

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

Andressa Radiske

**Reconsolidação da memória de extinção: Análise Farmacológica,  
Bioquímica e Molecular.**

Porto Alegre

2015

Andressa Radiske

**Reconsolidação da memória de extinção: Análise Farmacológica,  
Bioquímica e Molecular.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Irenio Gomes  
Co-Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre

2015

### DADOS DE CATALOGAÇÃO

R129e Radiske, Andressa

Reconsolidação da memória de extinção: análise farmacológica, bioquímica e molecular / Andressa Radiske. - Porto Alegre: PUCRS, 2015.

63 f.: il.; tab. Inclui artigo aceito para publicação no The Journal of Neuroscience.

Orientador: Prof. Dr. Irenio Gomes.

Co-orientador: Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica.

1. BDNF. 2. EXTINÇÃO. 3. HIPOCAMPO. 4. APRENDIZADO. 5. MEMÓRIA. 6. RECONSOLIDAÇÃO. I. Gomes, Irenio. II. Cammarota, Martín Pablo. III. Título.

**CDD**

612.8

**CDU** 612.821.2:599.323.4(043.2)

**NLM WL** 104

Isabel Merlo Crespo  
Bibliotecária CRB 10/1201

ANDRESSA RADISKE

**Reconsolidação da memória de extinção: Análise Farmacológica,  
Bioquímica e Molecular.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dra Denise Cantarelli Machado

---

Prof. Dra. Tatiana Quarti Irigaray

---

Prof. Dra. Rosane Gomez

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Martín Cammarota - por quem tenho muita admiração e afeto - pois foi ao lado desse brilhante e respeitado neurocientista que aprendi durante a minha formação o significado da palavra Ciência, e com sua amizade, o significado da palavra Confiança. Te agradeço imensamente pelo empenho e dedicação na realização desse trabalho e pelo seu carinho e paciência comigo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lia Bevilaqua, obrigada pela sua amizade, carinho e atenção. Sou muito grata pelos seus conselhos e ensinamentos durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Janine Rossato, grande amiga. Agradeço pelos seus ensinamentos que foram imprescindíveis para o desenvolvimento desse trabalho. Te admiro muito.

Ao Dr. Cristiano e a Dr<sup>a</sup>. Carolina pela amizade e contribuição na realização desse trabalho.

Ao Ramón pelo carinho e amizade.

À equipe do Instituto do Cérebro da UFRN.

Ao Prof. Dr. Irenio pela atenção e ao Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica.

À CAPES e a FAPERGS pelo financiamento da minha bolsa de estudos.

Muito Obrigada!

Andressa Radiske

“Science has something in common with art: without the love of research, knowledge and intelligence cannot truly make a scientist, just as natural aptitude cannot make an artist of someone who does not love his art”.

Irène Joliot-Curie, 1938

## Resumo

**Introdução:** Terapias baseadas no bloqueio da reconsolidação ou no fortalecimento da extinção oferecem a possibilidade terapêutica de diminuir o impacto causado pela persistência das lembranças de eventos traumáticos. No entanto, a interação entre a reconsolidação e a extinção tem sido pouco analisada. Previamente, nosso grupo demonstrou que a memória de extinção do medo pode ser reconsolidada, porém as bases moleculares que sustentam esse processo ainda são desconhecidas. O fator neurotrófico dependente do cérebro (BDNF) tem sido frequentemente relacionado com a extinção do medo; por isso, nós analisamos o possível envolvimento dessa neurotrofina na reconsolidação da memória de extinção do medo.

**Métodos:** Com a tarefa de esQUIVA inibitória como modelo experimental junto com ferramentas farmacológicas específicas, nós investigamos o efeito da expressão gênica, síntese de proteínas e da inibição da sinalização de BDNF sobre a persistência da memória de extinção após a sua reativação em ratos.

**Resultados:** Quando injetado imediatamente após a reativação da memória de extinção, o inibidor de síntese proteica anisomicina (ANI), inibidor de expressão gênica  $\alpha$ -amanitina (AMA), o bloqueador da maturação de BDNF (PAI-1) e um anticorpo bloqueador da função de BDNF (anti-BDNF), prejudicaram a persistência da memória de extinção. Os níveis de pró-BDNF, BDNF e pTrKB foram alterados na região CA1 do hipocampo dorsal após a reativação da memória de extinção. A Co-infusão de BDNF recombinante reverteu o reaparecimento do medo induzido pela infusão de ANI e AMA na região CA1 do hipocampo dorsal.

**Conclusão:** Esses dados sugerem que o BDNF hipocampal é suficiente para sustentar a reconsolidação da memória de extinção do medo e indicam que o aumento da sua sinalização após a reativação da memória de extinção impede a reincidência do medo causado por inibidores desse processo.

Palavras-chave: BDNF; medo; hipocampo; aprendizado; reativação; memória

## Abstract

**Background:** Therapies based on the impairment of memory reconsolidation or the enhancement of extinction learning offer the possibility of diminishing the impact caused by the persistent recollection of traumatic events. Nonetheless, the possible interaction between reconsolidation and extinction has rarely been considered. Previously, we reported that reactivation induces reconsolidation of fear extinction, but the molecular bases of this process are largely unknown. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been repeatedly linked to fear extinction; therefore we analyzed the possible involvement of this neurotrophin in fear extinction memory reconsolidation.

**Methods:** With a step-down inhibitory avoidance-learning task (IA) and selective pharmacological tools, we investigated the effect of gene expression, protein synthesis and BDNF signaling inhibition on the persistent storage of the reactivated fear extinction memory trace in rats.

**Results:** When given in dorsal CA1 immediately after IA extinction reactivation, the protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI), the gene expression inhibitor  $\alpha$ -amanitin (AMA), the BDNF maturation blocker PAI-1, and function-blocking anti-BDNF antibody hindered extinction memory persistence. Pro-BDNF and BDNF levels were altered in dorsal CA1 after extinction memory reactivation. Co-infusion of recombinant BDNF reversed the recovery of fear induced by intra-CA1 ANI and AMA.

**Conclusion:** These data suggest that hippocampal BDNF is sufficient to sustain fear extinction memory reconsolidation and indicate that increasing BDNF signaling after extinction memory retrieval impedes the recurrence of fear caused by impairing this process.

Key words: BDNF; fear; hippocampus; learning; reactivation; memory



## Sumário

1.	Introdução.....	10
2.	Revisão da Literatura .....	13
2.1	Sobre o envelhecimento e a modificação da memória: .....	13
2.2	BDNF e Envelhecimento.....	15
2.3	Extinção da memória aversiva e o papel do BDNF: .....	17
3	Objetivos:.....	20
3.2	Objetivo Geral.....	20
3.3	Objetivos Específicos .....	20
3.	Metodologia .....	21
3.1.	Animais Experimentais.....	21
3.2.	Cirurgia Estereotáxica .....	21
3.3.	Manipulação .....	21
3.4.	Protocolos Experimentais.....	22
3.5.	Tratamentos Farmacológicos.....	23
3.6.	Experimentos bioquímicos .....	24
3.7.	Imunoblot.....	24
4	Hipóteses:.....	25
5	Artigo Científico I .....	27
6	Artigo II .....	44
7	Considerações finais .....	55
8	Referências Bibliográficas.....	56
9	Anexos.....	61

## 1. Introdução

A famosa frase proferida por Descartes “penso, logo existo”, quando colocada em um contexto mais atual, talvez não possa ser considerada totalmente correta, pois, como sugerido por Squire & Kandel (2000), nossa individualidade é formada pelo acervo mnemônico construído a partir de experiências vivenciadas que podem ser expressas. Deste modo, não somos aquilo que somos simplesmente porque pensamos. Somos aquilo que somos porque podemos lembrar daquilo que pensamos. Sendo assim, a evocação das memórias é inerente à formação da nossa personalidade, já que este processo nos permite acessar as nossas lembranças, consciente ou inconscientemente, e assim respondermos aos desafios que o ambiente nos apresenta ao longo da vida. Sabe-se que, após serem expressas, as memórias já consolidadas tornam-se novamente instáveis, devendo passar por um processo de restabilização dependente de síntese proteica denominado reconsolidação para persistir (Przybylski & Sara, 1997; Cammarota et al., 2003). Além disso, a evocação repetida de uma memória na ausência do estímulo incondicionado que levou a sua formação pode desencadear outro fenômeno também dependente da síntese de proteínas, conhecido como extinção (Rossato et al., 2006). Esse processo se manifesta como uma diminuição na probabilidade de emissão da resposta previamente aprendida, mas não envolve o esquecimento da memória original formada, senão o aprendizado de uma nova associação de valência contrária que compete com o traço original pelo controle do comportamento (Pavlov I, 1927). Devido à relevância clínica que o bloqueio da reconsolidação

e o fortalecimento da extinção poderiam ter como tratamento coadjuvante à terapia cognitivo-comportamental para transtornos de ansiedade e medo, as pesquisas têm se concentrado em entender como é possível manipular farmacologicamente esses processos de forma independente. No entanto, a possível existência de reconsolidação para a memória de extinção nunca foi avaliada. Em relação a isso, resultados recentes do nosso grupo demonstraram que a extinção de uma memória aversiva pode ser modulada após a sua reativação; esse processo reconsolidatório requer síntese proteica no hipocampo (Rossato et al., 2010). No entanto, as bases moleculares dos processos que sustentam a reconsolidação da memória de extinção e permitem sua persistência após a sua expressão ainda são desconhecidas.

Sabe-se que, no hipocampo, o fator neurotrófico dependente do cérebro (BDNF) e seu receptor tropomiosina quinase B (TrkB) estão envolvidos nos processos de plasticidade neural e neurogênese, fundamentais para a formação e manutenção das memórias aversivas. Trabalhos recentes demonstraram que a infusão dessa neurotrofina na região infralímbica do córtex pré-frontal medial facilita a extinção (Rosas-Vidal et al., 2014; Peters et al., 2010). Além disso, o BDNF promove, no hipocampo, alterações morfológicas nas sinapses que suportam a manutenção das memórias de longa duração (Bekinschtein et al., 2008) e, por outra parte, sabe-se que humanos e roedores com polimorfismos que reduzem a expressão de BDNF no hipocampo apresentam prejuízos na consolidação da memória de extinção (Pattwell et al., 2012; Soliman et al., 2010). Devido a essas evidências, decidimos investigar o papel dessa neurotrofina na manutenção da memória de extinção. Nossos resultados confirmam a hipótese

de que o BDNF é suficiente para evitar o reaparecimento do medo causado pelo bloqueio da reconsolidação da memória de extinção.

O entendimento sobre os mecanismos básicos associados com a extinção e a reconsolidação de memórias é indispensável para compreender a dinâmica das modificações moleculares decorrentes do declínio cognitivo que é prevalente com o aumento da idade, já que a perda das funções cognitivas pode ser derivada de alterações estruturais e moleculares específicas, como modificações na morfologia celular que podem levar à morte neuronal. Portanto, são necessários mais estudos acerca dos requisitos bioquímicos envolvidos no percurso e na vulnerabilidade de um traço mnemônico após a sua expressão.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Sobre o envelhecimento e a modificação da memória:**

O envelhecimento é caracterizado pela diminuição progressiva da capacidade funcional, acarretando limitações de ordem física, psicológica e social que afetam drasticamente a qualidade de vida do idoso (Squire & Kandel, 2000). No entanto, em função das melhorias das condições de vida em geral e do avanço tecnológico da área médica, a expectativa de vida aumentou. De acordo com dados do IBGE, o crescimento da população idosa está ocorrendo a um nível sem precedentes. A população de 65 anos ou mais de idade, no Brasil, aumentou entre 1997 e 2007 em 49,2% (IBGE, 2002). Deste modo, o aumento da expectativa de vida e do número de pessoas acima de 65 anos reflete drasticamente no aumento progressivo da prevalência de transtornos cognitivos e psiquiátricos que afetam a memória (Ferri et al., 2012).

Com a senescência cuja característica está associada com o processo normal do envelhecimento, inicia-se uma série de mudanças neuropsicológicas, especialmente como os déficits cognitivos associados com alterações no aprendizado e memória, pois, nessa fase da vida, existem fatores estressantes mais frequentes e intensos, destacando-se as doenças físicas e perda de autonomia que levam a sintomas depressivos e ansiosos. Além disso, a capacidade de modificar as conexões do encéfalo varia em função da idade. Há uma perda de sinais modulatórios no hipocampo - estrutura do lobo temporal fundamental para o processamento mnemônico – que leva a prejuízos na

plasticidade sináptica, que, por consequência, prejudica o aprendizado e a memória (Burke et al., 2006). No entanto, o número de neurônios glutamatérgicos hipocampais em humanos, macacos e ratos, não diminui com o envelhecimento normal (Burke & Barnes, 2010). Além disso, em um estudo realizado com humanos, foi demonstrado que a ramificação dendrítica de idosos saudáveis comparado com indivíduos jovens não varia; no entanto, essa diferença fica evidente quando comparada com idosos que apresentam demência senil (Flood et al., 2010). Com isso, acredita-se que as alterações que prejudicam a memória durante a senescência são derivadas de modificações estruturais e moleculares específicas. Por exemplo, em um estudo realizado com modelo animal que apresenta perda da memória relacionado com a idade, demonstrou-se uma diminuição das sinapses excitatórias em vias aferentes do hipocampo, que ocasionam prejuízos na potenciação de longa duração (LTP), os quais afetam drasticamente o aprendizado e a memória (Landfield et al., 1978). Além disso, os interneurônios inibitórios gabaérgicos apresentam degeneração e perda de função durante o envelhecimento (Burke & Barnes, 2010). O Ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório dominante do sistema nervoso central; contudo, prejuízos na sua funcionalidade levam a danos para a formação da memória de extinção (Kim et al., 2007b), que está prejudicada durante o envelhecimento (Topic et al., 2005), e também em indivíduos que apresentam alguma psicopatologia ligada ao medo e à ansiedade.

Desse modo, para entender acerca dos prejuízos da memória decorrente do processo normal ou patológico do envelhecimento, é necessário compreender as bases moleculares e bioquímicas que sustentam formação e a

expressão das memórias, já que esse é um domínio cognitivo dinâmico e que está em constante reorganização em diferentes regiões encefálicas. Portanto, estudos provenientes da pesquisa experimental básica são fundamentais para compreender e detectar com mais facilidade o que pode estar acontecendo de anormal nestes mecanismos e, subsequentemente, determinar a origem das doenças que afetam a expressão da memória.

## **2.2 BDNF e Envelhecimento.**

A memória é um dos primeiros domínios cognitivos a ser afetado em consequência das psicopatologias que incidem sobre a população idosa. Por isso, os estudos sobre a fisiologia dos processos cognitivos têm sido importantes para compreender a dinâmica dos requisitos moleculares envolvidos com a modificação das memórias que ocorrem durante o processo de envelhecimento.

O BDNF desempenha um papel de extrema relevância na regulação da estrutura, função e desenvolvimento neuronal até a idade adulta, além de estar envolvido na regulação da plasticidade sináptica no hipocampo (Bekinschtein et al., 2008). No entanto, com o envelhecimento, os níveis dessa neurotrofina estão diminuídos em neurônios piramidais no hipocampo e nas células granulares do giro denteado, estruturas fundamentais para a manutenção e expressão de memórias (Gooney et al., 2004). Esse desequilíbrio entre a expressão de BDNF e as modificações morfológicas que ocorrem no cérebro do idoso pode levar à perda da memória, que é considerada um fator de risco para desencadear os transtornos de ansiedade que levam à depressão, distúrbio psiquiátrico mais comum na população idosa que afeta drasticamente as funções cognitivas e

eleva o risco de demências (Benjamin et al., 2011). Além disso, estudos com neuroimagem realizados em idosos deprimidos demonstraram que há uma redução significativa do volume hipocampal desses pacientes (Schmidt et al., 2007). Por outro lado, estudos realizados com roedores demonstraram que essa atrofia hipocampal pode ser revertida com o uso de antidepressivos, pois o mecanismo de ação desses psicofármacos envolve a normalização dos níveis de BDNF no hipocampo (Garza et al., 2004). Outro trabalho realizado com modelo animal com depressão demonstrou que roedores apresentam perda de fibras serotoninérgicas e redução dos espinhos dendríticos no hipocampo; contudo, esses efeitos foram revertidos através de manipulações que melhoram a sinalização de BDNF e serotonina, que parecem agir em conjunto para regular aspectos da plasticidade neural em várias regiões do cérebro (Mattson et al., 2004). Desse modo, a sinalização desses neuromoduladores parece estar prejudicada durante o processo de envelhecimento e também com as doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade. O conjunto desses resultados sugere que a plasticidade hipocampal pode ser modulada com o uso de antidepressivos, por ser um possível mediador que melhora a expressão de BDNF. Esses dados apontam que essa neurotrofina parece desempenhar um papel importante na fisiopatologia da depressão.

Considerando essas consequências negativas da depressão geriátrica, o estudo da etiologia dessa psicopatologia é um passo importante para compreender como as memórias se modificam em consequência dos transtornos psiquiátricos que afetam a população idosa.



### **2.3 Extinção da memória aversiva e o papel do BDNF:**

O medo é um processo adaptativo que nos permite responder adequadamente aos estímulos e contextos que prenunciam o perigo. No entanto, a incapacidade de extinguir a expressão de um estímulo aversivo, em resposta a um estímulo que não prevê ameaça iminente, define o cenário das psicopatologias ligadas ao medo e à ansiedade, que estão entre os transtornos mentais mais comuns de serem diagnosticados. Essas disfunções normalmente são tratadas com terapias de extinção baseadas na exposição ao estímulo que levou à formação do trauma; contudo, a diminuição das respostas condicionadas do medo após a extinção não é permanente, podendo reaparecer mediante os fenômenos denominados recuperação espontânea, (Rescorla, 2004) renovação, (Bouton et al., 2004) ou restabelecimento (McAllister & McAllister, 2006), que são alvos dos estudos acerca desses distúrbios. Evidências clínicas indicam que os tratamentos farmacológicos quando realizados de modo coadjuvante à terapia cognitivo-comportamental, como a terapia de exposição baseada na extinção do medo, podem melhorar a eficácia do tratamento. Porém, a associação de alguns medicamentos comumente usados para os transtornos de ansiedade e medo, como os benzodiazepínicos, não estão sendo mais efetivos, e sim contraproduativos por afetar o aprendizado do procedimento terapêutico (Ressler et al., 2014). Desse modo, compreender as bases neurobiológicas e comportamentais subjacentes à formação da memória de extinção desperta um grande interesse tanto na ciência básica como na pesquisa clínica.

A consolidação da memória de extinção envolve a formação de um novo aprendizado de associação contrária que compete com o traço original pelo controle do comportamento. Esse processo recruta uma complexa via regulatória que envolve um padrão de alterações intracelulares que conduzem à síntese de novas proteínas e expressão de novos genes (Ressler et al., 2014). Recentes trabalhos realizados em ratos e humanos demonstraram que o aprendizado inibitório formado durante as terapias de exposição ao medo pode ser reforçado farmacologicamente com D-cicloserina, um agonista do receptor NMDA (N-Metil-D-aspartato) (Ledgerwood et al., 2005; Bouton et al., 2008; Ressler, 2004; Kuriyama et al., 2011), que pode agir juntamente com BDNF e seu receptor TrkB (Andero et al., 2012). O BDNF fortalece a transmissão das sinapses glutamatérgicas e aumenta a fosforilação das subunidades NR2B do receptor NMDA no hipocampo que, por sua vez, controla a indução de LTP (potenciação de longa duração) melhorando a efetividade sináptica. Essa neurotrofina desempenha diversas funções na regulação da estrutura neuronal durante o desenvolvimento, além de modular as modificações sinápticas decorrentes do aprendizado e da memória. A infusão de BDNF exógeno no hipocampo ou no córtex medial infralímbico melhora a formação da memória de extinção (Sotres-Bayon & Quirk, 2010). Em função disso, há um interesse crescente nos efeitos do BDNF sobre a plasticidade neuronal que medeia a consolidação da memória de extinção do medo (Andero et al., 2012), visto que essa neurotrofina e seu receptor estão presentes no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, componentes da circuitaria neuronal envolvidas no processamento do medo. Pessoas que sofrem de transtorno de estresse pós-traumático, cuja característica principal é a incapacidade de extinguir uma memória aversiva,

apresentam redução do volume hipocampal, o que afeta a conectividade dessa região com outras estruturas, como o córtex pré-frontal infralímbico (Peters et al., 2010). Em consequência disso, supõe-se que a sinalização de BDNF esteja deficiente nessas estruturas, acarretando, conseqüentemente, prejuízos na sintomatologia dos transtornos psiquiátricos e tornando menos efetiva as terapias baseadas na extinção. A partir de uma perspectiva clínica, tratamentos que melhoram a sinalização de BDNF podem ser úteis para aliviar os sintomas decorrentes da expressão de memórias traumáticas. No entanto, ainda é necessário compreender amplamente as bases comportamentais, neurofisiológicas e bioquímicas que sustentam a formação de uma memória de extinção.

### **3 Objetivos:**

#### **3.2 Objetivo Geral**

O objetivo geral do presente trabalho é analisar comportamental e bioquimicamente a participação da neurotrophina BDNF na reconsolidação da memória de extinção em ratos.

#### **3.3 Objetivos Específicos**

- Estudar o efeito da inibição de BDNF na região CA1 do hipocampo dorsal após a expressão da memória de extinção.
  
- Analisar a natureza da amnésia induzida pela inibição de BDNF na região CA1 do hipocampo dorsal após a expressão da memória de extinção, com o intuito de determinar se a mesma é consequente do bloqueio persistente da evocação ou da supressão do traço mnemônico.
  
- Estudar se o BDNF é necessário e suficiente para a manutenção da memória aversiva após sua reativação.
  
- Analisar se o efeito da administração de BDNF exógeno no momento da reativação da memória de extinção é suficiente para prevenir o reaparecimento da memória aversiva causada por inibidores de síntese proteica e transcrição gênica.

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Animais Experimentais**

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando em média 320 g. Os animais foram mantidos em caixas moradias contendo 5 animais cada, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23°C), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h, com água e comida *ad libitum*. Foram tomadas precauções com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com as normas dos “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

#### **3.2. Cirurgia Estereotáxica**

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0 mm acima do hipocampo, seguindo as coordenadas (AP -4,2 mm, LL  $\pm$ 3,0 mm, DV -2,0 mm) do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com Xilazina (“Coopazine”; Coopers), administrados intra-peritonealmente (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Uma vez recuperados da anestesia, os animais eram recolocados em suas caixas-moradia, sem ter ocorrido troca entre os mesmos em cada caixa ao longo de todo o experimento.

#### **3.3. Manipulação**

Quatro dias após a cirurgia, os animais foram submetidos a duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da caixa moradia e manuseados durante 5 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

### **3.4. Protocolos Experimentais**

#### **3.4.1. Esquiva inibitória**

A esquiva inibitória baseia-se no aprendizado associativo estabelecido por Pavlov. Trata-se de um paradigma de condicionamento ao medo muito utilizado, no qual o estímulo condicionado é a parte segura da caixa, a plataforma, o estímulo incondicionado é um choque nas patas do animal quando o mesmo desce da plataforma e a resposta condicionada é permanecer na área segura, resultando no aumento da latência de descida da plataforma após a exposição ao estímulo incondicionado (Cammarota et al., 2004; Bevilaqua et al., 2003).

O aparato utilizado na tarefa de esquiva inibitória consiste em uma caixa nas dimensões 50 x 25 x 25 cm (L x A x C), com uma plataforma do lado esquerdo, medindo 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm de comprimento, e barras metálicas que constituem o assoalho da caixa e podem conduzir corrente elétrica. Durante a sessão de treino os animais (Ratos Wistar machos de 3 meses de idade) foram colocado na plataforma, quando o animal desceu da plataforma para explorar o restante da caixa de treino e, no momento em que colocou suas quatro patas sobre a grade, ele recebeu um choque elétrico (0,4 mA por 2 s). Assim, em apenas uma sessão, os animais aprenderam a não descer da plataforma para evitar o choque. Para extinguir a memória de esquiva, os animais foram submetidos a uma sessão diária de evocação não reforçada durante 5 dias consecutivos (Cammarota et al., 2003). Para isto os animais foram colocados na plataforma da caixa de treino, quando eles desceram da mesma não receberam o choque e foi permitido explorar a caixa de treino durante 30 segundos. Durante a sessão de reativação, realizada no 6º dia, os animais foram colocados na plataforma da caixa de treino e ao descer eles foram retirados imediatamente da mesma, após este processo eles foram submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos em diversos tempos. O procedimento utilizado na sessão de teste era idêntico ao empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para as sessões de treino e teste foram adotados tempos máximos de descida, sendo 30 segundos para a sessão de treino e 300 segundos para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua caixa moradia, aqueles animais que

durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 30 segundos foram eliminados do estudo. Os testes foram realizados 24h ou 160h após a reativação da memória. No momento da infusão da droga, uma agulha de infusão 30-gauge era colocada dentro da cânula implantada. As infusões (0,5 $\mu$ L/lado) se davam ao longo de 60 segundos e a agulha de infusão ficava no lugar por mais 60 segundos para evitar refluxo. A localização exata do implante das cânulas foi verificada post mortem através de análise histológica.

### **3.5. Tratamentos Farmacológicos**

Os Fármacos utilizados neste estudo foram AMA ( $\alpha$ -Amanitina) Inibidor da polimerase II e III do RNA eucarioto; BDNFab (do inglês brain-derived neurotrophic factor) Inibidor da funcionalidade da proteína BDNF; BDNF recombinante exógeno; ANI (Anisomicina) Inibe a síntese protéica por impedir a atividade da enzima peptidil transferase. Os fármacos foram preparados imediatamente antes do uso, a fim de evitar degradação, os mesmos foram dissolvidos em DMSO ou solução salina 0,9% e armazenados protegidos da luz, a -20°C até o momento do uso. Instantes antes da administração, uma alíquota era degelada e diluída até a concentração de trabalho com 0,1% de DMSO em salina (pH 7.2). As doses utilizadas foram determinadas baseadas em experimentos pilotos e estudos prévios mostrando o efeito de cada composto sobre o aprendizado ou desempenho comportamental. Para a realização do tratamento farmacológico utilizou-se uma microseringa Hamilton, acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Foram infundidos bilateralmente 0,5  $\mu$ L/lado dos fármacos ou seu veículo (0,1% DMSO em solução salina 0,9%) a uma velocidade de 0,5  $\mu$ L/min com o auxílio de uma bomba de infusão (KDScientific). Ao término, a agulha de infusão era deixada no local por 60 segundos adicionais para evitar refluxo.

### **3.6. Experimentos bioquímicos**

Nos experimentos bioquímicos foram utilizados 3 grupos controles: 1) Controle Absoluto total: animais que não receberam nenhum estímulo experimental e que foram utilizados como referência em todos os experimentos bioquímicos; 2) Controle (TR): animais que foram treinados na tarefa de EI porém, não foram submetidos ao protocolo de extinção e reativação; 3) Controle (EXT): animais que foram treinados na tarefa de EI e submetidos ao protocolo de extinção, porém não foram submetidos à reativação da memória realizada 24h após a última sessão de extinção; 4) animais treinados e sacrificados em diferentes tempos após a reativação.

### **3.7. Immunoblot**

A separação eletroforética de proteínas foi realizada através de técnicas convencionais. A detecção imunológica das proteínas eletrotransferidas a membranas de PVDF foi realizada utilizando anticorpos secundários acoplados a peroxidase e um sistema quimioluminescente.



#### 4 Hipóteses:

*- A infusão intra-hipocampal de um anticorpo bloqueador da funcionalidade de BDNF após a reativação da memória de extinção não apaga a mesma, mas afeta um mecanismo necessário para a formação de sua representação no momento da evocação.*

Para avaliar se o BDNF é necessário para a manutenção da memória de extinção após sua evocação, foram utilizados ratos Wistar machos (3 meses de idade, 300-350 g), os quais foram treinados na tarefa de esQUIVA inibitória e submetidos ao protocolo de extinção. Para avaliar esta hipótese em particular, foi estudada a velocidade de re-aquisição da memória de extinção após o bloqueio de sua reconsolidação, bem como a existência de remanescentes do traço original e da memória de extinção após o tratamento farmacológico. A inibição do BDNF foi obtida mediante a infusão de um anticorpo bloqueador dessa neurotrofina através de cânulas de infusão posicionadas na região CA1 do hipocampo. A memória foi avaliada 1 ou 7 dias após a infusão.

*- A co-infusão de BDNF exógeno junto com o inibidor de síntese proteica ou inibidor de expressão gênica imediatamente após a reativação da memória de extinção reverte o efeito amnésico causado por esses fármacos quando infundidos isoladamente. Esse dado indica que BDNF é necessário e suficiente para a manutenção da memória de extinção após sua reativação.*

Para corroborar essa hipótese, ratos wistar foram treinados na esQUIVA inibitória e submetidos ao protocolo de extinção, imediatamente após a reativação da memória de extinção. Os animais foram co-infundidos com anisomicina (inibidor de síntese proteica) e BDNF exógeno ou amanitina (inibidor da transcrição genica) e BDNF exógeno, juntamente com os respectivos controles. A memória foi avaliada 1 ou 7 dias após a infusão.

- *A atividade neuronal regula a transcrição de uma grande variedade de genes, muitos dos quais codificam proteínas que modificam a funcionalidade sináptica. No hipocampo, a funcionalidade da neurotrofina BDNF parece estar envolvida em processos de plasticidade neural e neurogênese. Com isso, supõe-se que essa neurotrofina, junto com seus mediadores, estão funcionalmente expressos na manutenção da memória de extinção após a reativação.*

O nível de ativação de BDNF, pró-BDNF e TrkB foi determinado mediante a avaliação do seu estado de funcionalidade e fosforilação por *immunoblot*, com anticorpos específicos. A identidade das proteínas induzidas pela reativação da memória de extinção na região CA1 do hipocampo dorsal foi obtida a partir dos seguintes grupos experimentais:

**Naïve:** Animais não submetidos a nenhum estímulo comportamental relevante;

**Treinados:** Animais treinados na tarefa de esquiva inibitória e eutanasiados em tempos distintos após o treino sem serem submetidos ao protocolo de extinção;

**Extinção:** animais treinados na tarefa de esquiva inibitória e eutanasiados após serem submetidos ao protocolo de extinção;

**Tempos após a reativação (0, 30, 90 180 e 360 minutos):** Animais treinados na tarefa de esquiva inibitória, submetidos ao protocolo de extinção e eutanasiados em tempos distintos após a reativação desta memória.

## 5 Artigo Científico I

Publicado na revista *The Journal of Neuroscience*.

22 April 2015, 35(16): 6570-6574; doi: 10.1523/JNEUROSCI.4093-14.2015

### **Requirement for BDNF in the Reconsolidation of Fear Extinction**

Andressa Radiske<sup>1</sup>, Janine I. Rossato<sup>1</sup>, Cristiano A. Köhler<sup>1</sup>, Maria Carolina Gonzalez<sup>1</sup>, Jorge H. Medina<sup>1,2</sup>, and Martín Cammarota<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Memory Research Laboratory, Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Nascimento de Castro 2155, RN 59056-450, Natal, Brazil, and <sup>2</sup>Laboratory for Memory Research, Institute for Cell Biology, School of Medical Sciences, University of Buenos Aires, Paraguay 2155, CP 1121, Buenos Aires, Argentina. \*To whom correspondence should be addressed at martin.cammarota@neuro.ufrn.br

**Abbreviated title:** BDNF and fear extinction reconsolidation

**Number of pages:** 16

**Number of figures:** 4

**Total number of words:** 4086

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) to M.C. A.R. holds a FAPERGS Ph.D. Research Fellowship through Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do

Sul (PUCRS, Brazil). C.A.K. is a Postdoctoral Research Fellow supported by CAPES. M.C.G. holds a Young Talents Attraction Post-doctoral Research Fellowship through CAPES and J.H.M is a Visiting Researcher Fellow supported by CNPq through the Science without Borders Program. The authors declare no competing financial interests.

## **Abstract**

Therapies based on the impairment of reconsolidation or the enhancement of extinction offer the possibility of decreasing the persistent recollection of distressing memories. However, the direct interplay between reconsolidation and extinction has rarely been considered. Previously, we reported that reactivation induces reconsolidation of fear extinction memory. Here, using a step-down inhibitory avoidance learning paradigm in rats, we show that intra-hippocampus infusion of function-blocking anti-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) antibody immediately or 6 h after extinction memory reactivation impairs the reconsolidation of extinction. Extinction memory reactivation increases  $\text{proBDNF}$ , BDNF and tropomyosin receptor kinase B (TrkB) phosphorylation levels in dorsal CA1, and blocking BDNF maturation in the hippocampus with plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) hinders the persistence of extinction and induces the recurrence of fear. Moreover, co-infusion of recombinant BDNF (0.25  $\mu\text{g}/\text{side}$ ) after extinction memory reactivation impedes the recovery of the avoidance response induced by inhibiting gene expression and protein synthesis in the dorsal hippocampus. Our findings unravel a new role for BDNF, suggesting that this neurotrophin is necessary and sufficient to maintain the reactivated fear extinction engram.

## Introduction

Repeated unreinforced reexposure to the conditioned stimulus induces extinction of conditioned fear. This protein synthesis-dependent process creates an inhibitory memory that competes with, but does not destroy, the original one. Instead, brief re-exposure to the conditioned stimulus results in reconsolidation of the learned response. Reconsolidation restabilizes the trace labilized during unreinforced retrieval and depending on the conditions prevailing at that moment can also strengthen or update the reactivated memory engram. Blockade of memory reconsolidation and enhancement of extinction learning offer the therapeutic possibility of diminishing the impact caused by the intrusive recollection of traumatic events (Parsons and Ressler, 2013). However, the direct interplay between reconsolidation and extinction has seldom been analyzed. Previously, we demonstrated that fear extinction memory can undergo protein synthesis-dependent reconsolidation in the hippocampus (Rossato et al., 2010). This suggests that maintenance of fear extinction memory can be modulated upon its reactivation, and indicates that understanding the molecular bases of extinction memory reconsolidation can lead to pharmacological strategies for increasing the persistence of extinction and therefore help post-traumatic stress disorder (PTSD) patients to overcome the recurrence of disturbing recollections. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a key member of the neurotrophic family of signaling proteins. Besides its well-documented participation in neuronal proliferation and survival, BDNF regulates synaptic plasticity and memory storage, and is linked to fear extinction (Panja and Bramham, 2014; Bekinschtein et al., 2008a; Rosas-Vidal et al., 2014). Intra-hippocampus administration of BDNF induces extinction of conditioned fear even in the absence of extinction training (Peters et al., 2010) and rescues the late-phase of long-term potentiation as well as the amnesia caused by protein synthesis inhibitors (Pang et al., 2004; Bekinschtein et al., 2008b). Actually, hippocampus-specific deletion of BDNF impairs aversive memory extinction (Heldt et al., 2007). Therefore, we posited that BDNF is also responsible for sustaining avoidance extinction after reactivation. If this hypothesis is true, then impairing BDNF function upon reactivation of extinction memory should recover the learned fear response. Furthermore, when administered at the moment of

fear extinction reactivation, exogenous BDNF should suffice to prevent the reappearance of fear caused by blocking extinction memory reconsolidation.

## **Materials and Methods**

*Subjects, surgery and drug infusion procedures:* The subjects were experimentally naive 3 month-old male Wistar rats, weighting 280–310 g at the start of the experiments. They were housed in groups of 5, kept with free access to water and food in a holding room maintained at 22-23°C on a normal light cycle (12 h light: 12 h dark; lights on at 6.00 AM) and implanted with 22-gauge guides aimed to the CA1 region of the dorsal hippocampus at stereotaxic coordinates AP -4.2/LL  $\pm$ 3.0/DV -3.0. The animals were allowed to recover from surgery for 4 days before any other procedure. At the time of drug delivery, infusion cannulas were tightly fitted into the guides and injections (1  $\mu$ l/side) carried out over 60 s with a microinjection pump. The cannulas were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. At the end of surgery, animals were injected with a single dose of meloxicam (0.2 mg/kg) as analgesic. Behavioral procedures commenced 5-7 days after surgery. The placement of the cannulas was verified postmortem: 2-4 h after the last behavioral test, 1  $\mu$ l of a 4% methylene-blue was infused as described above and the extension of the dye 30 min thereafter taken as an indication of the presumable diffusion of the previously given drug. Only data from animals with correct implants were analyzed.

*Inhibitory avoidance training:* After recovery from surgery, animals were handled once a day for 2 days and then trained in the one-trial step-down inhibitory avoidance (IA) task during the light phase of the subjective day (between 9:00 and 11:00 AM). The training apparatus was a 50  $\times$  25  $\times$  25-cm Plexiglas box with a 5-cm- high, 8-cm-wide, and 25cm-long platform on the left end of a series of bronze bars that made up the floor of the box. For training, animals were placed on the platform facing the left rear corner of the training box and when they stepped down and placed their four paws on the grid received a 2-s 0.5-mA scrambled foot-shock and were immediately withdrawn from the training box.

*Inhibitory avoidance memory extinction procedure:* To extinguish the learned avoidance response, rats trained in IA were submitted to 5 unreinforced test

sessions 24 h apart. For this purpose, the animals were put back on the training box platform until they stepped down to the grid. No footshock was given, and the animals were allowed to explore the training apparatus freely for 30 s after they had stepped down. During this time the animals stepped up onto the platform and down again several times. To reactivate the extinction memory trace, 24 h after the last extinction training session the animals were put on the training box platform until they stepped down and right after that were removed from the training box. In some experiments the animals were submitted to a second extinction protocol after memory reactivation.

*Drugs:* Anisomycin (ANI; 160 µg/side, Sigma-Aldrich), α-amanitin (AMA; 45 ng/side,

Sigma-Aldrich), AP5 (5 µg/side, Sigma-Aldrich) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1; 50 ng/side, Sigma-Aldrich) were dissolved according to the manufacturer instructions and stored protected from light at -20 °C until use. Right before that, an aliquot was thawed and diluted to working concentration in 0.1% DMSO in saline (pH 7.2). The doses used were determined based on pilot experiments and previous studies showing the behavioral and biochemical effects of each compound (Bekinschtein et al., 2007; Revest et al., 2014). Human recombinant BDNF (BDNF) was from Sigma-Aldrich (lot number SLBC5725V) and function-blocking anti-BDNF antibody (BDNFab) was from EMD Millipore. They were dissolved at working concentration in sterile saline and stored at -20 °C until use. BDNF was administered at 0.25 µg/side, a dose that has been previously shown to reverse the amnesic effect caused by inhibition of hippocampal protein synthesis (Bekinschtein et al., 2008b). BDNFab was administered at 0.5 µg/side, a dose that has been previously shown to hinder BDNF signaling in the dorsal hippocampus (Bekinschtein et al., 2007).

*Immunoblotting:* Animals were killed by decapitation and the CA1 region of the dorsal hippocampus rapidly dissected out and homogenized in ice-chilled homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 15 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml bacitracin, 10 µg/ml pepstatin, 50 mM NaF, and 1 mM sodium orthovanadate). Protein concentration was determined using the BCA protein assay (Pierce), and equal amounts of proteins fractionated by SDS- PAGE

before being transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore). After verification of protein loading by Ponceau S staining the blots were blocked in TweenTris-HCl buffer saline (TTBS; 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9% NaCl and 0.1% Tween 20) and incubated overnight with anti-BDNF (1:5000 dilution, Santa Cruz Biotechnology), anti-proBDNF (1:5000 dilution, Sigma-Aldrich), anti-TrkB (1:5000 dilution, Sigma-Aldrich), anti-pTyr515TrkB (1:10000 dilution, Sigma-Aldrich) or  $\beta$ -tubulin (1:20000, Abcam). The blots were washed in TTBS and incubated with HRP-coupled anti-IgG antibody, washed again, and the immunoreactivity detected using the West-Pico enhanced chemiluminescence kit (Pierce). Densitometric analyses were carried out with an ImageQuant RT-ECL system (GE).

## Results

To test the hypotheses mentioned above, we utilized a one-trial step-down inhibitory avoidance task (IA) in rats. IA training produces a persistent hippocampus-dependent aversive memory (Bekinschtein et al., 2008b). However, repeated re-exposure to the training apparatus in the absence of the ensuing footshock induces the NMDA-dependent extinction of the IA response ( $F_{1,12} = 4.77$ ,  $p = .04$  for treatment and  $F_{4,48} = 2.69$ ,  $p = .04$  for treatment x session interaction), which is not prone to spontaneous recovery, reinstatement or renewal (Figs. 1A and 1B). Confirming and extending previous results (Rossato et al., 2010), we found that the protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI; 160  $\mu$ g/side) and the mRNA synthesis blocker  $\alpha$ -amanitin (AMA; 45 ng/side) impaired the retention of extinction when given in the dorsal hippocampus immediately after extinction memory reactivation ( $F_{2,27} = 9.64$ ,  $p = .0007$  and  $F_{2,27} = 7.47$ ,  $p = .0026$  for 1 day and 7 days post-reactivation, respectively) but not 6 h thereafter (Fig. 1C), indicating that reconsolidation of avoidance extinction requires not only protein-synthesis but also gene-expression in the hippocampus. We also found that intra-dorsal hippocampus infusion of function-blocking anti-BDNF antibody (BDNFab; 0.5  $\mu$ g/side) immediately (Fig. 2A;  $t_{22} = 5.19$  and  $t_{22} = 4.79$ ;  $p < .0001$  for 1 day and 7 days, respectively) or 6 h after extinction memory reactivation (Fig. 2A;  $t_{19} = 6.01$  and  $t_{19} = 4.65$ ;  $p < .0001$  for 1 day and 7 days, respectively) induced the reappearance of the IA response on test sessions carried out 1 day



or 7 days later. BDNFab had no effect on extinction memory persistence when given 12 h post-reactivation or when injected 24 h after the last extinction training trial in the absence of a behaviorally relevant event, indicating that it did not alter locomotion, motivation or anxiety nor affected the functionality of the hippocampus nonspecifically. The mnemonic effect of BDNFab cannot be attributed to transient inhibition of extinction memory expression either, because reextinction of the recovered avoidance response necessitated several re-exposure sessions and was blocked by the NMDAr antagonist AP5 (5 µg/side) (Fig. 2B;  $F_{1,20} = 10.41$ ,  $p = .004$  for treatment and  $F_{4,80} = 4.39$ ,  $p = .003$  for treatment x session interaction), exactly as initial extinction. Extinction memory reactivation increased proBDNF and BDNF levels, as well as the phosphorylation of tropomyosin receptor kinase B (TrkB) at Tyr 515 (pTrkB) in dorsal CA1, but had no effect on total TrkB expression (Fig 3A). proBDNF peaked 30 min post-reactivation and remained increased for at least 90 min ( $F_{5,20} = 7.02$ ,  $p = .0006$ ). The increases in BDNF ( $F_{5,20} = 5.01$ ,  $p = .0039$ ) and pTrkB levels ( $F_{5,20} = 5.30$ ,  $p = .0029$ ) were slower and reached a maximum between 180 min and 360 min post-reactivation, probably reflecting the proteolytic conversion of newly synthesized proBDNF to mature BDNF, a key step in BDNF signaling and memory processing. Indeed, intra-dorsal hippocampus infusion of the BDNF maturation blocker plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1, 50 ng/side; Revest et al., 2014) immediately after extinction memory reactivation also hampered the persistence of extinction and induced the reappearance of avoidance (Fig. 3B;  $t_{15} = 6.27$ ;  $p < .0001$  and  $t_{15} = 2.70$ ;  $p = .016$  for 1 day and 7 days post-reactivation, respectively). Importantly, co-infusion of recombinant BDNF (0.25 µg/side) right after extinction memory reactivation impeded the recovery of the learned avoidance response induced by ANI and AMA, suggesting that BDNF is sufficient to restabilize the IA extinction memory trace after reactivation (Fig. 4).

## Discussion

Most findings suggest that the persistent recollection of fearful and aversive experiences can be attenuated by enhancing extinction learning or by impairing memory reconsolidation. Our data indicate that the recurrence of learned fear can be controlled also by modulating BDNF signaling at the moment of extinction memory reactivation. This initiates a gene expression- and protein synthesis-dependent reconsolidation process that induces proBDNF, its conversion to mature BDNF and the activation of TrkB in the dorsal hippocampus, and is totally hindered by blocking BDNF maturation or functionality. Furthermore, pharmacological activation of BDNF signaling immediately after extinction memory expression precludes the reemergence of fear caused by impairing extinction memory reconsolidation with inhibitors of mRNA and protein synthesis, suggesting that BDNF is not only necessary but also sufficient for maintaining the avoidance extinction memory trace after reactivation. Several plasticity phenomena susceptible to protein synthesis blockers, including conditioned taste aversion and spatial memory consolidation as well as synaptic potentiation (Martinez-Moreno et al., 2011; Ozawa et al., 2014; Pang et al., 2004) are restored by exogenous BDNF, maybe through a mechanism involving inhibition of PKM $\zeta$  degradation (Mei et al., 2011). In this respect, it was demonstrated that BDNF is internalized promptly after exogenous application and becomes rapidly available for activity-dependent secretion, successfully replacing the new synthesis pathway (Santi et al., 2006). Our results showing that BDNFab, but not AMA or ANI, hinders extinction memory when given 6 h after reactivation indicate that gene expression and protein synthesis are dissociated from BDNF at this time point. On this matter, it was previously shown that BDNF regulates several plastic mechanisms in a protein-synthesis independent manner (Panja and Bramham, 2014). For example, the rapid increase in synaptophysin and synaptobrevin levels induced by BDNF in hippocampal slices, as well as the modulation of hippocampal high-frequency transmission produced by this neurotrophin are not prevented by protein synthesis inhibitors (Gottschalk et al., 1999; Tartaglia et al., 2001). The facilitatory role of BDNF in the acquisition of fear extinction is well documented (Ander and Ressler, 2012) and there seems to be a correlation between PTSD risk and BDNF expression levels (Zhang et al., 2014). On the

contrary, the involvement of BDNF in memory reconsolidation has seldom been demonstrated (Samartgis et al., 2012; Wang et al., 2012; Giachero et al., 2013). Indeed, it has been repeatedly suggested that BDNF actually participates in memory consolidation but not in reconsolidation (Lee et al., 2004; Lee and Hynds, 2013), which seems to contradict our results. However, it must be pointed out that our experiments do not entail the reactivation of a single memory trace, as is the case for almost all previous studies on the potential role of BDNF in memory reconsolidation but, instead, involve two conflicting well-consolidated memories competing for the control of behavior. Therefore, we believe that at least for the reconsolidation of extinction memory, it would be too simplistic to talk about BDNF as a “consolidation” or a “reconsolidation” protein. Instead, we prefer to think of BDNF as a key mediator of the physiological mechanisms controlling the persistent behavioral dominance of extinction memory after its reactivation. In any case, our results unravel a new role for BDNF, and further demonstrate the existence of a hitherto unexplored window of opportunity for the treatment of anxiety disorders.

## References

Andero R, Ressler KJ (2012) Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behav* 11:503-12.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53:261-77.

Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2008) BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* 14:147-56.

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A et al. (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2711-6.

Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12:656-70.

Giachero M, Bustos SG, Calfa G, Molina VA. (2013) A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learn Mem.* 20:245-55.

Gottschalk WA, Jiang H, Tartaglia N, Feng L, Figueroa A, Lu B. (1999) Signaling Mechanisms Mediating BDNF Modulation of Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Learn Mem.* 6: 243-56.

Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-43.

Lee JL, Hynds RE. (2013) Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23:233-44.

Martínez-Moreno A, Rodríguez-Durán LF, Escobar ML (2011) Late Protein Synthesis-Dependent Phases in CTA Long-Term Memory: BDNF Requirement. *Front Behav Neurosci* 5:61.

Mei F, Nagappan G, Ke Y, Sacktor TC, Lu B (2011) BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKM $\zeta$ . *PLoS One* 6:e21568.

Ozawa T, Yamada K, Ichitani Y (2014) Hippocampal BDNF treatment facilitates consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition in rats. *Behav Brain Res* 263:210-6.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S et al. (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-91.

Panja D, Bramham CR (2014) BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology* 76:664-76.

Parsons RG, Ressler KJ (2013) Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nat Neurosci* 16:146-53.

Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ (2010) Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* 328:1288-90.

Revest JM, Le Roux A, Roullot-Lacarrière V, Kaouane N, Vallée M, Kasanetz F et al. (2014) BDNF-TrkB signaling through Erk1/2(MAPK) phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol Psychiatry* 19:1001-9.

Rosas-Vidal LE, Do-Monte FH, Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2014) Hippocampal-prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology* 39:2161-9.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2010) Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21801-5.

Samartgis JR, Schachte L, Hazi A, Crowe SF. (2012) Brain-derived neurotrophic factor facilitates memory consolidation and reconsolidation of a weak training stimulus in the day-old chick. *Neurosci Lett.* 516:119-23.

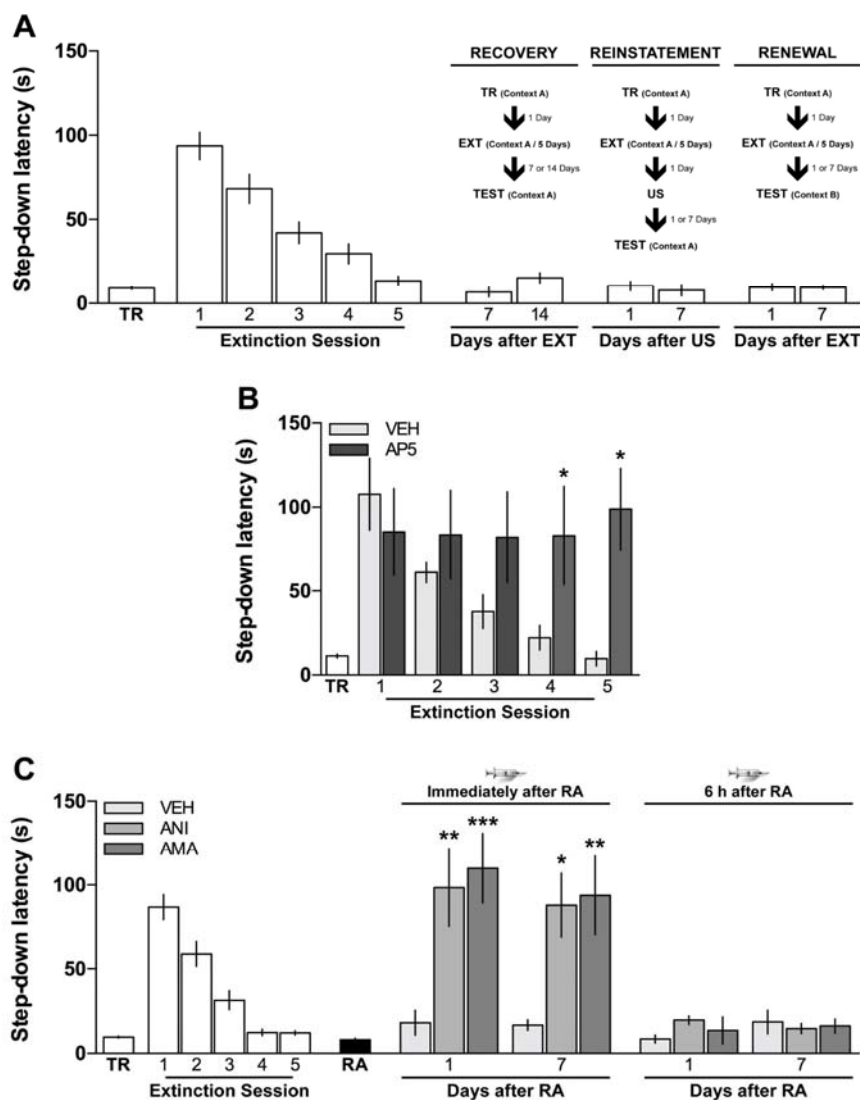
Santi S, Cappello S, Riccio M, Bergami M, Aicardi G, Schenk U et al. (2006) Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J* 25:4372-80.

Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B. (2001) Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 276:37585-93.

Wang Y, Zhang TY, Xin J, Li T, Yu H, Li N, Chen ZY. (2012) Differential involvement of brain-derived neurotrophic factor in reconsolidation and consolidation of conditioned taste aversion memory. *PLoS One.* 7:e49942.

Zhang L, Benedek DM, Fullerton CS, Forsten RD, Naifeh JA, Li XX et al. (2014) PTSD risk is associated with BDNF Val66Met and BDNF overexpression. *Mol Psychiatry* 19:8-10.

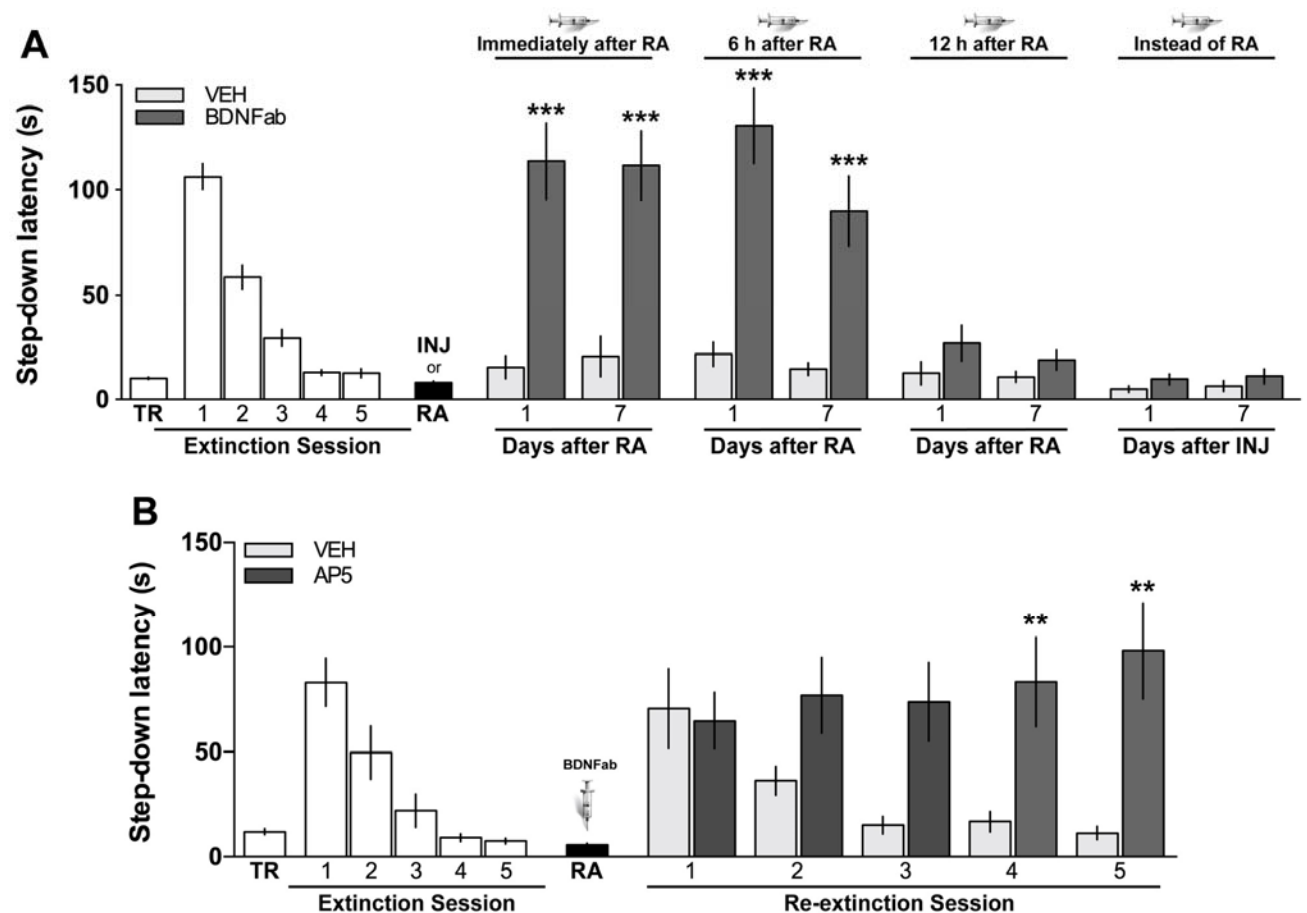
## Figures and Legends



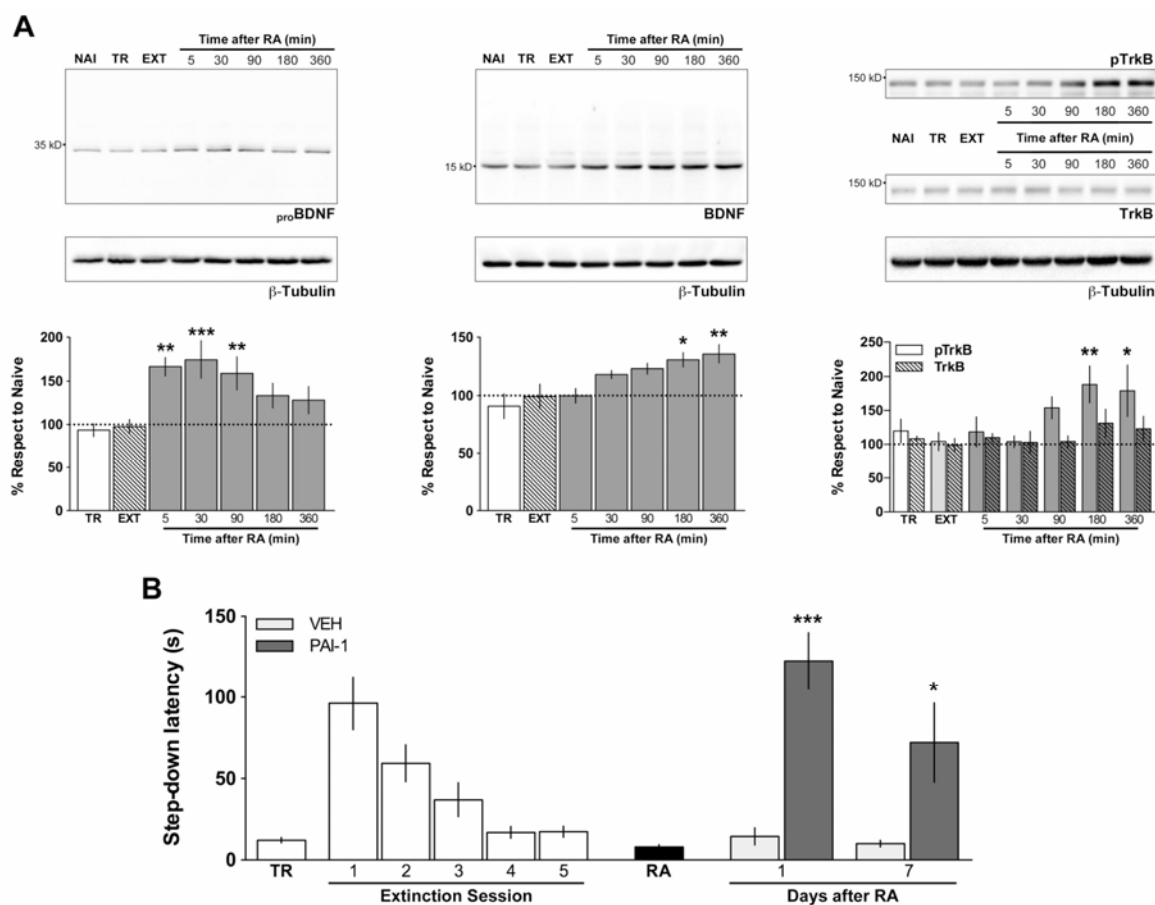
**Figure 1. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. (A)** Extinction of inhibitory avoidance memory is not prone to spontaneous recovery, reinstatement or renewal, and requires NMDAr activation in the dorsal hippocampus. Animals were trained in IA (TR) and beginning 24 h later were submitted to one daily extinction session (EXT) in the training context (Context A) for 5 days. After that, the animals were randomly assigned to one out of three different experimental groups. The first group (Recovery) was tested for retention in Context A 7 days or 14 days after the last extinction session. The animals in the second group (Reinstatement) received a non-contingent footshock (US) identical in intensity and duration to that received during IA training, but in a different context, 24 h after extinction, and were tested for retention in Context A 1 day or 7 days later. The animals in the third group (Renewal) were treated as the animals in the Recovery Group but were tested for retention in Context B. **(B)** Animals trained in IA were submitted to one daily extinction session in the training context for 5 days (first session 24 h after IA training). Immediately after each

session the animals received bilateral intraCA1 microinfusions of vehicle (VEH = 0.1% DMSO in saline) or AP5 (5  $\mu$ g/side). n = 7 per group; \*p < 0.05 in Holm-Sidak's multiple comparison test after two-way repeatedmeasures ANOVA. **(C)** Inhibition of gene expression or protein synthesis in dorsal CA1 immediately after fear extinction memory reactivation recovers the learned fear response. Animals were trained in IA (TR) and beginning 24 h later were submitted to one daily extinction session for 5 days. Twenty-four hours after the last extinction session, extinction memory was reactivated (RA) and immediately or 6 h later the animals received bilateral intra-CA1 microinfusions of vehicle (VEH = 0.1 % DMSO in saline), the protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI; 160  $\mu$ g/side) or the mRNA synthesis blocker  $\alpha$ -amanitin (AMA; 45 ng/side). Retention was assessed 1 day or 7 days after RA. n = 8 - 12 per group; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 in Dunnet's multiple comparison test after ANOVA.

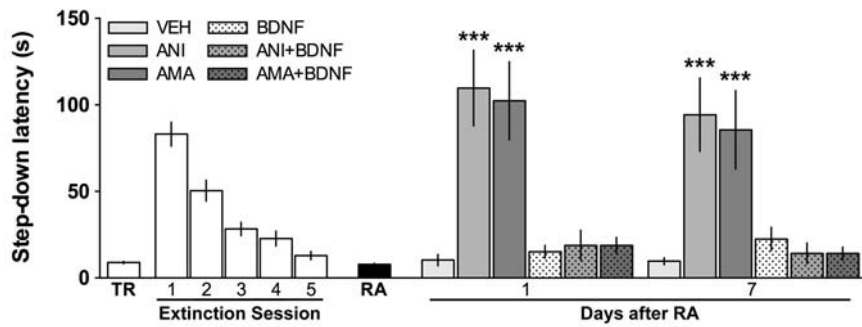




**Figure 2. BDNF is required for fear extinction memory reconsolidation.** (A) Blockade of BDNF function immediately or 6 h after reactivation hinders the persistence of fear extinction memory. Animals were trained in IA (TR) and beginning 24 h later were submitted to one daily extinction session for 5 days. Twenty-four hours after the last extinction session, extinction memory was reactivated (RA) and immediately, 6 h or 12 h later the animals received bilateral intra-CA1 microinfusions of vehicle (VEH = control sheep IgG in sterile saline) or function-blocking anti-BDNF antibody (BDNFab; 0.5  $\mu$ g/side). A group of animals was not submitted to the RA session but instead received BDNF in dorsal CA1 24 h after the last extinction session (INJ). Retention was assessed 1 day or 7 days after RA or INJ.  $n = 10 - 13$  per group; \*\*\* $p < 0.001$  in two-tailed Student's  $t$  test. (B) Animals were trained in IA (TR) and beginning 24 h later were submitted to one daily extinction session for 5 days. Twenty-four hours after the last extinction session, extinction memory was reactivated (RA) and immediately thereafter the animals received bilateral intra-CA1 microinfusions of BDNF. Beginning 24 h after RA the animals were submitted to one daily re-extinction session in the training context for 5 extra days. Immediately after each re-extinction session the animals received bilateral intra-CA1 microinfusions of VEH or AP5 (5  $\mu$ g/side).  $n = 10$  per group; \*\* $p < 0.01$  in Holm-Sidak's multiple comparison test after two-way repeated-measures ANOVA.



**Figure 3. Reactivation of fear extinction memory increases BDNF signaling, and inhibition of BDNF maturation blocks fear extinction memory reconsolidation.** (A) Reactivation of fear extinction memory increases proBDNF and BDNF levels and induces the phosphorylation of TrkB at Tyr-515 (pTrkB) in dorsal CA1. Rats trained in inhibitory avoidance were submitted to 5 daily extinction sessions (first session 24 h after IA training). Twenty-four hours following the last extinction session, extinction memory was reactivated (RA) and the animals killed by decapitation at different times thereafter (5 - 360 min). The CA1 region of the dorsal hippocampus was dissected out, homogenized and utilized to determine proBDNF, BDNF, pTrkB, TrkB and  $\beta$ -tubulin levels by immunoblotting. NAI = naïve animals; TR = animals trained in IA and killed 6 days later; EXT = animals trained in IA that were submitted to 5 daily extinction sessions (first session 1 day after training) and killed 24 h after the last one.  $n = 5$  animals per group; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  in Dunnett's multiple comparison test after repeated measures ANOVA. (B) Post-reactivation infusion of a BDNF maturation blocker hinders the persistence of the reactivated fear extinction trace. Animals were trained in IA (TR) and beginning 24 h later were submitted to one daily extinction session for 5 days. Twenty-four hours after the last extinction session, extinction memory was reactivated (RA) and immediately thereafter the animals received bilateral intra-CA1 microinfusions of vehicle (VEH = 0.1% DMSO in saline) or of the BDNF maturation blocker PAI-1 (50 ng/side). Retention was analyzed 1 or 7 days later.  $n = 8 - 9$  animals per group; \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  in two-tailed Student's t test.



**Figure 4. Intra-CA1 infusion of recombinant BDNF reverses the effect of anisomycin and  $\alpha$ -amanitin on extinction memory reconsolidation.** Animals were trained in IA (TR) and beginning 24 h later were submitted to one daily extinction session for 5 days. Twenty-four hours after the last extinction session, extinction memory was reactivated (RA) and immediately thereafter the animals received bilateral intra-CA1 infusions of vehicle (VEH = 0.1% DMSO in saline), anisomycin (ANI; 160  $\mu$ g/side),  $\alpha$ -amanitin (AMA; 45 ng/side), BDNF (0.25  $\mu$ g/side), anisomycin plus BDNF (ANI+BDNF) or  $\alpha$ -amanitin plus BDNF (AMA+BDNF). Retention was assessed 1 day or 7 days after RA. n = 8 - 11 per group; \*\*\*p < 0.001 in Dunnett's multiple comparison test after ANOVA.

## 6 Artigo II

Artigo submetido para publicação na revista *Estudos de Psicologia*  
ISSN: 1678-4669

### **Acerca da consolidação, reconsolidação e extinção de memórias**

**Título resumido:** Consolidação, reconsolidação e extinção

Andressa Radiske<sup>1</sup> & Irenio Gomes da Silva Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Brasil.

### **Resumo**

A expressão de uma memória já consolidada pode levar à ocorrência de dois processos opostos, que requerem a síntese *de novo* de proteínas nas mesmas áreas do cérebro: a extinção e a reconsolidação. A extinção debilita a expressão da memória original, enquanto que a reconsolidação permite a incorporação de nova informação a ela. O conhecimento dos processos envolvidos após a expressão de distintos tipos de memórias tem avançado muito nos últimos anos, e alguns conceitos novos foram instituídos. Portanto, neste artigo, serão reunidas algumas das principais descobertas das últimas décadas envolvendo o estudo dos processos decorrentes da expressão de memória, com o intuito de acumular o conhecimento básico que permita o desenvolvimento de novas

estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias associadas ao medo aprendido.

**Palavras-chave:** consolidação; reconsolidação; extinção; memória; evocação

### **About consolidation, reconsolidation and extinction of memories**

#### **Abstract**

The non-reinforced expression of long-term memory may lead to two opposite protein synthesis-dependent processes in the same brain areas: extinction and reconsolidation. Extinction weakens consolidated memories, whereas reconsolidation allows incorporation of additional information into them. Knowledge about the processes initiated by the expression of different types of memory has advanced greatly in recent years, and some new concepts have been introduced. Therefore, in this article, we will comment about some of the main findings of the last decades concerning the study of the processes resulting from memory expression. This is important to consolidate our knowledge about the possible development of new therapeutic strategies to treat anxiety disorders and phobias associated to learned fear.

**Keywords:** consolidation; reconsolidation; extinction; memory; retrieval

## **Sobre la consolidación, la reconsolidación y la extinción de las memorias**

### **Resumen**

La expresión no reforzada de la memoria de largo término puede desencadenar uno de dos procesos opuestos, ambos dependientes de síntesis de proteínas en las mismas regiones cerebrales: la extinción y la reconsolidación de la memoria. La extinción produce una disminución de la retención de la memoria, mientras que la reconsolidación permite la incorporación de información adicional al trazo mnésico. En los últimos años se ha avanzado enormemente en el conocimiento de estos procesos iniciados por la expresión de diferentes tipos de memoria, y nuevos conceptos han sido introducidos. Por lo tanto, en este artículo comentaremos los hallazgos más relevantes de las últimas décadas respecto al estudio de la reconsolidación y la extinción de la memoria, remarcando la importancia de esta temática en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de trastornos de ansiedad y fobias.

**Palabras clave:** consolidación; reconsolidación; extinción; memoria; evocación

## Introdução

A nossa individualidade é formada pelo acervo mnemônico construído a partir de experiências vivenciadas que podem ser expressas. Deste modo, estudar o funcionamento da memória nos permite conhecer a complexa interação entre mente e cérebro e, com isso, entender como essa relação influencia na cognição, emoção e consciência que temos de nós mesmos e com o mundo (Squire & Kandel, 2000). Sendo assim, a evocação das memórias é fundamental para a sobrevivência, já que este processo nos permite utilizar, consciente ou inconscientemente, a informação adquirida para responder e adaptar-nos aos desafios que o ambiente nos apresenta ao longo da vida. Evidências indicam que, após serem evocadas, as memórias tornam-se instáveis e, para persistirem, devem passar por um processo de re-estabilização dependente de síntese proteica denominado reconsolidação (Przybylski & Sara, 1997). Esse processo não é simplesmente a repetição da consolidação inicial, mas sim um mecanismo independente com um objetivo biológico específico: atualizar e estabilizar uma informação previamente armazenada com relação às modificações ambientais ou internas do indivíduo para assim determinar sua persistência (Cammara, 2003). A evocação de uma memória pode ainda desencadear outro fenômeno conhecido como extinção, que se caracteriza pela evocação repetida do traço na ausência do estímulo incondicionado que levou a sua formação (Pavlov, 1927) o qual também requer síntese de proteínas em áreas específicas do cérebro (Rossato, 2006).

Deste modo, o conhecimento dos processos envolvidos na formação e expressão de distintos tipos de memórias, tem avançado muito nos últimos anos,

e alguns conceitos novos foram instituídos. Portanto, neste artigo, serão reunidas as principais teorias das últimas décadas envolvendo o estudo dos processos decorrentes da expressão de memórias: extinção e reconsolidação, com o intuito de acumular o conhecimento básico que permita o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias.

### **Consolidação, extinção e reconsolidação de memórias**

Após o processo de aprendizagem, a informação tem dois destinos possíveis: ela pode ser perdida para sempre, de maneira que, nunca mais estará disponível para ser acessada; ou ela pode passar por um processo de estabilização, durante o qual ocorrem modificações sinápticas que determinam sua persistência. Este processo é denominado consolidação (Lechner, 1999). Termo esse que foi primeiramente proposto pelo psicólogo experimental Georg Elias Müller e seu aluno Alfons Pilzecker em um trabalho publicado em 1900, demonstrando que as memórias não são formadas instantaneamente após o aprendizado, elas necessitam de um tempo para serem fixadas (ou consolidadas). Conseqüentemente, esse traço mnemônico consolidado pode tornar-se suscetível à interferentes que promovem sua modificação (Eisenberg, 2003). Deste modo, quando uma memória consolidada é reativada na ausência de um reforço, dois processos antagônicos podem ser desencadeados: a consolidação da memória de extinção ou a reconsolidação da memória original. O que vai determinar a direção desses dois processos são as condições ambientais, fisiológicas e comportamentais expostas no momento da reativação (Milner, 1998; Suzuki, 2004). Esses processos desempenham um papel fundamental para a modificação de uma memória existente, pois proporcionam



as mesmas características dinâmicas, uma vez que estão em permanente reorganização, conferindo aos indivíduos uma fácil adaptação em função de uma experiência ou de alterações do ambiente externo (Przybyslawski, 1997). Sabe-se que memórias associadas com o medo podem ser de rápida formação e de longa duração, permitindo que todos aprendemos a evitar certos comportamentos por medo de sermos feridos. Contudo, a incapacidade de extinguir a expressão de um estímulo aversivo, em resposta a um estímulo que não prevê ameaça iminente, define o cenário das psicopatologias ligadas ao medo e à ansiedade, os mais comuns dos transtornos psiquiátricos.

Desde os estudos pioneiros de Pavlov (1927) sabe-se que a reativação repetida da memória na ausência de reforço conduz a sua extinção, que se caracteriza por suprimir a expressão do aprendizado original ao invés de apagá-lo. Além disso, essa memória extinta que foi consolidada pode tornar-se suscetível à atualização após a reativação, assim como ocorre com a reconsolidação (Rossato, 2010).

A hipótese da reconsolidação foi primeiramente proposta no final da década de 1960, por Misanin e colaboradores (1968) sugerindo que, as memórias de longa duração quando evocadas entram em um período de labilização necessitando ser reconsolidadas para permanecerem. Essa hipótese foi reafirmada a partir dos achados reportados por Nader e colaboradores (2000a; 2000b) demonstrando que, em ratos, a infusão intra-amígdala de um inibidor da síntese protéica imediatamente após a evocação de uma resposta condicionada ao medo, induz amnésia persistente. A partir desses trabalhos, outros grupos têm pesquisado o papel da reconsolidação na manutenção da

memória após a reativação, enfatizando o estudo acerca dos requisitos moleculares desse processo (Child, 2003; Lattal, 2004; Alberini, 2005).

Deste modo, os processos de reconsolidação e extinção estão relacionados funcionalmente, pois ambos baseiam-se na aquisição de informação sobre o que acontece no momento da expressão, informação que, por sua vez, está associada com o aprendizado original. Contudo, eles apresentam mecanismos distintos quanto à formação. Apesar de estar difundida na literatura a relação molecular e bioquímica destes dois processos, ainda é contraditória a interação comportamental destes eventos. Trabalhos de diversos laboratórios demonstraram que, a ocorrência de extinção é um dos fatores que limitam ou de fato impedem a reconsolidação de memórias. Enquanto, resultados mais recentes indicam que a reconsolidação pode ocorrer independentemente da extinção prévia da memória em questão, sugerindo que ambos os processos são independentes (Debiec,2002; Sangha,2003; Pedreira,2003; Duvarci,2006). Entretanto, em um estudo recente, foi demonstrado que a memória de extinção para a tarefa de esQUIVA inibitória debilita-se após sua reativação de modo que, para persistir, precisa passar por um processo de reconsolidação dependente de síntese protéica no hipocampo (Rossato, 2010). A partir desses achados, mais estudos serão necessários para compreender o caminho de uma memória extinta após a sua expressão.

A memória é um produto formado a partir de uma experiência passada, que é usada para responder questões no presente. O traço mnemônico quando evocado, permite que sejam feitas modificações plásticas nas sinapses para a manutenção das memórias de longa duração. Essa atualização, mediante a reconsolidação, confere ao traço mnemônico características dinâmicas, que

estão em constante reorganização em função de experiências futuras que a vida proporciona.

O conhecimento acerca dos requerimentos moleculares, bioquímicos e comportamentais que sustentam a manutenção de um traço mnemônico após sua reativação, ainda é limitado, porém necessário para compreender o mecanismo associado com a reincidência de uma memória aversiva após o aparente sucesso das psicoterapias baseadas no processo de extinção, que são utilizadas para o tratamento de transtornos de ansiedade e do estresse pós-traumático. Portanto, os fenômenos denominados recuperação espontânea (Rescorla, 2004), renovação (Bouton, 2004), ou restabelecimento (McAllister, 2006) que envolvem o reaparecimento de uma memória aversiva após a extinção, são alvos nos estudos acerca desses distúrbios. Deste modo, serão necessárias mais investigações para compreender esse dinâmico caminho mnemônico desencadeado pela reativação de uma memória, e com isso possibilitar o avanço no conhecimento com relação às futuras estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias associados ao medo aprendido.

## Referências

Alberini C.M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neuroscience*. 28(1): 51-56.

Bouton M.E., Westbrook R.F., Corcoran K.A., Maren S. (2004). Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biological Psychiatry*.; 60:352-60.

Cammarota M, Bevilaqua L.R., Kerr D, Medina J.H., Izquierdo I. (2003). Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *The Journal of Neuroscience*. 23: 737-741.

Child F.M., Epstein H.T., Kuzirian A.M., Alkon D.L. (2003). Memory reconsolidation in Hermisenda. *The Biological Bulletin*. 205(2):218-9.

Debiec J., Ledoux J.E., & Nader K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*.; 36:527-38. doi: 10.1038/nn.2350

Duvarci S., Mamou C.B., & Nader K. (2006). Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *European Journal Neuroscience*.; 24:249-60.

Eisenberg M, Kobil T., Berman D.E., Dudai Y. (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*. 301: 1102-1104. doi:10.1126/science.1086881

Lattal K.M., & Abel T. (2004). Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 101: 4667–4672. doi: 10.1073/pnas.0306546101

Lechner H. A., Squire L. R., & Byrne J. H. (1999). 100 years of consolidation remembering Muller and Pilzecker. *Learning & Memory.* 6 77–87. doi: 10.1101/lm.6.2.77

McAllister W.R. & McAllister D.E. (2006). Recovery of conditioned fear by a single postextinction shock: effect of similarity of shock contexts and of time following extinction. *Learning & Behavior.* 34:44-9.

Milner B., Squire L.R., & Kandel E.R. (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron.* 20:445–68. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80987-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80987-3)

Misanin J.R., Miller R.R., & Lewis D.J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science.* 60: 554–555. doi: 10.1126/science.160.3827.554

Nader K., Schafe G.E., & LeDoux J.E. (2000a). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature.* 406:722-726. doi:10.1038/35021052

Nader K, Schafe G.E., & LeDoux J.E. (2000b). The labile nature of consolidation theory. *Nature Review Neuroscience.* 1:216-219. doi:10.1038/35044580

Pavlov I. (1927). *Conditioned Reflexes.* New York: Liveright;

Pedreira M.E. & Maldonado H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron.*; 38:863-9.

Przybylski, J & Sara S.J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Research.*; 84(1-2): 241-246.

Rescorla R.A. (2004). Spontaneous recovery. *Learn Mem.* 11:501-9. doi: 10.1101/lm.77504

Rossato J.I., Bevilaqua L.R., Medina J.H., Izquierdo I., Cammarota M. (2006). Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learning & Memory.*13(4):431-40. doi:10.1101/lm.315206

Rossato J.I., Bevilaqua L.R., Izquierdo I., Medina J.H., Cammarota M. (2010) Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 107:21801-5. doi: 10.1073/pnas.1016254107

Squire LR, & Kandel ER. (2000). *Memória: da mente às moléculas*. Porto Alegre (RS): Ed.Artmed.

Suzuki A., Josselyn S.A., Frankland P.W., Masushige S., Silva A.J., Kida S. (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of Neuroscience.* 24:4787-95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004

## 7 Considerações finais

O conjunto dos resultados apresentados sugere que a persistência das memórias traumáticas pode ser modulada pela modificação da sinalização do BDNF no momento da reativação da memória de extinção. Assim, quando reativada, a memória de extinção, desencadeia um processo reconsolidatório dependente da expressão de BDNF no hipocampo para persistir. Ainda mais, a ativação farmacológica do receptor TrkB mediada pela administração intra-hipocampal de BDNF recombinante, é suficiente para evitar o reaparecimento do medo causado pelo bloqueio da reconsolidação da memória de extinção. A partir desses achados, novos estudos acerca dos requisitos anatômicos, neuroquímico e eletrofisiológicos serão necessários para compreender esse dinâmico caminho mnemônico desencadeado pela reativação da memória de extinção, e com isso possibilitar o avanço no conhecimento acerca de futuras estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias associados ao medo aprendido.

## 8 Referências Bibliográficas

Andero R, Ressler KJ Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behav* 2012; 11:503–512.

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:2711–2716.

Benjamin S, Steffens DC. Structural neuroimaging of geriatric depression. *Psychiatr Clin North Am.* 2011; 34(2):423-35

Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol. Psychiatry.* 2004; 60:352-60.

Burke S. N., Barnes C. A. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. 7, 30–4010.

Burke S. N., Barnes C. A. Senescent Synapses and Hippocampal Circuit Dynamics. *Trends Neurosci.* 2010 Mar; 33(3): 153–161.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Kerr D, Medina JH, Izquierdo I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallation of an extinguished conditioned fear response. *Eur J Neurosci.* 2003; 23: 737-741.



Ferri CP. Population ageing in Latin America: dementia and related disorders.  
Rev Bras Psiq 2012;34:371-374.

Flood, D. G., Guarnaccia, M. & Coleman, P. D. Dendritic extent in human CA2–3 hippocampal pyramidal neurons in normal aging and senile dementia.  
1987. Brain Res.409, 88–96

Garza AA, Ha TG, Garcia C, Chen MJ, Russo-Neustadt AA. Exercise, antidepressant treatment and BDNF mRNA expression in the aging brain.  
Pharmacol Biochem Behav. 2004;77:209–20.

Gooney, M., Messaudi, E., Maher, F. O., Bramham, C. R. & Lynch, M. A. BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signaling events. Neurobiol. Aging. 2004 25,1323–1331.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Perfil dos idosos responsáveis pelos domicílio no Brasil. 2002

Kim JH, Richardson R. A developmental dissociation of context and GABA effects on extinguished fear in rats. Behav Neurosci. 2007b; 121:131–139.

Kuriyama K, Honma M, Soshi T, Fujii T, Kim Y. Effect of D-cycloserine and valproic acid on the extinction of reinstated fear-conditioned responses and

habituation of fear conditioning in healthy humans: a randomized controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)* 2011c; 218: 589–597.

Landfield PW, et al. Impaired synaptic potentiation processes in the hippocampus of aged, memory-deficient rats. *Brain Res* 1978. ;150(1):85–101

Ledgerwood L, Richardson R, Cranney J. D-cycloserine facilitates extinction of learned fear: Effects on reacquisition and generalized extinction. *Biol Psychiatry*. 2005; 57: 841–847.

Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2004;27:589–94.

McAllister WR, McAllister DE. Recovery of conditioned fear by a single postextinction shock: effect of similarity of shock contexts and of time following extinction. *Learn Behav*. 2006; 34:44-9.

Pattwell SS, Bath KG, Perez-Castro R, Lee FS, Chao MV, Ninan I. The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2012; 32:2410–2421.

Pavlov I. *Conditioned Reflexes*. New York: Liveright; 1927.

Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* 2010; 328:1288–1290.

Przybylski J, Sara SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Research*. 1997; 84(1-2): 241-246.

Rescorla RA. Spontaneous recovery. *Learn Mem*. 2004; 11:501-9.

Ressler KJ, Rothbaum BO, Tannebaum L, Anderson P, Graap K, Zimand E, Hodges L, Davis M. Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: Use of D-Cycloserine in phobics to facilitate extinction of fear. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61: 1136–1144.

Rosas-Vidal LE, Do-Monte FH, Sotres-Bayon F, Quirk GJ. Hippocampal prefrontal BDNF and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39:2161–2169.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem*. 2006 Jul-Aug;13(4):431-40.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:21801.

Schmidt HD, Duman RS. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol.* 2007;18:391–418.

Sotres-Bayon F, Quirk GJ Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol.* 2010. 20:231–235.

Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, Jing D, Tottenham N, Amso D, Somerville LH, Voss HU, Glover G, Ballon DJ, Liston C, Teslovich T, Van Kempen T, Lee FS, Casey BJ. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science.* 2010; 327:863–866.

Squire LR, Kandel ER. *Memória: da mente às moléculas*. Tradução: C. Dalmaz e J. A. Quillfeldt. Porto Alegre (RS): Ed.Artmed; 2000.

Topic, E. Dere, D. Schulz. Aged and adult rats compared in acquisition and extinction of escape from the water maze: focus on individual differences. *Behavioral Neuroscience*, 2005 pp. 127–144.

## 9 Anexos

### 9.1 Carta de recebimento do artigo submetido para revisão:



[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [NOTÍCIAS](#) [ACERVO](#)

Capa > Usuário > Autor > **Submissões Ativas**

### Submissões Ativas

[ATIVO](#) [ARQUIVO](#)

ID	MM-DD ENVIADO	SEÇÃO	AUTORES	TÍTULO	SITUAÇÃO
148575	04-15	PSICOBIO/COGNIT- ART	Radiske, Gomes da Silva Filho	ACERCA DA CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO...	EM AVALIAÇÃO

1 a 1 de 1 itens

#### Iniciar nova submissão

[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de submissão.

ISSN: 1678-4669

## 9.2 Aprovação do CEUA



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

Ofício 091/11 – CEUA

Porto Alegre, 21 de julho de 2011.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00229 intitulado:

**"Um estudo acerca da reconsolidação da memória de extinção".**

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

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

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Martín Cammarota  
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)

### 9.3 Aprovação da Comissão Científica



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA  
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 24 de outubro de 2012.


Senhor (a) Pesquisador (a) Andressa Radiske

A Comissão Científica do IGG apreciou e aprovou seu protocolo de

“UM ESTUDO ACERCA DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE  
EXTINÇÃO: ANÁLISE FARMACOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR”.

Solicitamos que providencie os documentos necessários para o encaminhamento do protocolo de pesquisa a Comissão de Ética no uso de Animais da PUCRS (CEUA). Salientamos que somente após a aprovação desta comissão o projeto deverá ser iniciado.

Atenciosamente,

  
**Profa. Carla Helena Schwanke**  
Coordenadora da CC/IGG

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – CEP: 90.610-000  
Fone: (51) 3336-8153 – Fax (51) 3320-3862  
E-mail: [igg@pucrs.br](mailto:igg@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/igg](http://www.pucrs.br/igg)