can also be state-dependence for E in the extinction learning of a fear-motivated task. This is interesting, because presumably extinction should alleviate fear (Fiorenza et al., 2012; Myskiw et al., 2013, 2014). In addition, we show that NE given into the NTS or, alternatively, into, HIPP and BLA, which govern memory consolidation (Clayton & Williams, 2000a,b,c; Gold & Zornetzer, 1978; McGaugh, 2000; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013; Prado de Carvalho & Zornetzer, 1981; Sara, 2009; Williams et al., 1996), can mimic the effects of peripherally administered E at the time of extinction testing.

It must be pointed out that endogenous state-dependence can only be studied in tasks in which the substance to be studied produces an inhibition of retrieval in a subsequent session when given post-extinction training. This is the case for E both in the consolidation of IA acquired with a strong footshock (Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo, 1984) and, as shown here, in the extinction of well-learned IA. In such

cases, post-extinction training E usually hinders retrieval measured in a test session. If the original IA training had been carried out using low intensity footshocks, performance in the subsequent extinction training session would have been low, and post-extinction training E would have been expected to enhance, rather than to depress its retention (Dias & Izquierdo, 1983; Izquierdo, 1984). This property of E and other substances to oppositely affect subsequent retrieval when given post-extinction training to animals trained to different criteria is one of the pillars of the memory modulation concept (Cahill & McGaugh, 1996; McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2006), which has been so useful to understand memory consolidation.

Pre-extinction test E given in animals treated with post-extinction training saline also enhanced (normalized) the retrieval of extinction about as much as it did in animals treated with post-extinction training E (Fig. 3). This can be explained by the probably large release of peripheral E (cf. McCarty & Gold, 1981; Izquierdo, 1984) in the extinction training session. E is of course a fear hormone and there presumably is more fear in the first than in the second extinction session. Certainly, depending on how much endogenous peripheral E is released in the extinction training, pre-extinction test E will reestablish or disrupt extinction retrieval.

The incorporation of the extinction of IA to the list of tasks that can be subjected to endogenous state-dependence (Izquierdo et al., 1981; Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo, 1984; Jackson et al., 1992; Jamali-Raeufi et al., 2011; Zarrindast et al., 2007) agrees with the concept that extinction is one more form of learning (Rescorla, 2001, 2004), and with the recent demonstration that it is highly modulatable, both by drugs (Fiorenza et al., 2012) and by behavioral tagging (Myskiw et al., 2013). One important form of modulation could be, precisely, endogenous state-dependence.

As said above, HIPP is a candidate for being a major site for endogenous state-dependence, since it is involved both in consolidation (Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 2000) and retrieval (Barros et al., 2001; Harand, Bertran, La Joie, Landeau, Mézenge, Desgranges, Peigneux, Eustache & Rauchs, 2012). Since the NTS→LC→HIPP/BLA pathway is also involved in consolidation (Clayton & Williams, 2000a,b,c; Prado de Carvalho & Zornetzer, 1981; Williams et al., 1996; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013) and, as the present findings suggest, in retrieval, that pathway is also a candidate for a key involvement in E-triggered state-dependence. It should appear as no surprise that this pathway should play a similar role in the consolidation of IA (Clayton & Williams, 2000a,b) and of its extinction, as shown in the present

paper; particularly since this role results in a both cases in a post-extinction training inhibition which can be reversed by pre-extinction test E (Izquierdo & Dias, 1983; Izquierdo, 1984).

The present findings also suggest that state-dependence of extinction triggered by peripheral E may occur physiologically and be mediated at least in part by brain NE acting on the NTS and/or elsewhere (HIPP, BLA) (see also Zornetzer, 1978; Izquierdo, 1984).

### **Acknowledgements**

We thank Ms. Maria Eduarda Izquierdo for the artwork, and the National Research Council of Brazil (CNPq) for research grants.

### **References**

- Barros, D. M., Mello e Souza, T., De David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., Ardenghi, P. G., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D<sub>1</sub>,  $\beta$ -noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavioural Brain Research*, *124*, 1-7.
- Browning, K. N., & Travagli, R. A. (2010). Plasticity of vagal brainstem circuits in the control of gastric function. *Neurogastroenterological Motility*, *22*, 1154-1163.
- Cahill, L.R., & McGaugh, J.L. (1996). Modulation of memory storage. *Current Opinion in Neurobiology*, *6*, 237-242.
- Clayton, E. C., & Williams, C. L. (2000a). Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, *112*, 151-158.
- Clayton, E. C., & Williams, C. L. (2000b). Glutamatergic influences on the nucleus paragigantocellularis: Contribution to performance in avoidance and spatial memory tasks. *Behavioural Neuroscience*, *114*, 707-712.

Clayton, E. C., & Williams, C. L. (2000c). Posttraining inactivation of excitatory afferent input to the *locus coeruleus* impairs retention of an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 73, 127-140.

Colpaert, F. C. (1990). Amnesic trace locked into the benzodiazepine state of memory. *Psychopharmacology*, 102, 28-36.

Colpaert, F. C. (1991). State dependence as a mechanism of central nervous system drug action. *NIDA Research Monographs*, 116, 245-266.

Dias, R.D. & Izquierdo, I. (1983). Memory modulation by the administration of ACTH, adrenaline or beta-endorphin after training or prior to testing in an inhibitory avoidance task in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 16, 333-337.

Ennis, M. & Aston-Jones, G. (1988). Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: A new excitatory amino acid pathway in brain. *Journal of Neuroscience*, 8, 3644-3657.

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. *Behavioural Brain Research*, 232, 210-216.

García-Delatorre, P., Rodríguez-Ortiz, C.J., Balderas, I., Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. *European Journal of Neuroscience*, 32, 1018-1023.

Gold, P. E., & McGaugh, J. L. (1977). Hormones and memory. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 17, 127-43.

Gold, P. E., & van Buskirk, R. (1976). Effects of posttrial hormone injections on memory processes. *Hormones and Behavior*, 7, 509-517.

Gold, P. E., van Buskirk, R. B., & McGaugh, J. L. (1975). Effects of hormones on time-dependent memory storage processes. *Progress in Brain Research*, 42, 210-211.

Gold, P. E., & Zornetzer, S. F. (1983). The mnemon and its juices: Neuromodulation of memory processes. *Behavioral and Neural Biology*, 38, 151-189.

Harand, C., Bertran, F., La Joie, R., Landeau, B., Mézenge, F., Desgranges, B., Peigneux, P., Eustache, F., Rauchs, G. (2012). The hippocampus remains activated over the long term for the retrieval of truly episodic memories. *PLoS One*. 7, e43495.

Izquierdo, I. (1984). Endogenous state dependence: Memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. In Lynch, G., McGaugh, J. L. & Weinberger, N. M. (eds.), *Neurobiology of Learning and Memory*, (pp. 333-350). New York: Guilford Press.

Izquierdo, I., Perry, M. L., R. D., Dias, Souza, D. O., Elisabetsky, E., Carrasco, M. A., Orsingher, O. A., Netto, C. A. (1981). Endogenous opioids, memory modulation and state dependence. In Martinez, J.L., Jr., Jensen, R.A., Messing, R.B., Rigter, H. & McGaugh, J.L. (eds.), *Endogenous Peptides and Learning and Memory Processes*, (pp. 269-291). New York: Academic Press.

Izquierdo, I., Dias, R.D. (1983). Memory as a state dependent phenomenon: Role of ACTH and epinephrine. *Behavioral and Neural Biology*, 38, 144-151.

Izquierdo, I., & Medina, J.H. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68, 285-316.

Izquierdo, J.A., Insua, J.A., Biscardi, A.M., Izquierdo, I. (1959). Some observations on the responses to stimulation of the afferent vagus nerve. *Medicina Experimentalis*, 1, 325-332.

Jackson, A., Koek, W., & Colpaert, F. C. (1992). NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. *Behavioural Pharmacology*, 3, 415-421.

Jamali-Raeufy, N., Nasehi, M., Ebrahimi-Ghiri, M., & Zarrindast, M.R. (2011). Cross state-dependence of learning between WIN55, 212-2 and scopolamine in rat dorsal hippocampus. *Neuroscience Letters*, 491, 227-231.

McCarty, R., & Gold, P.E. (1981) Plasma catecholamines: effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. *Hormones and Behavior*, 15, 168-82.

McGaugh, J.L. (2000). Memory - A century of consolidation. *Science*, 287, 248-251.

Mello-Carpes, P. B., & Izquierdo, I. (2013). The Nucleus of the Solitary Tract → Nucleus Paragigantocellularis → Locus Coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 100, 56-63.

Mravec B. (2011). Role of catecholamine-induced activation of vagal afferent pathways in regulation of sympathoadrenal system activity: negative feedback loop of stress response. *Endocrine Regulations*, 45, 37-41.

Myskiw, J.C., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110, 1071-1076.

Myskiw, J.C., Furini, C.R., & Izquierdo, I. (2014). Modulation of the extinction of fear learning. *Psychology of Fear: New Developments*. J. Murray (Ed.), New York: Nova Publishers. *In press*.

Overton, D.A. (1978). Basic mechanisms of state-dependent learning. *Psychopharmacological Bulletin*, 14, 67-68.

Paschalis, A., Churchill, L., Marina, N., Kasymov, V., Gourine, A., Ackland, G. (2009). beta1-Adrenoceptor distribution in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*, 458, 84-88.

Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.



Prado de Carvalho, L., & Zornetzer, S. F. (1981). The involvement of the locus coeruleus in memory. *Behavioral and Neural Biology*, 31, 173-178.

Reyes, B. A., & Van Bockstaele, E. J. (2006). Divergent projections of catecholaminergic in the nucleus of the solitary tract to limbic forebrain and medullary autonomic brain regions. *Brain Research*, 1117, 69-79.

Rezayof, A., Alijanpour, S., Zarrindast, M.R., & Rassouli, Y. (2008). Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 441-447.

Risius, U. M., Staniloiu, A., Piefke, M., Maderwald, S., Schulte, F. P., Brand, M., Markowitsch, H. J. (2013). Retrieval, monitoring, and control processes: a 7 tesla fMRI approach to memory accuracy. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, doi: 10.3380/bnbeh.2013.00024

Sara, S. J. (2009). The *locus coeruleus* and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews of Neuroscience*, 10, 211-223.

Thoa, N. B., & Davidson, R. K. (1982). Potassium evoked catecholamine release from the nucleus tractus solitarius in vitro. *Life Science*, 30, 1479-1485.

Yao, S. T. (2009). Alpha-adrenergic receptors in the nucleus tractus solitarii: fitting a new piece to a complex puzzle. *Experimental Physiology*, 9, 771-772.

Williams, C. L., Men, D., Clayton, E. C., & Gold, P. E. (1996). NE release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. *Behavioral Neuroscience*, 112, 1414-1422.

Wong, D. L., Tai, T. C., Wong-Faull, D. C., Claycomb, R., Meloni, E. G., Myers, K. M., Carlezon, W. A., Jr. & Kvetnansky, R. (2012). Epinephrine: A short- and long-term regulator of stress and development of illness: A potential new role for epinephrine in stress. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32, 737-748.

Zarrindast, M. R., Shendy, M. M., & Ahmadi, S. (2007). Nitric oxide modulates state dependence induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. *Behavioural Pharmacology*, 18, 289-295.

Zornetzer, S. F. (1978). Neurotransmitter modulation and memory: A new neuropharmacological phrenology? In Lipton, M. A., DiMascio, A. & Killam, K. F. (eds.), *Psychopharmacology: A Generation of Progress*. New York: Raven Press.

## Figure Legends

**Fig. 1.** Schematic drawings derived from planes A -4.2, -2.8 and -13.3 of the atlas of Paxinos & Watson (1986), showing the maximum spread of 0.5  $\mu$ l of 4% methylene blue infused through the cannulae at the placements aimed at HIPPO, BLA and NTS, respectively, that fell within 1 mm<sup>3</sup> of the intended sites.

**Fig. 2.** Effects of systemic injection E post-extinction training on IA learning. In this and following figures, a schema preceding shows the basic treatment schedule used for measuring IA extinction. Rats were trained in step-down inhibitory avoidance (one 0.5 mA, 2 s, scrambled footshock, Tr). Twenty-four hours later they were re-exposed to the IA apparatus with no reinforcement (extinction training session, Ext), and 24 h after this they were exposed to a test extinction session (Test). In both the training and the test extinction session, the step-down latency was 300 s. The animals received an i.p. injection of saline 1 ml/Kg (Sal) or E (5, 50 or 100  $\mu$ g/Kg dissolved in saline) immediately after the extinction training session. Six min before testing all animals received Sal. The two higher doses of E given post-extinction training markedly reduced extinction as measured in the extinction test session. Data expressed as medians  $\pm$  interquartile ranges step-down latency, and analyzed using a Kruskal–Wallis analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn’s test. Significant differences from extinction training at  $p < 0.001$  (\*\*\*) or  $p < 0.05$  (\*).  $N = 12$  per group.

**Fig. 3.** Induction of state-dependence of extinction of IA by peripheral epinephrine. Same as in Fig. 2, but showing effect of Sal or E (50  $\mu$ g/Kg) given i.p. post-extinction training and/or 6 min prior to the extinction test session. Note that pre-extinction test E reversed the amnesia caused by post-extinction training E. Data expressed as medians  $\pm$  interquartile ranges step-down latency, and analyzed using a Kruskal–Wallis analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn’s test. Significant differences from extinction training at  $p < 0.001$  (\*\*\*) or  $p < 0.05$  (\*).  $N = 12$  per group.

**Fig. 4.** The NTS and NE in the NTS may participate in the state-dependence caused by post-extinction training E given peripherally. Same as Fig. 3, but here the animals received post-extinction training or pre-extinction test Sal or E given i.p. Pre-extinction test treatments were microinfusions into the NTS of Sal (0.5  $\mu$ l/side), or muscimol (0.01  $\mu$ g/side) or NE (1  $\mu$ g/side). Note that muscimol blocked retrieval of

the extinction both in Sal- and in E-treated animals, and that NE was able to reverse the amnesia caused by post-extinction training E. Data expressed as medians  $\pm$  interquartile ranges step-down latency, and analyzed using a Kruskal–Wallis analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn’s test. Significant differences from extinction training at  $p < 0.05$  (\*). N = 12 per group.

**Fig. 5.** Effects of NE infused into HIPPO or BLA on IA retrieval in animals with inhibition of the NTS by muscimol. Same as in Fig. 4, but here the animals also received Sal or NE given pre-extinction test in HIPPO or BLA. Note that, even with the NTS blocked by muscimol, NE given into HIPPO or BLA was able to reestablish normal levels of extinction test performance. Data expressed as medians  $\pm$  interquartile ranges step-down latency, and analyzed using a Kruskal–Wallis analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn’s test. Significant differences from extinction training at  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.05$  (\*). N = 12 per group.

Figures

Fig. 1.

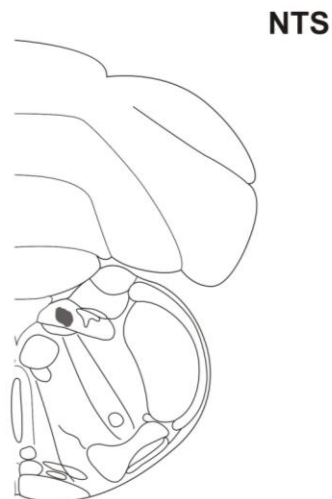
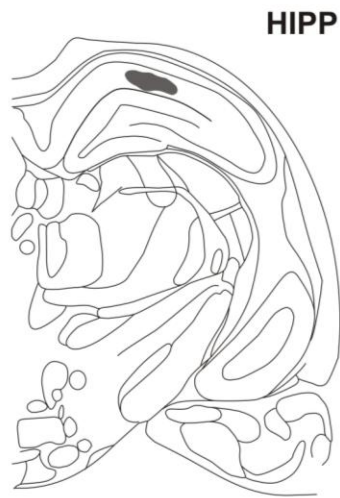


Fig. 2.

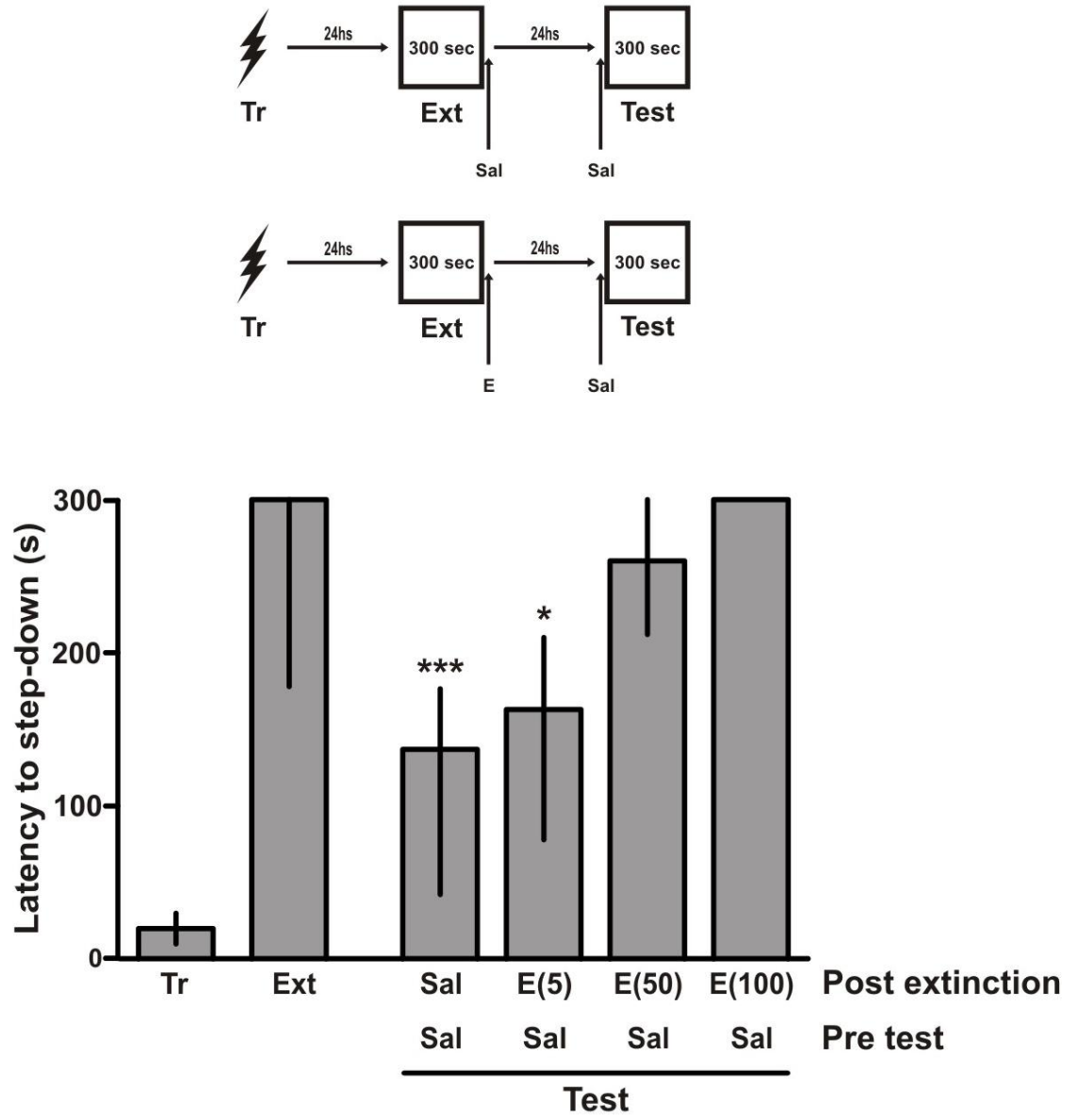


Fig. 3.

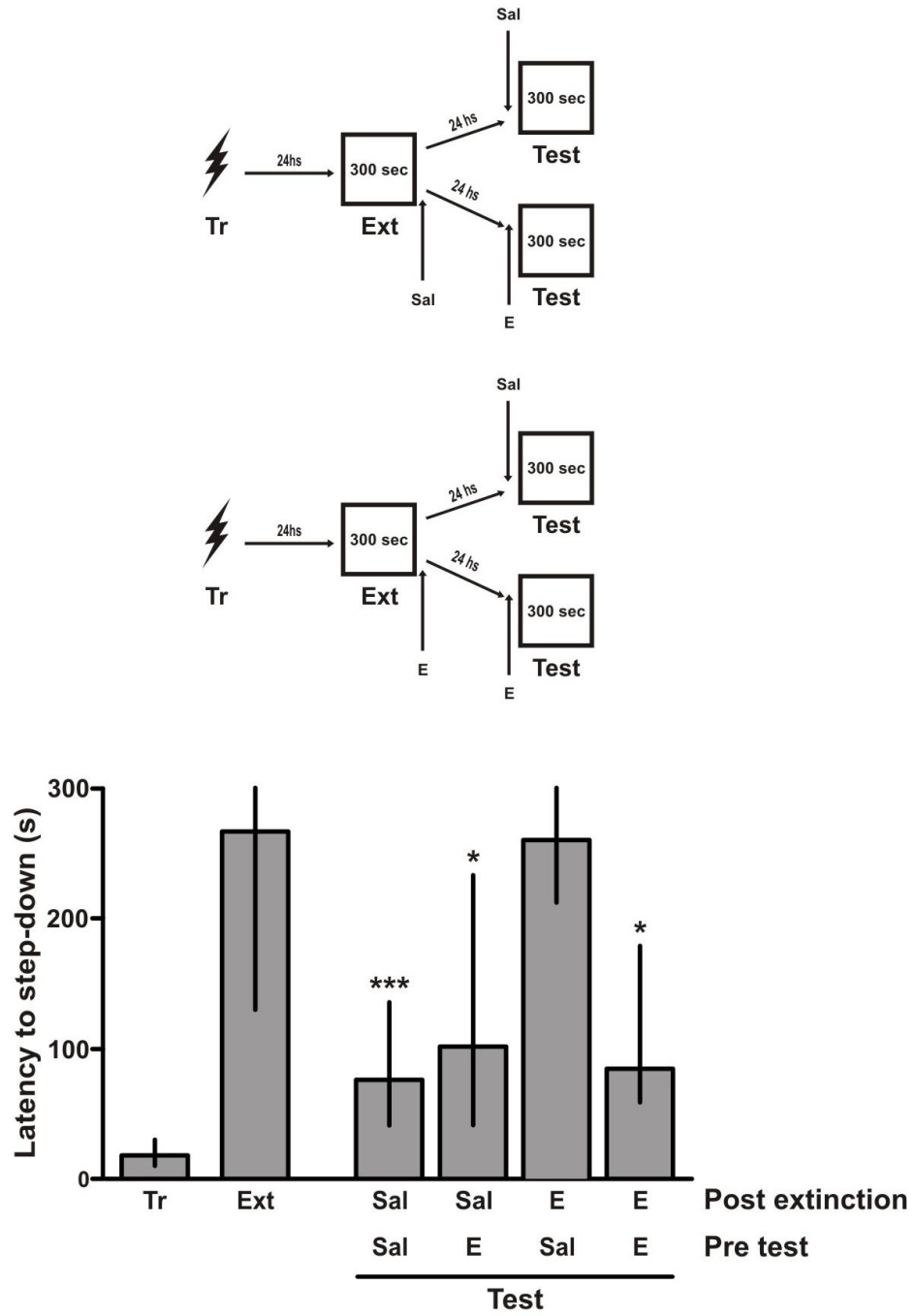


Fig. 4.

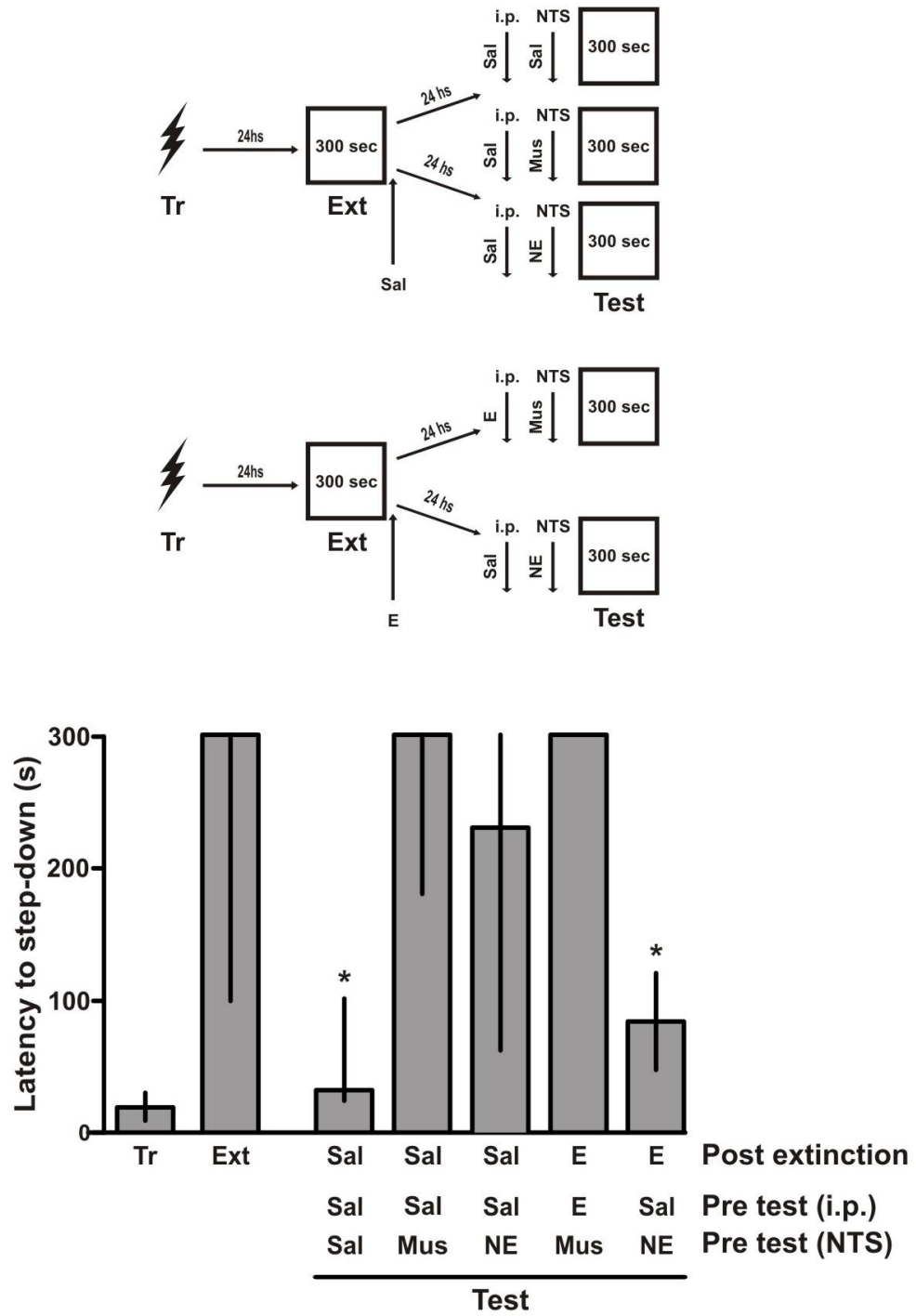
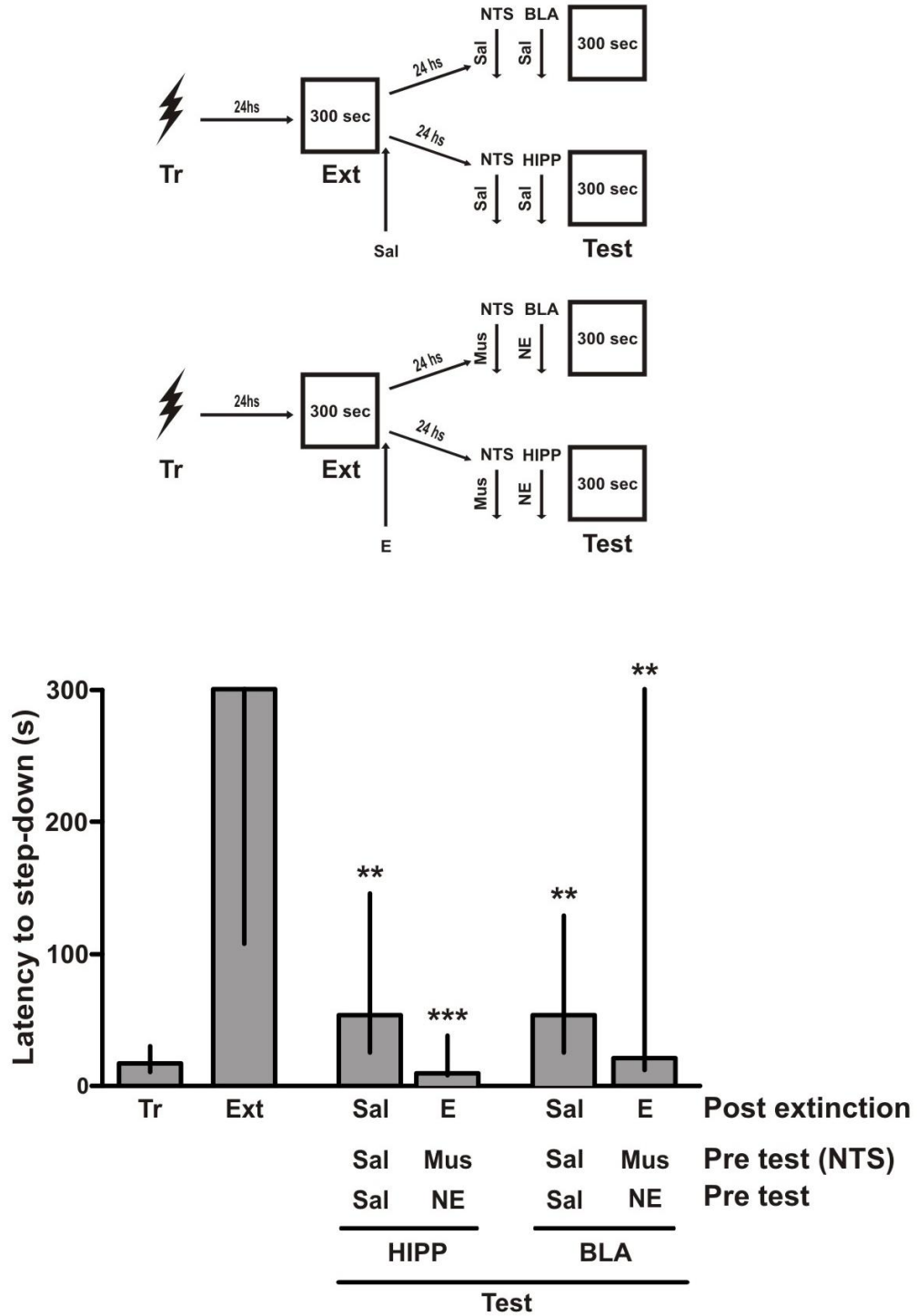




Fig. 5.



## 7 CONCLUSÕES

Os resultados desta dissertação de mestrado indicam que:

- A administração periférica de adrenalina após a sessão de extinção induz a um prejuízo na evocação da memória de extinção, de forma dose dependente.
- O prejuízo observado na evocação da memória de extinção, através da administração de adrenalina após a sessão de extinção, é revertido quando este mesmo fármaco, na mesma dose, é administrado i.p. antes da sessão de teste. Este dado demonstra que a administração periférica de adrenalina induz à dependência de estado endógena na consolidação da extinção de memória aversiva.
- O prejuízo na evocação da memória de extinção, causado pela administração de adrenalina após a sessão de extinção, é revertido pela infusão de noradrenalina intra-NTS antes da sessão de teste. A noradrenalina intra-NTS mimetiza o efeito da adrenalina administrada i.p. antes da sessão de teste no processo de dependência de estado.
- A via NTS → HIP/ABL está envolvida na dependência de estado durante a extinção de memória aversiva, induzida pela administração periférica de adrenalina.

Ainda é possível concluir que:

- Não há efeito sobre a evocação da memória de esquiva inibitória quando a adrenalina é administrada i.p. somente antes da sessão de teste.
- A ativação do NTS é necessária para que ocorra a dependência de estado, induzida pela administração sistêmica de adrenalina após a sessão de extinção e antes da sessão de teste.

- O prejuízo na evocação da memória de extinção, através da administração periférica de adrenalina após a sessão de extinção, é revertido pela infusão de noradrenalina na região CA1 do HIP dorsal antes do teste, mesmo com a inibição do NTS, permitindo concluir que a ativação do NTS resulta na liberação de NA em CA1.
- O prejuízo causado na evocação da memória de extinção, através da administração periférica de adrenalina após a sessão de extinção, é revertido pela infusão de noradrenalina em ABL antes do teste, mesmo com a inibição do NTS, permitindo concluir que a ativação do NTS resulta na liberação de NA em ABL, que juntamente com a conclusão do item 5 corroboram para a participação da via NTS → HIP/ABL no processo de dependência de estado na consolidação da extinção de memória aversiva.

Os resultados desta dissertação sugerem que a dependência de estado ocorre durante o processo de extinção da memória de EI, e que a via NTS → HIP/ABL desempenha um papel importante neste processo, talvez devido à liberação de noradrenalina nestes sítios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOWITZ, J. S. The practice of exposure therapy: relevance of cognitive-behavioral theory and extinction theory. **Behavior therapy**, v. 44, n. 4, p. 548–558, dez. 2013.
- AKIRAV, I.; MAROUN, M. Stress modulation of reconsolidation. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 4, p. 747–761, 6 out. 2012.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R746–R750, set. 2013.
- ALIJANPOUR, S.; REZAYOF, A. Involvement of dorsal hippocampal and medial septal nicotinic receptors in cross state-dependent memory between WIN55, 212-2 and nicotine or ethanol in mice. **Neuroscience**, v. 245, p. 61–73, 15 ago. 2013.
- ANDERSON, T. R.; SLOTKIN, T. A. Maturation of the adrenal medulla--IV. Effects of morphine. **Biochemical pharmacology**, v. 24, n. 16, p. 1469–1474, 15 ago. 1975.
- ATSAK, P. et al. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 9, p. 3504–3509, 28 fev. 2012.
- BADDELEY, A. Working memory. **Science**, v. 255, n. 5044, p. 556–559, 31 jan. 1992.
- BAILEY, M. R.; BALSAM, P. D. Memory Reconsolidation: Time to Change Your Mind. **Current Biology**, v. 23, n. 6, p. R243–R245, mar. 2013.
- BARROS, D. M. et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behavioural brain research**, v. 124, n. 1, p. 1–7, 28 set. 2001.
- BEAR, M. F. **Neurociencias: desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BEKINSCHTEIN, P. et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2711–2716, 8 fev. 2008.
- BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 16, n. 7, p. 1539–1545, ago. 2013.
- BENTZ, D. et al. Influence of stress on fear memory processes in an aversive differential conditioning paradigm in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 7, p. 1186–1197, jul. 2013.

- BERLAU, D.; MCGAUGH, J. Enhancement of extinction memory consolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, n. 2, p. 123–132, set. 2006.
- BEVILAQUA, L. R. M. et al. The Role of the Entorhinal Cortex in Extinction: Influences of Aging. **Neural Plasticity**, v. 2008, p. 1–8, 2008.
- BILKEI-GORZO, A. et al. Dynorphins Regulate Fear Memory: from Mice to Men. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 27, p. 9335–9343, 4 jul. 2012.
- BOCCIA, M. M. et al. Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 91, n. 1, p. 93–97, jan. 2009.
- BONINI, J. S. et al. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, v. 147, n. 1, p. 37–45, 15 jun. 2007.
- BREMNER, J. D. Traumatic stress: effects on the brain. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 445–461, 2006.
- BURIANOVA, H.; MCINTOSH, A. R.; GRADY, C. L. A common functional brain network for autobiographical, episodic, and semantic memory retrieval. **NeuroImage**, v. 49, n. 1, p. 865–874, jan. 2010.
- BUSTAMANTE, J. A. et al. State dependent learning in humans. **Physiology & Behavior**, v. 5, n. 7, p. 793–796, jul. 1970.
- CAHILL, L.; ALKIRE, M. T. Epinephrine enhancement of human memory consolidation: interaction with arousal at encoding. **Neurobiology of learning and memory**, v. 79, n. 2, p. 194–198, mar. 2003.
- CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Modulation of memory storage. **Current opinion in neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 237–242, abr. 1996.
- CALISKAN, G.; ALBRECHT, A. Noradrenergic interactions via autonomic nervous system: a promising target for extinction-based exposure therapy? **Journal of neurophysiology**, v. 110, n. 11, p. 2507–2510, dez. 2013.
- CALLEGARI-JACQUES, S. **Bioestatística princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- CAMMAROTA, M. et al. Studies of Short-Term Avoidance Memory. In: BERMÚDEZ-RATTONI, F. (Ed.). **Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging**. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007.
- CHEN, C. C.; WILLIAMS, C. L. Interactions between epinephrine, ascending vagal fibers, and central noradrenergic systems in modulating memory for emotionally arousing events. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, 2012.

CLARKE, J. R. et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2652–2657, 9 fev. 2010.

CLAYTON, E. C.; WILLIAMS, C. L. Posttraining inactivation of excitatory afferent input to the locus coeruleus impairs retention in an inhibitory avoidance learning task. **Neurobiology of learning and memory**, v. 73, n. 2, p. 127–140, mar. 2000a.

CLAYTON, E. C.; WILLIAMS, C. L. Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. **Behavioural brain research**, v. 112, n. 1-2, p. 151–158, jul. 2000b.

CLAYTON, E. C.; WILLIAMS, C. L. Noradrenergic receptor blockade of the NTS attenuates the mnemonic effects of epinephrine in an appetitive light-dark discrimination learning task. **Neurobiology of learning and memory**, v. 74, n. 2, p. 135–145, set. 2000c.

COLPAERT, F. C. State dependency as a mechanism of central nervous system drug action. **NIDA research monograph**, n. 116, p. 245–266, 1991.

CONWAY, M. A. Episodic memories. **Neuropsychologia**, v. 47, n. 11, p. 2305–2313, set. 2009.

CURRAN, H. V.; ROBBINS, T. W. Special issue on consolidation, reconsolidation and extinction. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 4, p. 627–629, 14 mar. 2013.

D'ESPOSITO, M. et al. The neural basis of the central executive system of working memory. **Nature**, v. 378, n. 6554, p. 279–281, 16 nov. 1995.

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, 31 dez. 2012.

DE LA CRUZ, V. et al. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 1377–1381, out. 2008.

DICKERSON, B. C.; EICHENBAUM, H. The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86–104, 23 set. 2009.

DIEKELMANN, S. et al. Labile or stable: opposing consequences for memory when reactivated during waking and sleep. **Nature neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 381–386, mar. 2011.

EL HAJ, M.; KESSELS, R. P. C. Context memory in Alzheimer's disease. **Dementia and geriatric cognitive disorders extra**, v. 3, n. 1, p. 342–350, 2013.

EPINEPHRINE - Compound Summary. **Pubchem Compound**. Disponível em <[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5816&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5816&loc=ec_rcs)>. Acesso em: 26. out. 2013

- FERRY, B.; L., G. Role of Norepinephrine in Modulating Inhibitory Avoidance Memory Storage: Critical Involvement of the Basolateral Amygdala. In: FERRY, B. (Ed.). **The Amygdala - A Discrete Multitasking Manager**. [s.l.] InTech, 2012.
- FIORENZA, N. G. et al. Treatment of fear memories: interactions between extinction and reconsolidation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1363–1372, dez. 2011.
- 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, jun. 2012.
- FITZGERALD, P. J.; SEEMANN, J. R.; MAREN, S. Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. **Brain Research Bulletin**, dez. 2013.
- FURINI, C. R. et al. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. **Hippocampus**, v. 20, n. 5, p. 672–683, maio 2010.
- FURINI, C. R. G. et al. New frontiers in the study of memory mechanisms. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 2, p. 173–177, abr. 2013.
- GOLD, P. E.; VAN BUSKIRK, R. Effects of hormones on time-dependent memory storage process. **Progress in brain research**, v. 42, p. 210-211.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; GILMAN, A. G. **Goodman and Gilman's the pharmaceutical basis of therapeutics**. New York: Pergamon Press, 1990.
- GOODWIN, D. W. et al. Alcohol and recall: state-dependent effects in man. **Science (New York, N.Y.)**, v. 163, n. 3873, p. 1358–1360, 21 mar. 1969.
- GRAY, P. Effect of adrenocorticotrophic hormone on conditioned avoidance in rats interpreted as state-dependent learning. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 88, n. 1, p. 281–284, jan. 1975.
- INTROINI-COLLISON, I. B.; MCGAUGH, J. L. Epinephrine modulates long-term retention of an aversively motivated discrimination. **Behavioral and neural biology**, v. 45, n. 3, p. 358–365, maio 1986.
- IZQUIERDO, I. **Memória Iván Izquierdo**. Poto Alegre: ARTMED, 2002.
- IZQUIERDO, I. **A arte de esquecer**. Rio de Janeiro: Vieira Lent, 2010.
- IZQUIERDO, I. Endogenous state dependence. Memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. In: LYNCH, G.; MCGAUGH, J. L.; WEINBERGER, N. M. (Eds.). **Neurobiology of learning and memory**. New York: Guilford Press.
- IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural brain research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, ago. 1999.

IZQUIERDO I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 18, n. 393, p. 635-636.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496–505, set. 2006.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; CAMMAROTA, M. A arte de esquecer. **Estudos Avançados**, v. 20, n. 58, p. 289–296, dez. 2006.

IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Endogenous state-dependency: memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, beta -endorphin, adrenaline and tyramine. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 16, n. 1, p. 55–64, abr. 1983a.

IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Retrograde amnesia caused by Met-, Leu- and des-Try-Met-enkephalin in the rat and its reversal by naloxone. **Neuroscience letters**, v. 22, n. 2, p. 189–193, 10 mar. 1981b.

IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Memory as a state dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. **Behavioral and neural biology**, v. 38, n. 1, p. 144–149, maio 1983b.

IZQUIERDO, I.; FERREIRA, M. B. C. Diazepam prevents post-training drug effects related to state dependency, but not post-training memory facilitation by epinephrine. **Behavioral and Neural Biology**, v. 51, n. 1, p. 73–79, jan. 1989.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, nov. 1997.

IZQUIERDO, I.; NETTO, C. A. Role of  $\beta$ -Endorphin in Behavioral Regulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 444, n. 1 Memory Dysfun, p. 162–177, maio 1985.

IZQUIERDO, J. A. et al. Some Observations on the Responses to the Afferent Stimulation of the Vagus. **Pharmacology**, v. 1, n. 6, p. 325–332, 1959.

JACKSON, A.; KOEK, W.; COLPAERT, F. C. NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. **Behavioural pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 415–421, ago. 1992.

JACOTTE-SIMANCAS, A. et al. Effect of voluntary physical exercise and post-training epinephrine on acquisition of a spatial task in the barnes maze. **Behavioural brain research**, v. 247, p. 178–181, 15 jun. 2013.

JAMALI-RAEUFY, N. et al. Cross state-dependency of learning between WIN55, 212-2 and scopolamine in rat dorsal hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 491, n. 3, p. 227–231, mar. 2011.



- KAOUANE, N. et al. Glucocorticoids Can Induce PTSD-Like Memory Impairments in Mice. **Science**, v. 335, n. 6075, p. 1510–1513, 23 fev. 2012.
- KAPLAN, G. B.; MOORE, K. A. The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 2, p. 217–228, ago. 2011.
- KISHIMOTO, Y.; KANO, M. Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 34, p. 8829–8837, 23 ago. 2006.
- KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. **Neurociência do comportamento**. Barueri: Manole, 2002.
- KOMPUS, K. et al. Dynamic switching between semantic and episodic memory systems. **Neuropsychologia**, v. 47, n. 11, p. 2252–2260, set. 2009.
- LASHLEY, K. S. The Effects of Strychnine and Caffeine Upon the Rate of Learning. **Psychobiology**, v. 1, n. 2, p. 141–169, 1917.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.
- LI, S. et al. Effects of acute psychosocial stress on neural activity to emotional and neutral faces in a face recognition memory paradigm. **Brain imaging and behavior**, 10 jan. 2014.
- LIANG, K. C.; BENNETT, C.; MCGAUGH, J. L. Peripheral epinephrine modulates the effects of post-training amygdala stimulation on memory. **Behavioural brain research**, v. 15, n. 2, p. 93–100, abr. 1985.
- MAMIYA, N. et al. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 402–413, 14 jan. 2009.
- MAREK, R. et al. Paradoxical enhancement of fear extinction memory and synaptic plasticity by inhibition of the histone acetyltransferase p300. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 20, p. 7486–7491, 18 maio 2011.
- MARIANI, R. K. et al. Effect of naloxone and morphine on arcaine-induced state-dependent memory in rats. **Psychopharmacology**, v. 215, n. 3, p. 483–491, jun. 2011.
- MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 1–28, 2004.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 6, p. 208–210, jun. 2000.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 205–210, abr. 2002.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, v. 202, n. 1-3, p. 3–14, jan. 2009.

MCINTYRE, C. K.; MCGAUGH, J. L.; WILLIAMS, C. L. Interacting brain systems modulate memory consolidation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1750–1762, ago. 2012.

MEI, B. et al. NMDA Receptors Are Not Required for Pattern Completion During Associative Memory Recall. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19326, 29 abr. 2011.

MELLO-CARPES, P. B. M. **Participação da via NTS-PGI-LC-Hipocampo (Núcleo do Trato Solitário-Núcleo Paragigantocelular-Locus Coeruleus-Hipocampo) na consolidação da memória de reconhecimento de objetos**. 2010. 161 f.: il. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, 2010).

MELLO-CARPES, P. B. et al. Chronic exposure to low mercury chloride concentration induces object recognition and aversive memories deficits in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 7, p. 468–472, nov. 2013.

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The Nucleus of the Solitary Tract→Nucleus Paragigantocellularis→Locus Coeruleus→CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56–63, fev. 2013.

MERZ, C. J. et al. Stress differentially affects fear conditioning in men and women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 11, p. 2529–2541, nov. 2013.

MISANE, I. et al. GABAA receptor activation in the CA1 area of the dorsal hippocampus impairs consolidation of conditioned contextual fear in C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**, v. 238, p. 160–169, fev. 2013.

MIYASHITA, T.; WILLIAMS, C. L. Peripheral arousal-related hormones modulate norepinephrine release in the hippocampus via influences on brainstem nuclei. **Behavioural Brain Research**, v. 153, n. 1, p. 87–95, ago. 2004.

MONFILS, M.-H. et al. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 951–955, 1 abr. 2009.

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**, p. n/a–n/a, nov. 2013.

MUELLER, D.; CAHILL, S. P. Noradrenergic modulation of extinction learning and exposure therapy. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 1–11, mar. 2010.

MUELLER, D.; PORTER, J. T.; QUIRK, G. J. Noradrenergic Signaling in Infralimbic Cortex Increases Cell Excitability and Strengthens Memory for Fear Extinction. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 369–375, 9 jan. 2008.

MUSCIMOL - Compound Summary. **Pubchem Compound**. Disponível em <[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4266&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4266&loc=ec_rcs)>. Acesso em: 26. out. 2013

MYSKIW, J. **Participação da proteína mTOR hipocampal na consolidação e reconsolidação da memória de reconhecimento em ratos**. 2008 Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde)-Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, 2008.

MYSKIW, J. C. et al. Molecular mechanisms in hippocampus and basolateral amygdala but not in parietal or cingulate cortex are involved in extinction of one-trial avoidance learning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 2, p. 285–291, set. 2010.

NADER, K.; SCHAFFER, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 17 ago. 2000.

NOREPINEPHRINE - Compound Summary. **Pubchem Compound**. Disponível em <[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=439260&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=439260&loc=ec_rcs)>. Acesso em: 26. out. 2013

OLVER, J. S. et al. Impairments of Spatial Working Memory and Attention Following Acute Psychosocial Stress. **Stress and health: journal of the International Society for the Investigation of Stress**, 3 jan. 2014.

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

ORSINI, C. A.; YAN, C.; MAREN, S. Ensemble coding of context-dependent fear memory in the amygdala. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, p. 199, 2013.

OVERTON, D. A. Basic mechanisms of state-dependent learning. **Psychopharmacology bulletin**, v. 14, n. 1, p. 67–68, jan. 1978.

PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 146–153, fev. 2013.

- PATTI, C. L. et al. Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. **Psychopharmacology**, v. 184, n. 1, p. 1–12, 10 dez. 2005.
- PEDREIRA, M. E.; MALDONADO, H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. **Neuron**, v. 38, n. 6, p. 863–869, 19 jun. 2003.
- PEÑA, D. F.; ENGINEER, N. D.; MCINTYRE, C. K. Rapid remission of conditioned fear expression with extinction training paired with vagus nerve stimulation. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 11, p. 1071–1077, 1 jun. 2013.
- PETERSEN, R. C.; GHONEIM, M. M. Diazepam and human memory: influence on acquisition, retrieval, and state-dependent learning. **Progress in neuro-psychopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 81–89, 1980.
- PIZZORUSSO, T. Neuroscience. Erasing fear memories. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5945, p. 1214–1215, 4 set. 2009.
- PORTO, W. G. **Memória e emoção**. São Paulo: Artes médicas.
- QUEVEDO, J. et al. Differential effects of emotional arousal in short- and long-term memory in healthy adults. **Neurobiology of learning and memory**, v. 79, n. 2, p. 132–135, mar. 2003.
- RAUCH, S. A. M. et al. Prolonged exposure for PTSD in a Veterans Health Administration PTSD clinic. **Journal of traumatic stress**, v. 22, n. 1, p. 60–64, fev. 2009.
- RENOULT, L. et al. Personal semantics: at the crossroads of semantic and episodic memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 11, p. 550–558, nov. 2012.
- RESCORLA, R. A. Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. **Learning & behavior**, v. 32, n. 4, p. 401–408, nov. 2004.
- REZAYOF, A. et al. Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. **Neurobiology of learning and memory**, v. 89, n. 4, p. 441–447, maio 2008.
- RISIUS, U.-M. et al. Retrieval, monitoring, and control processes: a 7 tesla fMRI approach to memory accuracy. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, p. 24, 2013.
- ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. Cognitive enhancers: Focus on modulatory signaling influencing memory consolidation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 2, p. 155–163, ago. 2011.
- ROOZENDAAL, B. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, n. 8, p. 1213–1223, dez. 2003.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 423–433, 13 maio 2009.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. **Neurobiology of learning and memory**, v. 67, n. 2, p. 176–179, mar. 1997.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Memory modulation. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 6, p. 797–824, 2011.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 36–46, fev. 2007.

ROSSATO, J. I. et al. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5943, p. 1017–1020, 21 ago. 2009.

SANDAY, L. et al. Ethanol-induced memory impairment in a discriminative avoidance task is state-dependent. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 37 Suppl 1, p. E30–39, jan. 2013a.

SANDAY, L. et al. Amphetamine-induced memory impairment in a discriminative avoidance task is state-dependent in mice. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 16, n. 3, p. 583–592, abr. 2013b.

SANDRINI, M. et al. Causal Role of Prefrontal Cortex in Strengthening of Episodic Memories through Reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 21, p. 2181–2184, nov. 2013.

SCHILLER, D. et al. Extinction during reconsolidation of threat memory diminishes prefrontal cortex involvement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 20040–20045, 25 nov. 2013.

SCHUCHARD, J.; THOMPSON, C. K. Implicit and Explicit Learning in Individuals with Agrammatic Aphasia. **Journal of Psycholinguistic Research**, 27 mar. 2013.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences**, v. 87, n. 17-18, p. 521–536, out. 2010.

SHULZ, D. E. et al. A neuronal analogue of state-dependent learning. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 549–553, 3 fev. 2000.

SQUIRE, L. R. et al. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SUZUKI, A. et al. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 20, p. 4787–4795, 19 maio 2004.

SZAPIRO, G. et al. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. **Hippocampus**, v. 13, n. 1, p. 53–58, 2003.

THORP, S. R. et al. Prolonged exposure therapy for older veterans with posttraumatic stress disorder: a pilot study. **The American journal of geriatric psychiatry: official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry**, v. 20, n. 3, p. 276–280, mar. 2012.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Molecular brain**, v. 3, p. 15, 2010.

VIANNA, M. R. et al. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12251–12254, 9 out. 2001.

VIANNA, M. R.; COITINHO, A. S.; IZQUIERDO, I. Role of the hippocampus and amygdala in the extinction of fear-motivated learning. **Current neurovascular research**, v. 1, n. 1, p. 55–60, jan. 2004.

WEIL-MALHERBE, H.; AXELROD, J.; TOMCHICK, R. Blood-Brain Barrier for Adrenaline. **Science**, v. 129, n. 3357, p. 1226–1227, 1 maio 1959.

WICHERT, S.; WOLF, O. T.; SCHWABE, L. Changing memories after reactivation: a one-time opportunity? **Neurobiology of learning and memory**, v. 99, p. 38–49, jan. 2013.

WILLIAMS, C. L. et al. Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. **Behavioral neuroscience**, v. 112, n. 6, p. 1414–1422, dez. 1998.

WONG, D. L. et al. Epinephrine: A Short- and Long-Term Regulator of Stress and Development of Illness: A Potential New Role for Epinephrine in Stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 737–748, 17 nov. 2011.

ZANTO, T. P. et al. Causal role of the prefrontal cortex in top-down modulation of visual processing and working memory. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 656–661, 27 mar. 2011.

ZORNETZER, S. F. Neurotransmitter modulation and memory: A new neuropharmacological phrenology? In: LIPTON M. A.; DIMASCIO A.; KILLAM, K. F. (Eds.). *Psychopharmacology: A generation of progress*. New York: Raven Press.

**ANEXO A – Aprovação do projeto pela CEUA – PUCRS**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 0104/12 – CEUA

Porto Alegre, 23 de agosto de 2012.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 12/00299, **“Influência do estado neuro-humoral na consolidação e dependência de estado na extinção de memória aversiva”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Ivan Izquierdo  
FAMED – IPB  
Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## ANEXO B – Normas de publicação da revista internacional indexada Neurobiology of Learning and Memory

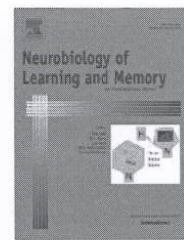


### NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 1074-7427

#### DESCRIPTION

*Neurobiology of Learning and Memory* publishes articles concerned with **neural** and **behavioral plasticity**, including **learning** and **memory** and related aspects of **neural adaptation**, at all levels of analysis from molecular biology to behavior.

Research areas include all areas of the **neurobiology** of learning and memory.

*Neurobiology of Learning and Memory* includes major theoretical, research, and review papers; research reports; brief reports; rapid communications; and notes.

In addition, the following two categories are featured:

- Minireviews that succinctly survey appropriate areas of current research or theory
- Commentaries that serve as vehicles for brief presentations of new theories, hypotheses, points of view, or critiques of current research

#### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services.

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

#### AUDIENCE

Clinicians, psychologists, neurologists, experimental neurologists

#### IMPACT FACTOR

2012: 3.327 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

#### ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus



## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**T. Abel**, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA, **Email:** abele@sas.upenn.edu

### *Associate Editors*

**J. Born**, Lübeck, Germany  
**F. Helmstetter**, Milwaukee, WI, USA  
**J. Radulovic**, Chicago, IL, USA

### *Editorial Board*

**W.C. Abraham**, Dunedin, New Zealand  
**C. Alberini**, New York, NY, USA  
**D.L. Alkon**, Bethesda, MD, USA  
**M. Ammassari-Teule**, Rome, Italy  
**C.A. Barnes**, Tucson, AZ, USA  
**M. Baudry**, Los Angeles, CA, USA  
**D. J. Bucci**, Hanover, NH, USA  
**L. Cahill**, Irvine, CA, USA  
**M. Cammarota**, Natal, Brazil  
**J. Cassel**, Strasbourg Cedex, France  
**D.F. Clayton**, Urbana, IL, USA  
**N.J. Cohen**, Champaign, IL, USA  
**L. Davachi**, New York, NY, USA  
**D. de Quervain**, Basel, Switzerland  
**A.R. Delamater**, Brooklyn, NY, USA  
**J.F. Disterhoft**, Chicago, IL, USA  
**H. Eichenbaum**, Boston, MA, USA  
**M.S. Fanselow**, Los Angeles, CA, USA  
**K.M. Frick**, Milwaukee, WI, USA  
**F.H. Gage**, La Jolla, CA, USA  
**P.W. Gean**, Tainan, Taiwan, ROC  
**P.E. Gold**, Syracuse, NY, USA  
**E. Gould, PhD**, Princeton, NJ, USA  
**J.F. Guzowski**, Irvine, CA, USA  
**M.E. Hasselmo**, Boston, MA, USA  
**J.P. Huston**, Düsseldorf, Germany  
**I.A. Izquierdo**, PORTO ALEGRE, Brazil  
**S. Josselyn**, Toronto, ON, Canada  
**R.P. Kesner**, Salt Lake City, UT, USA  
**S. Kida**, Setagaya-Ku, Japan  
**E. Klann**, New York, NY, USA  
**D. Korol**, Champaign, IL, USA  
**K. M. Lattal**, Portland, OR, USA  
**B. McCabe**, Cambridge, UK  
**J.H. Medina**, Buenos Aires, Argentina  
**R. Menzel**, Berlin, Germany  
**M. Milad**, Charlestown, MA, USA  
**S.J.Y. Mizumori**, Seattle, WA, USA  
**R.G.M. Morris**, Edinburgh, UK  
**E.A. Murray**, Bethesda, MD, USA  
**R. Richardson**, Sydney, NSW, Australia  
**E. T. Rolls**, Oxford, England, UK  
**A. Routtenberg**, Evanston, IL, USA  
**C. Sandi**, Lausanne, Switzerland  
**M. Sauvage**, Bochum, Germany  
**H. Scheich**, Magdeburg, Germany  
**T.J. Sejnowski**, La Jolla, CA, USA  
**B. Setlow**, Gainesville, FL, USA  
**T.J. Shors**, Piscataway, NJ, USA  
**A. Silva**, Los Angeles, CA, USA  
**W. Singer**, Frankfurt, Germany  
**N. E. Spear**, Binghamton, NY, USA  
**O. Steward**, Irvine CA, USA  
**W. Suzuki**, New York, NY, USA  
**R.F. Thompson**, Los Angeles, CA, USA  
**N.W. Weinberger**, Irvine, CA, USA

**N.M. White**, Montreal, QC, Canada  
**C. Williams**, Charlottesville, VA, USA  
**M. A. Wood**, Irvine, CA, USA  
**S. Zola**, Atlanta, GA, USA

***Past Editors-in-Chief***

**J.F. Guzowski**, Irvine, CA, USA  
**P.E. Gold**, Syracuse, NY, USA  
**W. Greenough**, Champaign, IL, USA  
**J.L. McGaugh**, Irvine, CA, USA

***Past Associate Editors***

**W.C. Abraham**, University of Otago, Dunedin, New Zealand  
**E. Klann**, New York University, New York, NY, USA  
**J. Rudy**, University of Colorado Boulder, Boulder, CO, USA  
**J.D. Sweatt**, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

ypyw-gfa-banner.gifyour paper your way

### *Types of paper*

#### **Types of Papers**

*Neurobiology of Learning and Memory* publishes research articles, reviews, and commentaries.

Research articles present results of original research. Reviews ordinarily do not exceed 50 typed manuscript pages in length. Commentaries should not exceed 800 words including references and should consist of comments dealing with technical, methodological, and/or theoretical issues raised by articles published in NLM. Omit abstract and section headings.

Rapid Communications should present timely findings of broad interest to the learning and memory community. They should provide a shorter yet complete body of work that is novel and compelling. Rapid Communications are limited to no more than 3 figures and 3000 words excluding the Abstract, References and Figure Legends.

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

#### *Submission declaration*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

#### *Changes to authorship*

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### *Copyright*

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

*For Subscription articles*



Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *For Open Access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

#### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### **Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

##### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution (CC BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation),



to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for Open Access in this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

#### *Submission*

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### *The Neuroscience Peer Review Consortium*

*Neurobiology of Learning and Memory* is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can now submit the manuscript to *Neurobiology of Learning and Memory* and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the editors of *Neurobiology of Learning and Memory*.

It is the authors' decision whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neurobiology of Learning and Memory*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neurobiology of Learning and Memory* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to *Neurobiology of Learning and Memory's* specification and submit the paper to *Neurobiology of Learning and Memory* with a covering letter describing the changes that have been made and informing the editors that they are happy for referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. Authors will be asked upon submission to *Neurobiology of Learning and Memory* the title of the first journal submitted to and the manuscript ID that was given by that journal. The editorial office of *Neurobiology of Learning and Memory* will request the referees' reports from the first journal.



The editors of *Neurobiology of Learning and Memory* will use forwarded referees' reports at their discretion. The editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

*Submission Address*

<http://ees.elsevier.com/ynlme/>

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### *Article structure*

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.



### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Experimental*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### *Essential title page information*

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### *Abstract*

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### *Graphical abstract*

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.



### Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.



TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

*Tables*

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

*References*

*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

*Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

*References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

*Reference style*

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.



**Reference to a book:**

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

**Reference to a chapter in an edited book:**

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

**Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

**Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

**AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

**Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**3D neuroimaging**

You can enrich your online articles by providing 3D neuroimaging data in NIfTI format. This will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available neuroimaging datasets; zoom, rotate and pan the 3D brain reconstruction; cut through the volume; change opacity and color mapping; switch between 3D and 2D projected views; and download the data. The viewer supports both single (.nii) and dual (.hdr and .img) NIfTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is 100 MB or less. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D neuroimaging data' submission category. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for downloading from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead. For more information see: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>.



### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

#### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

**AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

## ANEXO C – Carta de aceite do manuscrito para publicação

-----  
Article title: FEAR EXTINCTION CAN BE MADE STATE-DEPENDENT ON PERIPHERAL  
EPINEPHRINE: ROLE OF NOREPINEPHRINE IN THE NUCLEUS TRACTUS SOLITARIUS  
Reference:: YNLME5997

Journal title: Neurobiology of Learning and Memory Corresponding author: Dr.  
Ivan A Izquierdo First author: Dr. Jessica Rosa Accepted manuscript  
(unedited version) available online: 23-OCT-2013 DOI information:  
10.1016/j.nlm.2013.09.018

Dear Dr. Izquierdo,

We are pleased to inform you that your accepted manuscript (unformatted and  
unedited PDF) is now available online at:

<http://authors.elsevier.com/sd/article/S1074742713001950>

You might like to bookmark this permanent URL to your article. Please note  
access to the full text of this article will depend on your personal or  
institutional entitlements.

This version of your article has already been made available at this early  
stage to provide the fastest access to your article. It is not intended to  
be the final version of your article. The manuscript will undergo  
copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is  
published in its final form. Please note changes to the article should not  
be requested at this stage.

Your article can already be cited using the year of online availability and  
the DOI as follows: Author(s), Article Title, Journal (Year), DOI.

Once the full bibliographic details (including volume and page numbering)  
for citation purposes are available, you will be alerted by e-mail.

To track the status of your article throughout the publication process,  
please use our article tracking service:

[http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html?trk\\_article=YNLME5997&trk\\_surname=Izquierdo](http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html?trk_article=YNLME5997&trk_surname=Izquierdo)

Yours sincerely,  
Elsevier Author Support

-----



## ANEXO D – Ata de Defesa de Mestrado



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

### ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 358

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quatorze, no Curso de Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Neurociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul foi concluído o processo de avaliação da dissertação intitulada **“A DEPENDÊNCIA DE ESTADO NA EXTINÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA: PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO, HIPOCAMPO E AMÍGDALA”** de autoria da pós-graduanda **Jessica Rosa** sob orientação do **Prof. Dr. Ivan Antonio Izquierdo** e co-orientação da **Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw**. A comissão examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Nadja Schöder (PUCRS), Dra. Pâmela Billig Mello Carpes (UNIPAMPA), Dr. Marino Muxfeldt Bianchin (UFRGS) e Dr. Fernando Benetti, suplente (PUCRS). A aluna foi **APROVADA**. Para constar, lavrou-se esta ata que deverá ser anexada à documentação exigida para posterior expedição do diploma. A presente ata foi assinada pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Porto Alegre, aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quatorze.

Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes