

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

SCHEILA DAIANE SCHMIDT

**PARTICIPAÇÃO DO PEPTÍDEO PACAP
NAS MEMÓRIAS DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO
E DE RECONHECIMENTO SOCIAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2015

SCHEILA DAIANE SCHMIDT

**PARTICIPAÇÃO DO PEPTÍDEO PACAP
NAS MEMÓRIAS DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO
E DE RECONHECIMENTO SOCIAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Iván Antônio Izquierdo

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

Porto Alegre

2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO

S354a Schmidt, Scheila Daiane

Participação do peptídeo PACAP nas memórias de medo condicionado ao contexto e de reconhecimento social / Scheila Daiane Schmidt. Porto Alegre: PUCRS, 2014.

59 f.: il.; tab. Inclui um artigo publicado no periódico *Neurobiology Learning and Memory*.

Orientador: Prof. Dr. Iván Antônio 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 em Neurociências.

1. PACAP. 2. CONSOLIDAÇÃO. 3. EXTINÇÃO. 4. MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO. 5. RECEPTORES NMDA. 6. RECONHECIMENTO SOCIAL. 7. ÓXIDO NÍTRICO. 8. MEMÓRIA. 9. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO. I. Izquierdo, Iván Antônio. II. Myskiw, Jociane de Carvalho. III. Título.

CDD 153.1

CDU 612.821.2(043.3)

Scheila Daiane Schmidt

**PARTICIPAÇÃO DO PEPTÍDEO PACAP
NAS MEMÓRIAS DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO
E DE RECONHECIMENTO SOCIAL**

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

Aprovado em 04 de Fevereiro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Nadja Schröder - PUCRS

Profa. Dra. Mônica Ryff Moreira Roca Vianna - PUCRS

Profa. Dra. Pâmela Billig Mello Carpes - PUCRS

Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara (Suplente)- PUCRS

AGRADECIMENTOS

Àquele que é infinitamente superior a tudo, obrigada pela oportunidade de vir a este mundo, predestinada a conhecer todas as pessoas que passaram pela minha vida e que, de alguma maneira, me ensinaram algo. Fostes extremamente generoso comigo, obrigada Pai.

Aos meus pais, **Vera e Darci**, por todo amor, cuidado e dedicação. Obrigada por não medirem esforços para verem a mim e a Bi felizes. Todas as conquistas que eu obtiver em minha vida eu devo a vocês, meus amores, meus queridos, meus heróis!

A minha irmã, **Bianca**, por ter me apresentado o Centro de Memória e me auxiliado na realização deste trabalho. Tua amizade significa muito pra mim. Serás uma excelente profissional, e isso me enche de orgulho.

Ao meu noivo, **Fábio**, pela paciência, apoio e carinho. Obrigada por estar sempre ao meu lado e sonhar comigo os mesmos sonhos, me fazendo crer que todos eles são possíveis. És o maior presente que a vida me deu.

Ao meu orientador, mestre **Iván Izquierdo**, por ter me acolhido em seu grupo e me proporcionado a oportunidade de crescer como pessoa e profissional. Obrigada pela doçura e humildade com que nos trata diariamente, me sinto honrada em ser sua aluna. Sua obra me inspira!

A minha co-orientadora, professora **Jociane de Carvalho Myskiw**, pela sua incessante dedicação ao laboratório e sua constante preocupação para com todos. Obrigada por tudo o que me ensinaste, por acreditar em mim e conduzir meus passos durante o mestrado. Pela sua imensurável contribuição na realização deste trabalho e na minha vida, muito obrigada!

A professora **Cristiane R. G. Furini**, pelos ensinamentos e pelo auxílio em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho. Sua ajuda foi imprescindível.

Aos amigos e colegas que fizeram ou ainda fazem parte do Centro de Memória, **Prof. Fernando Benetti, Jéssica Rosa, Carolina Zinn, Bianca Schmidt, Flávia Fagundes, Lorena Evelyn, Roberta Fabri, Eduardo de Assis Brasil, Guilherme Sápiras, Lucas Marcondes, Luiza Fortes, Marcelo Merten Cruz, Patrícia Peixoto e demais colaboradores**, muito obrigada pela amizade e companheirismo. O auxílio de vocês foi fundamental nesta jornada. Valeu pessoal!

A minha família e a família do Fábio, obrigada pela torcida e pelo carinho, pelas conversas de incentivo e sábios conselhos.

A todos os demais que, de alguma forma, participaram deste momento da minha vida e contribuíram para a elaboração deste trabalho, muito obrigada.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pelo apoio financeiro e infra-estrutura necessárias para a execução deste trabalho.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e da
persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”*

(José de Alencar)

RESUMO

O neuropeptídeo PACAP (polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária) possui um amplo espectro de funções biológicas, como neurotransmissor, neuromodulador, neuroprotetor e fator neurotrófico. Além disso, estudos sugerem que o PACAP desempenha um importante papel na modulação do comportamento social, aprendizagem e memória, bem como na estimulação da produção de óxido nítrico (NO) e na modulação da atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. O presente estudo teve como objetivo investigar, na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral (BLA), a participação do PACAP nas memórias de medo condicionado ao contexto (MCC) e de reconhecimento social (RS). Para isso, ratos *Wistar* machos adultos, com cânulas implantadas bilateralmente na região CA1 do hipocampo ou na BLA, foram treinados nas tarefas de medo condicionado ao contexto ou reconhecimento social. Verificou-se que, o antagonista do PACAP (PACAP 6-38; 40 pg/lado), quando infundido intra-CA1 ou intra-BLA imediatamente após a sessão de treino do MCC, prejudica a consolidação dessa memória. Contudo, esse efeito não foi observado quando o agonista dos receptores NMDA (D-serina; 50 µg/lado) foi infundido concomitantemente com o PACAP 6-38. Verificou-se também que, quando infundido intra-CA1 imediatamente após a sessão de treino da extinção do MCC, o PACAP 6-38 prejudica a memória de extinção, entretanto, esse efeito não foi observado na BLA ou quando o PACAP 6-38 foi infundido intra-CA1 concomitantemente com D-serina. Ainda, verificou-se que, quando infundido intra-CA1 ou intra-BLA imediatamente após a tarefa de reconhecimento social, o PACAP 6-38 prejudica a consolidação dessa memória, porém, esse efeito não foi observado quando o doador de óxido nítrico (SNAP; 5 µg/lado) foi infundido concomitantemente com o PACAP 6-38. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o PACAP participa da consolidação e da extinção da memória de MCC, e que esse efeito parece ocorrer através dos receptores NMDA. Além disso, os resultados também indicam que o PACAP participa da consolidação da memória de reconhecimento social, e que esse efeito parece ocorrer através da ação do óxido nítrico.

Palavras-chave: PACAP, consolidação, extinção, medo condicionado ao contexto, receptores NMDA, reconhecimento social, óxido nítrico.

ABSTRACT

The PACAP neuropeptide (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) has a wide spectrum of biological functions, such as neurotransmitter, neuromodulator, neuroprotective and neurotrophic factor. Furthermore, studies suggest that PACAP plays an important role in the modulation of social behavior, learning and memory, as well as the stimulation of nitric oxide (NO) production and modulation of the activity of the NMDA-type glutamatergic receptors. This study aimed to investigate, in the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala (BLA), the participation of PACAP in the contextual fear conditioning memory (CFC) and social recognition memory (SR). For this, adult male Wistar rats with cannulas implanted bilaterally in the CA1 region of the hippocampus or the BLA, were trained in contextual fear conditioning or social recognition tasks. It was observed that the PACAP antagonist (PACAP 6-38, 40 pg/side), when infused intra-CA1 or intra-BLA immediately after the training session of the CFC, impairs consolidation of memory. This effect was not observed when NMDA receptor agonist (D-serine, 50 µg/side) was infused concomitantly with PACAP 6-38. It was also found that when infused intra-CA1 immediately after the training session the extinction of the CFC, the PACAP 6-38 impairs memory of extinction, however, this effect was not observed in BLA or when the PACAP 6-38 was infused intra-CA1 concomitantly with D-serine. Further, it was found that when infused intra-CA1 or intra-BLA immediately after the social recognition task, PACAP 6-38 impairs consolidation of memory and this effect was not observed when nitrous oxide donor (SNAP; 5 µg/side) was infused concomitantly with PACAP 6-38. The results obtained in this study suggest that PACAP participates in the consolidation and extinction of CFC memory, and that this effect seems to occur through NMDA receptors. Furthermore, the results also indicate that PACAP participates in the consolidation of the social recognition memory, and that this effect seems to occur through the action of nitric oxide.

Keywords: PACAP, consolidation, extinction, contextual fear conditioning, NMDA receptors, social recognition, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da área atingida pelas infusões farmacológicas	23
Figura 2: Desenho do protocolo experimental utilizado para a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto	25
Figura 3: Desenho do protocolo experimental utilizado para a extinção da memória de medo condicionado ao contexto	26
Figura 4: Desenho do protocolo experimental utilizado para a consolidação da memória de reconhecimento social	27
Figura 5: Participação do PACAP na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto	30
Figura 6: Participação do PACAP na extinção da memória de medo condicionado ao contexto	32
Figura 7: Participação do PACAP na consolidação da memória de reconhecimento social....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMPC – Do inglês: *Adenosine monophosphate cyclic*

BLA – Amígdala basolateral

CA1 – Sub-região hipocampal, Corno de Amon 1

CR – Resposta condicionada. Do inglês: *Conditioned response*

CS – estímulo condicionado. Do inglês: *Conditioned stimulus*

KO – Do inglês: *Knockout*

LTM – Memória de longa duração. Do inglês: *Long-term memory*

LTP – Potenciação de longa duração. Do inglês: *Long-term potentiation*

MCC – Medo condicionado ao contexto

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro. Do inglês: *Messenger ribonucleic acid*

NMDA – N-metil D-Aspartato

NO – Óxido nítrico. Do inglês: *Nitric oxide*

NOS – Óxido Nítrico Sintase. Do inglês: *Nitric oxide synthase*

PACAP – Do inglês: *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*

PTSD – Transtorno de estresse pós-traumático. Do inglês: *Posttraumatic stress disorder*

RS – Reconhecimento social

SNAP – S-nitroso-acetilpenicilamina

STM – Memória de curta duração. Do inglês: *Short-term memory*

US – Estímulo incondicionado. Do inglês: *Unconditioned stimulus*

VIP – Do inglês: *Vasoactive intestinal peptide*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Memória: Conceito e Classificação	12
1.2. Aquisição, Consolidação, Evocação e Extinção da Memória	14
1.3. Condicionamento Clássico	15
1.4. Reconhecimento Social	16
1.5. Peptídeo PACAP	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Animais	22
3.2. Cirurgia estereotáxica	22
3.3. Manipulação dos animais	23
3.4. Intervenções farmacológicas	24
3.5. Tarefas comportamentais	24
3.5.1. Medo condicionado ao contexto (MCC)	24
3.5.1.1. Protocolo de consolidação da memória de MCC	24
3.5.1.2. Protocolo de extinção da memória de MCC	25
3.5.2. Reconhecimento social (RS)	26
3.5.2.1. Protocolo de consolidação da memória de RS	27
3.6. Avaliação histológica da região estudada	28
3.7. Análise estatística dos dados	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Participação do PACAP na consolidação da memória de MCC	29
4.2. Participação do PACAP na extinção da memória de MCC	31
4.3. Participação do PACAP na consolidação da memória de RS	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELA CEUA – PUCRS	54
ANEXO B – ARTIGO ORIGINAL	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória: Conceito e Classificação

Memória é a capacidade de aquisição, armazenamento e conservação de informações, as quais podem ser evocadas e utilizadas posteriormente (IZQUIERDO, 2011). Pode-se dizer que as memórias formam um conjunto de sistemas neurais que mantém a história pessoal de cada indivíduo, possibilitando que este modifique seu comportamento ao longo da vida (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; KANDEL, 2003). A maior parte do que um ser humano sabe sobre o mundo foi adquirida por meio de suas experiências e mantida pela sua memória, entretanto, quando a memória é perdida, como na doença de Alzheimer, o indivíduo perde a capacidade de recriar o passado e, em consequência disto, perde a conexão consigo mesmo e com os outros (SQUIRE; KANDEL, 2003).

A memória pode ser classificada 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 (declarativas) ou implícitas (não declarativas) (BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011; IZQUIERDO, 2011; KANDEL, 2001).

As memórias explícitas podem ser subdivididas em episódica e semântica (IZQUIERDO et al., 2006; SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993; STERN; ALBERINI, 2013). As memórias episódicas possuem um contexto espacial e temporal (SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993). Referem-se a eventos aos quais o indivíduo assiste ou participa, como por exemplo uma viagem, a formatura do filho, ou a sua própria formatura. Por sua vez, as memórias semânticas referem-se à conhecimentos de ordem geral, tais como a língua portuguesa, medicina, história, etc (BURIANOVA; MCINTOSH; GRADY, 2010; CONWAY, 2009; IZQUIERDO, 2011; KOMPUS et al., 2009; RENOULT et al., 2012).

As memórias implícitas compreendem as memórias de “como executar determinada atividade”, como por exemplo as memórias de habilidades motoras (MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012; STERN; ALBERINI, 2013). Também são memórias implícitas a habituação (decréscimo da resposta a estímulos benignos repetidos), o *priming* (evocação de memórias sob a apresentação de uma dica) e as memórias decorrentes do treinamento em tarefas de condicionamento clássico (memórias associativas) (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007; IZQUIERDO, 2011; SCHUCHARD; THOMPSON, 2014; SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993).

A formação das memórias explícitas e implícitas depende de estruturas encefálicas diferentes (ALBRIGHT; KANDEL; POSNER, 2000; IZQUIERDO, 2011; KANDEL, 2001; KOLB; WHISHAW, 2002; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2007). As memórias explícitas requerem a integridade do lobo temporal medial, que compreende o hipocampo, o giro denteado e o complexo subicular, juntamente com os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal. Em contrapartida, as memórias implícitas independem do lobo temporal e envolvem diferentes estruturas, como a amígdala, os gânglios da base e o cerebelo (ALBRIGHT; KANDEL; POSNER, 2000; BAILEY; BARTSCH; KANDEL, 1996; BALDERAS et al., 2008; IZQUIERDO, 2011; LEES; JONES; KANDEL, 2000; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2007). É importante ressaltar que as memórias implícitas e explícitas não são entidades distintas atuando sozinhas, elas coexistem e interagem frequentemente (STERN; ALBERINI, 2013).

Quanto a perdurabilidade, a memória pode ser classificada em memória de trabalho, memória de curta duração e memória de longa duração. A memória de trabalho possibilita que o indivíduo compreenda o ambiente externo que lhe cerca, exercendo uma função executiva que auxilia o mesmo nas tomadas de decisões (BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007). Este tipo de memória parece depender basicamente da atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2011; IZQUIERDO et al., 1998; ZANTO et al., 2011), não perdura mais do que 1 - 3 minutos e não forma “arquivos” (BADDELEY, 1992; D’ESPOSITO et al., 1995; IZQUIERDO, 2011; SCHUCHARD; THOMPSON, 2014).

As memórias de curta e de longa duração utilizam as mesmas estruturas cerebrais para seu processamento, como hipocampo, córtex entorrinal e amígdala, porém envolvem mecanismos moleculares independentes (IZQUIERDO, 2011). As memórias de curta duração (STM; do inglês: *short-term memory*) persistem por poucos minutos até no máximo seis horas, não requerem síntese de mRNA (do inglês: *messenger ribonucleic acid*) e/ou de proteínas e, sua formação ocorre a partir da memória de trabalho (ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006; BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011; IZQUIERDO, 2011; IZQUIERDO et al., 1998; KANDEL, 2001). Forma-se memórias de curta duração continuamente, visto que as mesmas são utilizadas para lembrar algo que aconteceu há algumas horas atrás e dar continuidade ao tempo presente (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE et al., 2003). Por sua vez, as memórias de longa duração (LTM; do inglês: *long-term memory*) duram muitas horas, dias ou meses e, quando perduram por muitos anos, costumam ser

denominadas de memórias remotas. A formação desse tipo de memória requer síntese de mRNA e síntese de novas proteínas, além da participação de diversas vias de sinalização vinculadas a esses processos (ABEL; KANDEL, 1998; ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006; ALBRIGHT; KANDEL; POSNER, 2000; IZQUIERDO, 2011; KANDEL, 2001; LEES; JONES; KANDEL, 2000; MAYFORD; KANDEL, 1999; MCGAUGH, 2000).

Debateu-se durante muitos anos se a STM e a LTM eram processos consecutivos, isto é, se a STM era uma fase da LTM, ou se as mesmas eram processos independentes. Izquierdo e colaboradores (1998) demonstraram que alguns tratamentos farmacológicos são capazes de suprimir a STM sem interferir na formação da LTM. Desta forma, mesmo que estes sistemas de memória compartilhem algumas estruturas cerebrais para o seu processamento, tais como a região CA1 do hipocampo dorsal, o córtex entorrinal e o córtex parietal, eles são separados em algum grau (IZQUIERDO et al., 1999; QUEVEDO et al., 2003).

1.2. Aquisição, Consolidação, Evocação e Extinção da Memória

O processo de formação e conservação da memória envolve diferentes etapas. Em um primeiro momento ocorre a fase de aquisição, na qual novas informações, habilidades ou experiências são adquiridas através da exposição a um estímulo (SQUIRE, 1987). Cabe aqui ressaltar que o aprendizado e a memória estão intimamente conectados (SQUIRE et al., 2003). Não há memória sem que antes ocorra o aprendizado, entretanto, nem todo aprendizado é capaz de formar uma memória. A diferença entre ambos 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, 2011). As informações que são registradas pelo sistema nervoso central e, posteriormente podem ser lembradas, referem-se à memória (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007; IZQUIERDO, 2011; SQUIRE et al., 2003).

Após a aquisição de uma informação, a mesma é processada pelos sistemas sensoriais e retida temporariamente (minutos, horas) como memória de curta duração, podendo posteriormente ser armazenada em um sistema de memória mais estável, de longa duração. A etapa em que ocorre o armazenamento dessas informações recém-adquiridas é chamado de consolidação (IZQUIERDO et al., 2006; MCGAUGH, 1966, 2000), processo

pelo qual um novo traço de memória é gradualmente formado (BADDELEY; ANDERSON; EYSENCK, 2011). Enquanto estão sendo consolidadas, as memórias encontram-se lábeis e são sensíveis a inibidores de síntese protéica, eventos traumáticos ou à incorporação de novas informações (DA SILVA et al., 2008; IZQUIERDO, 2011; MYSKIW et al., 2008; SQUIRE; KANDEL, 2003; TAUBENFELD et al., 2001).

Mesmo já consolidadas, as memórias tornam-se novamente lábeis e susceptíveis a novas interferências quando evocadas (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; MILEKIC; ALBERINI, 2002; PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997). O processo de evocação é também conhecido como reativação, lembrança ou recuperação. A evocação de uma memória envolve, portanto, a recordação de uma informação previamente armazenada, o que comprova que o aprendizado realmente deu origem a uma memória (IZQUIERDO, 2011).

A evocação de uma memória previamente consolidada pode também ser inibida, processo este denominado de extinção (IZQUIERDO, 2011; PAVLOV, 1927; RESCORLA, 2001). Apesar de representar um “desaparecimento comportamental”, a extinção não é sinônimo de esquecimento, mas um processo ativo de aprendizagem decorrente da reexposição à informação/situação na ausência do seu reforço, o qual leva a formação de uma nova memória que se sobrepõe à original (FIORENZA et al., 2011). Assim, por tratar-se de um novo aprendizado, a formação da memória de extinção envolve mecanismos celulares e moleculares semelhantes àqueles inicialmente recrutados para a consolidação da memória original (SZAPIRO et al., 2003; VIANNA et al., 2001). Estudos têm demonstrado que a formação da memória de extinção requer a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato), podendo ser modulada pelos receptores histaminérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no hipocampo, amígdala basolateral e córtex pré-frontal ventromedial, além de necessitar de síntese de proteínas nestas três estruturas logo após a sua aquisição (BURGOS-ROBLES et al., 2007; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014; FIORENZA et al., 2012; LAURENT; WESTBROOK, 2008; SZAPIRO et al., 2003).

1.3. Condicionamento Clássico

Um excelente modelo para se estudar a extinção de uma memória é o condicionamento clássico, o qual baseia-se no fato de que muitas memórias são adquiridas por meio da associação entre diferentes estímulos. Essa relação foi primeiramente proposta no

início do século XX pelo fisiologista e médico russo, Ivan Pavlov. O condicionamento clássico, também conhecido como condicionamento Pavloviano, consiste na apresentação de um estímulo inicialmente neutro (estímulo condicionado - CS; do inglês: *conditioned stimulus*), seguido da apresentação de um estímulo biologicamente significativo (estímulo incondicionado - US, do inglês: *unconditioned stimulus*). A apresentação desse pareamento por diversas vezes gera uma resposta condicionada (CR, do inglês: *conditioned response*), a qual evidencia que a associação entre o CS e o US foi aprendida (IZQUIERDO, 2011; PAVLOV, 1927; VANELZAKKER et al., 2014).

Conforme mencionado acima, a exposição repetida do estímulo condicionado sem o seu reforço, ou seja, sem o estímulo incondicionado, é o que desencadeia o processo de extinção da memória (FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014; IZQUIERDO, 2011; PAVLOV, 1927; VURBIC; BOUTON, 2011). Clinicamente, a extinção é conhecida como terapia de exposição, sendo amplamente utilizada para tratar distúrbios motivados pelo medo (BECKETT, 2002; DAVIS et al., 2006; QUIRK et al., 2010). Durante as sessões de extinção, o indivíduo aprende a inibir a evocação de uma memória aversiva (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014; IZQUIERDO et al., 1965; RESCORLA, 2001, 2004). Apesar dessas memórias serem essenciais para a sobrevivência, quando evocadas fora de seu contexto, elas podem desencadear distúrbios de ansiedade, síndrome do pânico e, em alguns casos, transtorno de estresse pós-traumático (PTSD; do inglês: *posttraumatic stress disorder*). O PTSD é um distúrbio que provoca a recordação espontânea de memórias traumáticas, impedindo que o indivíduo tenha uma vida normal (PIZZORUSSO, 2009). Nos últimos 30 anos, o PTSD foi reconhecido como o mais grave e prevalente transtorno motivado pelo medo (BECKETT, 2002; SHER; VILENS, 2010), sendo que a terapia de exposição é reconhecida atualmente como o seu tratamento mais eficaz (BRISCIONE; JOVANOVIC; NORRHOLM, 2014).

1.4. Reconhecimento Social

As memórias de reconhecimento são extremamente importantes para a sobrevivência. Referem-se à capacidade dos animais em identificar e distinguir entre odores, gostos, objetos ou faces, familiares e não familiares (BERMUDEZ-RATTONI, 2014; BROWN; XIANG, 1998; ENNACEUR; DELACOUR, 1988; FEINBERG et al., 2012; GHEUSI et al., 1994; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005; RUETTI et al., 2014;

WARBURTON; BROWN, 2014; WILMER; GERMINE; NAKAYAMA, 2014), enquanto que a habilidade de identificar e reconhecer seres da mesma espécie é chamada de reconhecimento social (GABOR et al., 2012; GHEUSI et al., 1994). Reconhecer o co-específico é essencial para a escolha de respostas comportamentais adequadas, sejam elas do tipo agressiva, de esquiva, competitiva, cooperativa ou sexual (COLGAN, 1983; VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012).

Estudos têm demonstrado que a memória de reconhecimento social pode ser modulada por diferentes hormônios, tais como a ocitocina, a vasopressina, o estrogênio e a testosterona (BLUTHÉ; GHEUSI; DANTZER, 1993; BYCHOWSKI; MENA; AUGER, 2013; EVERTS; KOOLHAAS, 1997; POPIK; VAN REE, 1998; POPIK; VETULANI; VAN REE, 1992; VAN WIMERSMA GREIDANUS; MAIGRET, 1996). Evidências sugerem que a ocitocina é importante para o processo de aquisição da memória de reconhecimento social, enquanto que a vasopressina parece atuar tanto na aquisição quanto na consolidação dessa memória (GABOR et al., 2012; IZQUIERDO, 2011; TAUBENFELD et al., 2001).

São diversos os estudos que relatam a participação da ocitocina na memória de reconhecimento social. Em 1998, Engelmann e seus colaboradores observaram que a administração intracerebroventricular de um antagonista de ocitocina prejudicou o reconhecimento social em ratas. Outras pesquisas, realizadas com camundongos KO para ocitocina, demonstraram que esse hormônio é essencial para o reconhecimento de familiaridade (CHOLERIS et al., 2003, 2006; FERGUSON et al., 2000) e, que o prejuízo no reconhecimento social em animais *knockout* (KO) para ocitocina, poderia ser revertido através da infusão desse hormônio na amígdala medial (CHOLERIS et al., 2007; FERGUSON et al., 2001). No hipocampo ventral de ratos, a infusão de ocitocina também foi capaz de melhorar o reconhecimento social (VAN WIMERSMA GREIDANUS; MAIGRET, 1996).

Quanto aos efeitos do estrogênio, uma melhora na memória de reconhecimento social foi observada em ratas na fase de proestro, período em que ocorre um aumento da liberação de estrogênios (ENGELMANN et al., 1998). Além disso, a administração de estrogênios foi capaz de reverter o prejuízo no reconhecimento social de ratas ovariectomizadas (TANG et al., 2005). Tais efeitos podem ser parcialmente atribuídos ao papel regulador do estrogênio na produção da ocitocina e de seus receptores (HO; LEE, 1992; SARKAR; FRAUTSCHY; MITSUGI, 1992). Por sua vez, a testosterona parece atuar de forma indireta sobre a memória de reconhecimento social, visto que o seu efeito se dá através da ação do hormônio estradiol (PIERMAN et al., 2008).

Além do envolvimento do sistema neuroendócrino na formação da memória de reconhecimento social, Hlinák e Krejčí (2002) sugeriram também a participação do sistema glutamatérgico. Isto é devido ao fato da estimulação do receptor NMDA ter sido capaz de melhorar potencialmente a memória de reconhecimento social em animais adultos, além de prolongar a retenção de informações olfativas previamente armazenadas.

Estudar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de formação da memória de reconhecimento social é imprescindível para o entendimento dos fatores que podem interferir na construção e manutenção das relações sociais, além de contribuir para a compreensão dos sistemas de modulação do reconhecimento social. Em conjunto, tais informações podem fornecer dados importantes sobre o desenvolvimento e regulação de transtornos caracterizados por prejuízos no comportamento social e na comunicação, tais como os transtornos do espectro autista (BANERJEE et al., 2014; MARKHAM; JURASKA, 2007).

Segundo alguns estudos, parece que as estruturas do lobo temporal medial estão implicadas na memória e adaptação social (CAHILL; MCGAUGH, 1998; DOLCOS; LABAR; CABEZA, 2004; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011; SERGERIE; LEPAGE; ARMONY, 2006). Até o momento, sabe-se que indivíduos autistas apresentam uma desregulação na atividade da amígdala, bem como uma alteração no volume desta estrutura durante o período de desenvolvimento dos mesmos (ABELL et al., 1999; AYLWARD et al., 1999; KEMPER; BAUMAN, 1993; RADELOFF et al., 2014; SCHULKIN, 2007). Além disso, indivíduos autistas de diferentes faixas etárias apresentam um aumento no volume do hipocampo, estrutura cerebral envolvida no comportamento social (SCHULKIN, 2007). Ainda, estudos com roedores demonstraram que lesões na região hipocampal prejudicam a memória de reconhecimento social (STEVENSON; CALDWELL, 2014; UEKITA; OKANOYA, 2011).

1.5. Peptídeo PACAP

Mais de 20 anos após a sua primeira caracterização, o PACAP (do inglês: *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) ainda permanece como um dos mais fascinantes neuropeptídeos já identificados (VAUDRY et al., 2000). Originalmente isolado a partir de extratos hipotalâmicos de ovinos com base na sua capacidade de estimular a formação de AMPc (do inglês: *adenosine monophosphate cyclic*) em células da hipófise

(MIYATA et al., 1989; RESSLER et al., 2011; VAUDRY et al., 2000), o PACAP é amplamente expresso nos sistemas nervoso central e periférico sob duas formas, PACAP-38 e PACAP-27, com 38 e 27 aminoácidos, respectivamente (MIYATA et al., 1989, 1990). Ambos possuem atividade biológica semelhante (MIYATA et al., 1990), contudo, o PACAP-38 é a forma predominante nos mamíferos (ARIMURA, 1992).

O PACAP é membro da super família de hormônios peptídicos secretina/Glucagon/VIP (do inglês: *vasoactive intestinal peptide*), estando relacionado estruturalmente com este último (HARMAR et al., 2012; LEE; SEO, 2014). O PACAP exerce múltiplas atividades como neurotransmissor, neuromodulador, neuroprotetor e fator neurotrófico (ARIMURA, 1998; HANNIBAL, 2002; HATTORI et al., 2012; SHERWOOD; KRUECKL; MCRORY, 2000), contribuindo assim com diferentes processos comportamentais, tais como a ingestão de alimentos, atividade psicomotora, resposta ao estresse, aprendizagem e memória (HAMMACK et al., 2009; HASHIMOTO; SHINTANI; BABA, 2006; HASHIMOTO et al., 2001; OTTO et al., 2001).

Sua ação se dá através da interação com três receptores; o PAC1, que é específico para PACAP, e o VPAC1 e VPAC2, os quais possuem afinidades semelhantes para PACAP e VIP (ARIMURA, 1998; HASHIMOTO; SHINTANI; BABA, 2006; HATTORI et al., 2012; VAUDRY et al., 2000). No sistema nervoso central, o PACAP e seu receptor PAC1 são altamente expressos em várias regiões do cérebro que são importantes para a função cognitiva, como o hipocampo, a amígdala, o córtex entorrinal e o córtex cingulado (HASHIMOTO; SHINTANI; BABA, 2006; HATTORI et al., 2012; JOO et al., 2004; ROBERTO; BRUNELLI, 2000; SAUVAGE et al., 2000; YANG et al., 2010).

Recentemente, o aumento dos níveis sanguíneos de PACAP circulante, bem como a presença de um polimorfismo no gene que codifica o receptor PAC1 (ADCYAP1R1), foram propostos como biomarcadores para o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (ALMLI et al., 2013; RESSLER et al., 2011; UDDIN et al., 2013; WANG et al., 2013). Além disso, um estudo de neuroimagem mostra que o polimorfismo do receptor PAC1 influencia nas respostas neurais frente a estímulos ameaçadores, além de estar associado a um aumento da atividade da amígdala e do hipocampo (STEVENS et al., 2014).

Trabalhos realizados com camundongos KO para PACAP relatam ainda que esses animais apresentam anormalidades comportamentais importantes, como hiperatividade (HASHIMOTO et al., 2001) e diminuição da interação social (ISHIHAMA et al., 2010). Em

camundongos deficientes do receptor PAC1, também observou-se uma alteração nos comportamentos sociais, além de uma elevada hiperatividade (OTTO et al., 2001).

Alguns estudos sugerem que o PACAP exerce um papel modulatório na sinalização do glutamato, visto que ele é sintetizado e liberado a partir de neurônios glutamatérgicos (FAHRENKRUG; HANNIBAL, 2004; HANNIBAL et al., 2000; RESCH et al., 2014). Essa evidência está baseada no fato de que o PACAP, através do seu receptor PAC1, aumenta as correntes de NMDA e AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) na região hipocampal (COSTA et al., 2009; HANNIBAL et al., 2000; MACDONALD et al., 2005; YAKA et al., 2003).

A ativação dos receptores NMDA produz diversos efeitos, entre eles a indução da síntese de óxido nítrico (NO; do inglês: *nitric oxide*) (BREDT; SNYDER, 1989; YAMADA; NABESHIMA, 1997a, 1997b), um radical livre, gasoso e inorgânico, sintetizado a partir da L-arginina por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS 1 – 3). No sistema nervoso central, o NO atua como um mensageiro retrógrado (SON et al., 1996), regulando a liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; HANBAUER et al., 1992; O'DELL et al., 1991). Por esse motivo, o NO está envolvido no processamento de várias formas de plasticidade sináptica, especialmente na potenciação de longa duração (LTP; do inglês: *long-term potentiation*), a qual pode ser definida como um aumento estável e duradouro na eficiência da transmissão sináptica (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; EDWARDS; RICKARD, 2007; GARTHWAITE; BOULTON, 1995; O'DELL et al., 1991, 1994; PRAST; PHILIPPU, 2001; SCHUMAN; MADISON, 1991). Há evidências de que a produção de óxido nítrico pode ser coordenada pelo PACAP através de mecanismos que requerem a ativação da NOS1 e da PKA, além do influxo de Ca^{2+} na célula nervosa (JAYAKAR et al., 2014). A entrada deste íon através dos receptores NMDA parece ser o que provavelmente desencadeia a ativação da NOS1, sendo que a fosforilação da PKA também "sensibiliza" esta enzima (BREDT; FERRIS; SNYDER, 1992; HURT et al., 2012). Além disso, Jayakar e colaboradores verificaram que a sinalização PACAP/PAC1 induz a plasticidade sináptica através de um aumento na produção de NO e, que esse aumento necessita o recrutamento de receptores nicotínicos de acetilcolina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a participação do neuropeptídeo PACAP nas memórias de reconhecimento social e medo condicionado ao contexto.

2.2. Objetivos específicos

Verificar a participação do PACAP, na região CA1 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral, na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto.

Verificar a participação do PACAP, na região CA1 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral, na extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

Investigar a participação do PACAP, através da modulação dos receptores NMDA, na região CA1 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral, na consolidação e extinção da memória de medo condicionado ao contexto.

Verificar a participação do PACAP, na região CA1 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral, na consolidação da memória de reconhecimento social.

Investigar a participação do PACAP, através da modulação do óxido nítrico, na região CA1 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral, na consolidação da memória de reconhecimento social.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

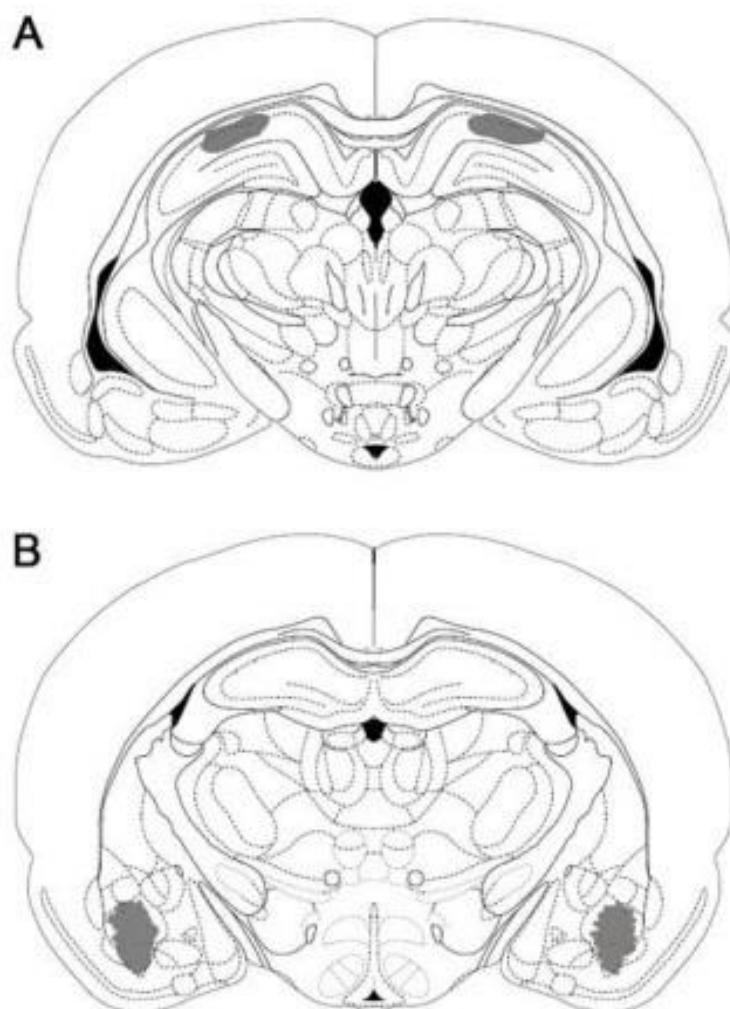
Foram utilizados ratos *Wistar* machos juvenis (22-30 dias) e adultos (3 meses), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante toda a fase experimental, os animais foram mantidos na sala de alojamento do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, em caixas plásticas especiais forradas com maravalha. As mesmas possuíam capacidade para 4 animais e eram limpas duas vezes por semana. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), com água e comida à vontade, à uma temperatura ambiente constante de 23°C.

O tamanho da amostra foi definido com base em estudos da área publicados em revistas internacionais indexadas (qualis A1), os quais utilizam 8-12 animais por grupo experimental (ATSAK et al., 2012; CLARKE et al., 2010; DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014; DIEKELMANN et al., 2011). Os procedimentos experimentais apresentados nesta dissertação foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, sob o registro: CEUA 0104/12 (ANEXO A).

3.2. Cirurgia estereotáxica

Os animais adultos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas à 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (Anterior -4.2, Lateral \pm 3.0, Ventral -1.8 mm) ou da amígdala basolateral (Anterior -2.4, Lateral \pm 5.1, Ventral -7.5 mm), segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1986) (Figura 1). Todo o procedimento de cirurgia estereotáxica foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina e xilazina, ambos administrados intraperitonealmente (i.p.) nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

Figura 1: Desenho esquemático da área atingida pelas infusões farmacológicas



Nota: A colocação correta das cânulas foi verificada através da infusão da solução de azul de metileno 4% (1,0 ul/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal (A) ou (0,5 ul/lado) na amígdala basolateral (B).

3.3. Manipulação dos animais

Nos três dias que antecederam os experimentos comportamentais, os animais adultos e juvenis foram submetidos a uma sessão diária de manipulação. Durante cada sessão, os animais foram levados da sala de alojamento até a sala onde os experimentos seriam realizados, retirados da caixa moradia e manuseados durante 2 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação, os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

3.4. Intervenções farmacológicas

As drogas e as doses utilizadas neste estudo foram o peptídeo PACAP-38 (Sigma-Aldrich), 40 pg/lado; o antagonista PACAP 6-38 (Tocris Bioscience), 40 pg/lado (SACCHETTI et al., 2001); o co-agonista dos receptores NMDA, D-serina (Sigma-Aldrich), 50 µg/lado (FIORENZA et al., 2012); e o doador de NO, SNAP (Calbiochem), 5 µg/lado (FURINI et al., 2010). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina 0,9% e mantidas em alíquotas a uma temperatura de -20°C.

Para o tratamento farmacológico foi utilizada uma micro seringa acoplada a um tubo de polietileno contendo em sua extremidade uma agulha de 0,05 mm de diâmetro. Os animais foram infundidos bilateralmente, na região CA1 do hipocampo dorsal (1 µl/lado) ou na amígdala basolateral (0,5 µl/lado) com veículo (Veh; solução salina 0,9%), PACAP-38, PACAP 6-38, PACAP 6-38 juntamente com D-serina ou PACAP 6-38 juntamente com SNAP. Ao término das micro infusões, as agulhas eram mantidas no interior das cânulas-guia por 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido.

3.5. Tarefas comportamentais

3.5.1. Medo condicionado ao contexto (MCC)

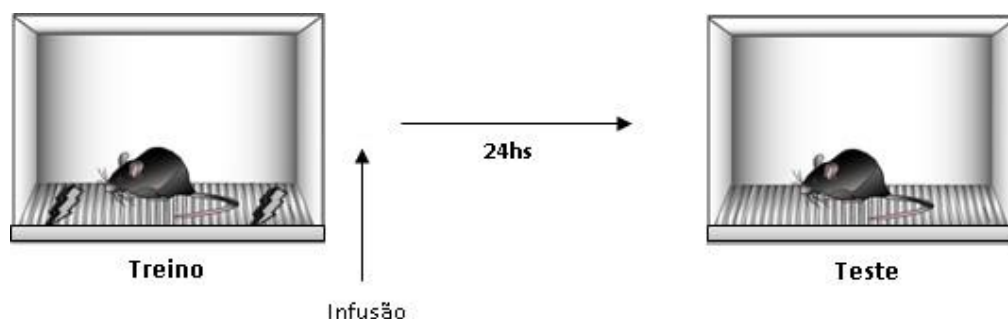
O aparato utilizado para a realização da tarefa de medo condicionado ao contexto (Panlab[®]) consiste de uma caixa (35 x 35 x 35 cm) cujas paredes são formadas de alumínio e a parte frontal em acrílico transparente. O assoalho é constituído por barras metálicas que conduzem corrente elétrica. A caixa de condicionamento está acoplada a um microcomputador que possui um *software* específico para a realização da tarefa de medo condicionado ao contexto, o qual foi previamente programado de acordo com o protocolo experimental utilizado.

3.5.1.1. Protocolo de consolidação da memória de MCC

No dia 1 (sessão de treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 s, receberam 2 estímulos elétricos (0.5 mA, 2 s) nas patas, em intervalos de 30 s cada. Sessenta segundos após o último estímulo elétrico, os

animais foram retirados do aparato e infundidos bilateralmente, na região CA1 do hipocampo dorsal (1 μ l/lado) ou na amígdala basolateral (0,5 μ l/lado), com um dos diferentes tratamentos farmacológicos. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram submetidos a uma sessão de teste (Figura 2), na qual foram recolocados na caixa de condicionamento por 180 s na ausência do estímulo elétrico. O tempo total de completa imobilidade (*freezing*), exceto pelos movimentos respiratórios, foi medido como resposta condicionada durante a sessão de teste (FIORENZA et al., 2012).

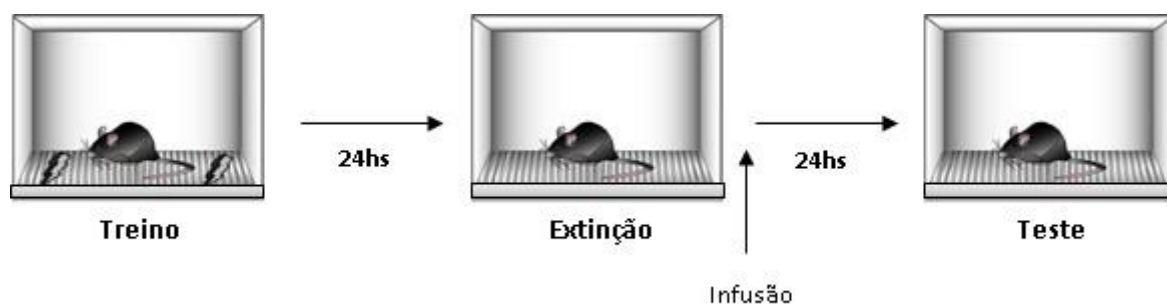
Figura 2: Desenho do protocolo experimental utilizado para a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto



3.5.1.2. Protocolo de extinção da memória de MCC

No dia 1 (sessão de treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 s, foram apresentados 2 estímulos elétricos (0.5 mA, 2 s) nas patas, em intervalos de 30 s cada. Sessenta segundos após o último estímulo elétrico, os animais foram retirados do aparato e recolocados na caixa moradia. Vinte e quatro horas depois (dia 2), os animais foram novamente colocados na caixa de condicionamento por 20 minutos para uma sessão de treino da extinção, na ausência do estímulo elétrico. Imediatamente após, os mesmos foram retirados do aparato e receberam um dos diferentes tratamentos farmacológicos intra região CA1 do hipocampo dorsal (1 μ l/lado) ou amígdala basolateral (0,5 μ l/lado). No dia 3 (sessão de teste), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento pelo período de 180 s (Figura 3), na ausência do estímulo elétrico. O tempo total de completa imobilidade (*freezing*) do animal, exceto pelos movimentos respiratórios, foi medido como resposta condicionada durante as sessões de treino da extinção e teste (FIORENZA et al., 2012).

Figura 3: Desenho do protocolo experimental utilizado para a extinção da memória de medo condicionado ao contexto



3.5.2. Reconhecimento social (RS)

A tarefa de reconhecimento social foi desenvolvida há mais de 20 anos a fim de estudar a memória de reconhecimento social em roedores, a qual reflete a habilidade de um animal identificar e lembrar de seus co-específicos (SHAHAR-GOLD; GUR; WAGNER, 2013). Esta capacidade é medida através do decréscimo do comportamento de investigação observado em animais reexpostos a um co-específico familiar (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; THOR; HOLLOWAY, 1982).

O aparato utilizado para a tarefa de reconhecimento social consiste de um campo aberto retangular com 60 cm de comprimento, 40 cm de profundidade e 50 cm de altura, cuja parte frontal é de vidro transparente para a melhor visualização do animal. Dentro do campo aberto foram colocados dois cilindros de acrílico, medindo 9 cm de diâmetro e 13 cm de altura, com buracos de 1 cm de diâmetro espaçados 1 cm entre si. O aparato encontra-se em uma sala com iluminação fraca e indireta.

Para a tarefa de reconhecimento social utilizou-se animais juvenis de 22-30 dias e animais adultos de 3 meses de idade. A fim de garantir que os adultos fossem os responsáveis pelo início do comportamento exploratório e, com o intuito de evitar comportamentos agressivos durante a realização da tarefa comportamental, os juvenis foram colocados individualmente dentro dos cilindros de acrílico. Ainda, para evitar que os adultos movessem os cilindros de lugar ou permanecessem sentados sobre os mesmos, foram colocados sobre os cilindros béqueres de 250 mls cheios de água.

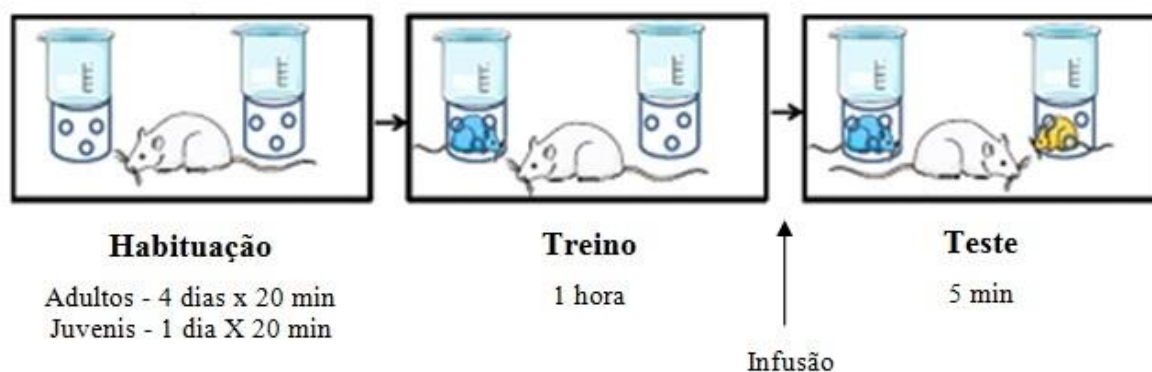
Para avaliar a retenção da memória de reconhecimento social foi cronometrado o tempo que o animal adulto dispndia explorando o juvenil. A exploração foi definida como cheirar os juvenis através dos buracos do cilindro. Para evitar pistas olfativas, os dois juvenis (familiar e novo) eram provenientes de caixas moradia diferentes, além do campo aberto e dos

cilindros de acrílico serem higienizados com uma solução de álcool 70% entre a passagem de cada animal.

3.5.2.1. Protocolo de consolidação da memória de RS

Durante 4 dias consecutivos os animais foram submetidos a uma sessão diária de 20 minutos de habituação ao aparato experimental. Para isso, os mesmos foram colocados individualmente no centro do campo aberto, o qual continha somente os dois cilindros de acrílico, para que os animais explorassem o campo livremente. No 4º dia, os animais juvenis também foram habituados ao aparato experimental e, para isso, foram colocados dentro dos cilindros de acrílico por um período de 20 minutos (Figura 4). Vinte e quatro horas após a última sessão de habituação, os animais foram individualmente colocados no centro do campo aberto, na presença de um juvenil e um cilindro vazio (sessão de treino/primeiro encontro/dia 5). Após 1 hora de livre exploração, os animais adultos receberam um dos diferentes tratamentos farmacológicos intra região CA1 do hipocampo dorsal (1 µl/lado) ou amígdala basolateral (0,5 µl/lado). Vinte e quatro horas depois (dia 6), os animais foram submetidos a uma sessão de teste (segundo encontro) de 5 minutos, na qual os mesmos foram recolocados no centro do campo aberto, na presença do juvenil familiar e de um juvenil desconhecido (novo) (Figura 4). Durante a sessão de teste, o tempo total de exploração foi medido por um avaliador com o auxílio de um cronômetro e, posteriormente, expresso como porcentagem de tempo total de exploração.

Figura 4: Desenho do protocolo experimental utilizado para a consolidação da memória de reconhecimento social



3.6. Avaliação histológica da região estudada

Após o término dos experimentos comportamentais, os animais foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas e quanto às regiões cerebrais atingidas pela infusão. Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram infundidos bilateralmente, intra-CA1 ou intra-BLA, com uma solução de azul de metileno 4% e, quinze minutos depois, foram eutanasiados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, quando então se procedeu a análise histológica. Somente os animais com a localização das cânulas dentro de 2 mm² dos locais desejados foram incluídos na análise estatística.

3.7. Análise estatística dos dados

Na análise estatística foi utilizado os *softwares* Prism Graph-Pad 5.1 e Microsoft Office Excel. Os dados obtidos na tarefa de medo condicionado ao contexto foram analisados mediante estatística não paramétrica (ANOVA de uma via seguido de Teste de Newman-Keuls). Para a análise dos dados obtidos na tarefa de reconhecimento social utilizou-se o teste *t* de Student e ANOVA de uma via seguida de Bonferroni de Múltipla Comparação. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Participação do PACAP na consolidação da memória de MCC

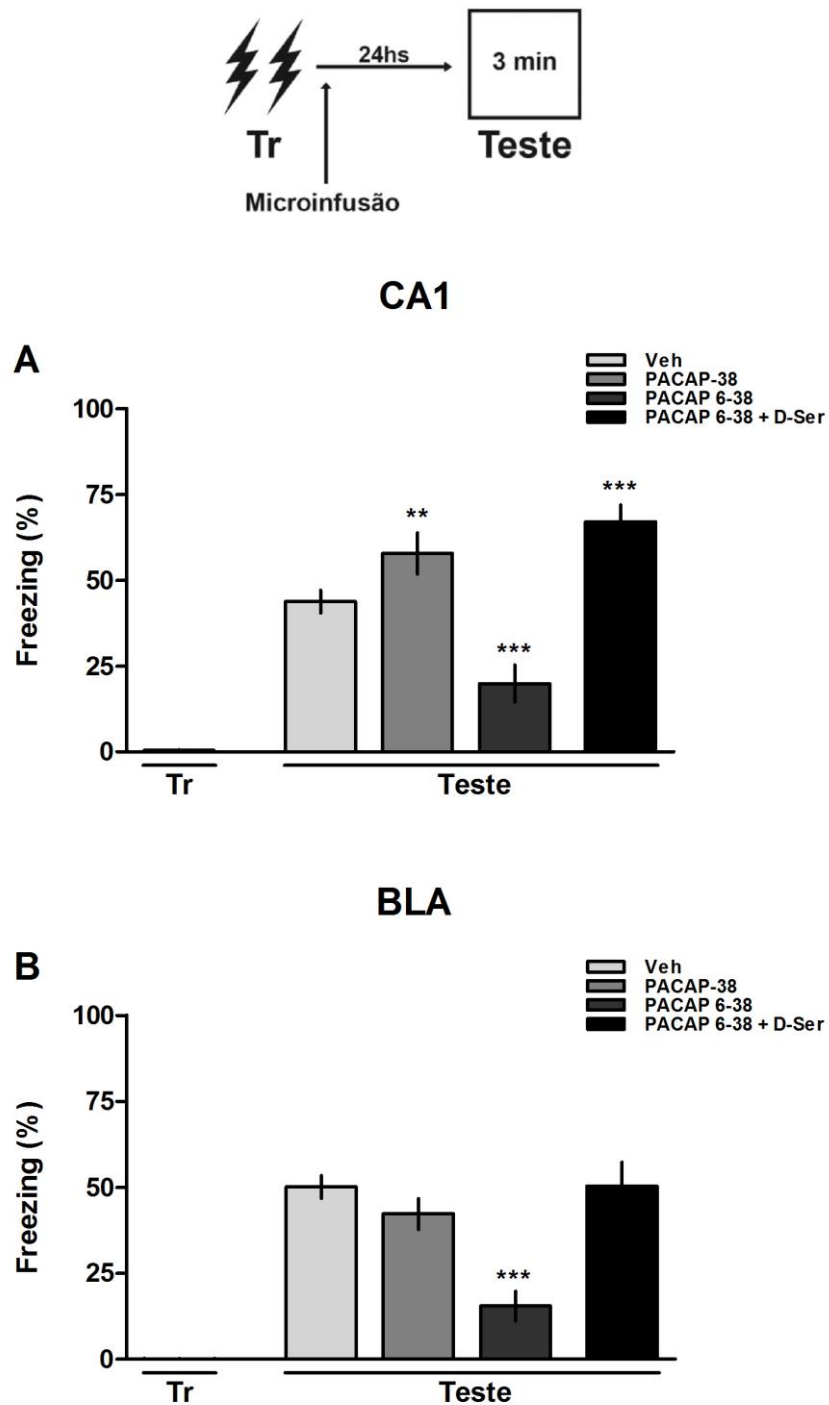
Com o objetivo de verificar a participação do PACAP na memória de medo condicionado ao contexto, animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC e, imediatamente após, foram infundidos bilateralmente, na região CA1 do hipocampo dorsal (1 µl/lado) ou na amígdala basolateral (0,5 µl/lado) com Veh (salina 0,9%), PACAP-38 (40 pg/lado) ou PACAP 6-38 (40 pg/lado). Após 24 horas, os animais foram submetidos a uma sessão de teste no mesmo aparato experimental (FIORENZA et al., 2012).

Como pode ser observado na Figura 5, durante a sessão de teste, o tempo de imobilidade dos animais que receberam infusão intra-CA1 de PACAP-38 (Fig. 5A) foi significativamente maior quando comparado com o grupo controle, enquanto que, os animais que receberam infusão intra-CA1 do antagonista do PACAP (PACAP 6-38) apresentaram um menor tempo de imobilidade quando comparados com o grupo controle. Ainda, os animais que receberam infusão intra-BLA de PACAP-38 (Fig. 5B) apresentaram um tempo de imobilidade similar ao do grupo controle durante a sessão de teste, ao contrário dos animais tratados com PACAP 6-38, que apresentaram um menor tempo de imobilidade quando comparados com o grupo controle. Esses resultados indicam que, na região CA1 do hipocampo e na BLA, o PACAP participa da consolidação da memória de medo condicionado ao contexto.

Com o objetivo de investigar se o efeito do PACAP sobre o MCC ocorre devido a uma interação com os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, animais foram submetidos a tarefa de MCC e, imediatamente após, infundidos intra-CA1 ou intra-BLA, com Veh (salina 0,9%) ou PACAP 6-38 juntamente com D-serina (50 µg/lado). Como pode ser observado na Fig. 5A, os animais que receberam PACAP 6-38 e D-serina intra-CA1 apresentaram um tempo de imobilidade, durante a sessão de teste, significativamente maior que o grupo controle, ao contrário dos animais que receberam o mesmo tratamento intra-BLA (Fig. 5B), os quais expressaram um comportamento similar ao grupo controle.

Todos os resultados apresentados acima sugerem que o PACAP modula a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral, e que esta modulação se dá através dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

Figura 5: Participação do PACAP na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto



Nota: Animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC (Tr) e, imediatamente após, receberam infusões bilaterais intra-CA1 (A) ou intra-BLA (B) de Veh (salina 0,9%), PACAP-38 (40 pg/lado), PACAP 6-38 (40 pg/lado) ou PACAP 6-38 (40 pg/lado) mais D-serina (50 ug/lado). 24 h depois os animais foram submetidos a um teste de retenção (Teste) de 3 min. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da porcentagem de tempo total de *freezing*. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. grupo controle. ANOVA de uma via seguido de Teste de Newman-Keuls (n = 10 - 12 animais por grupo).

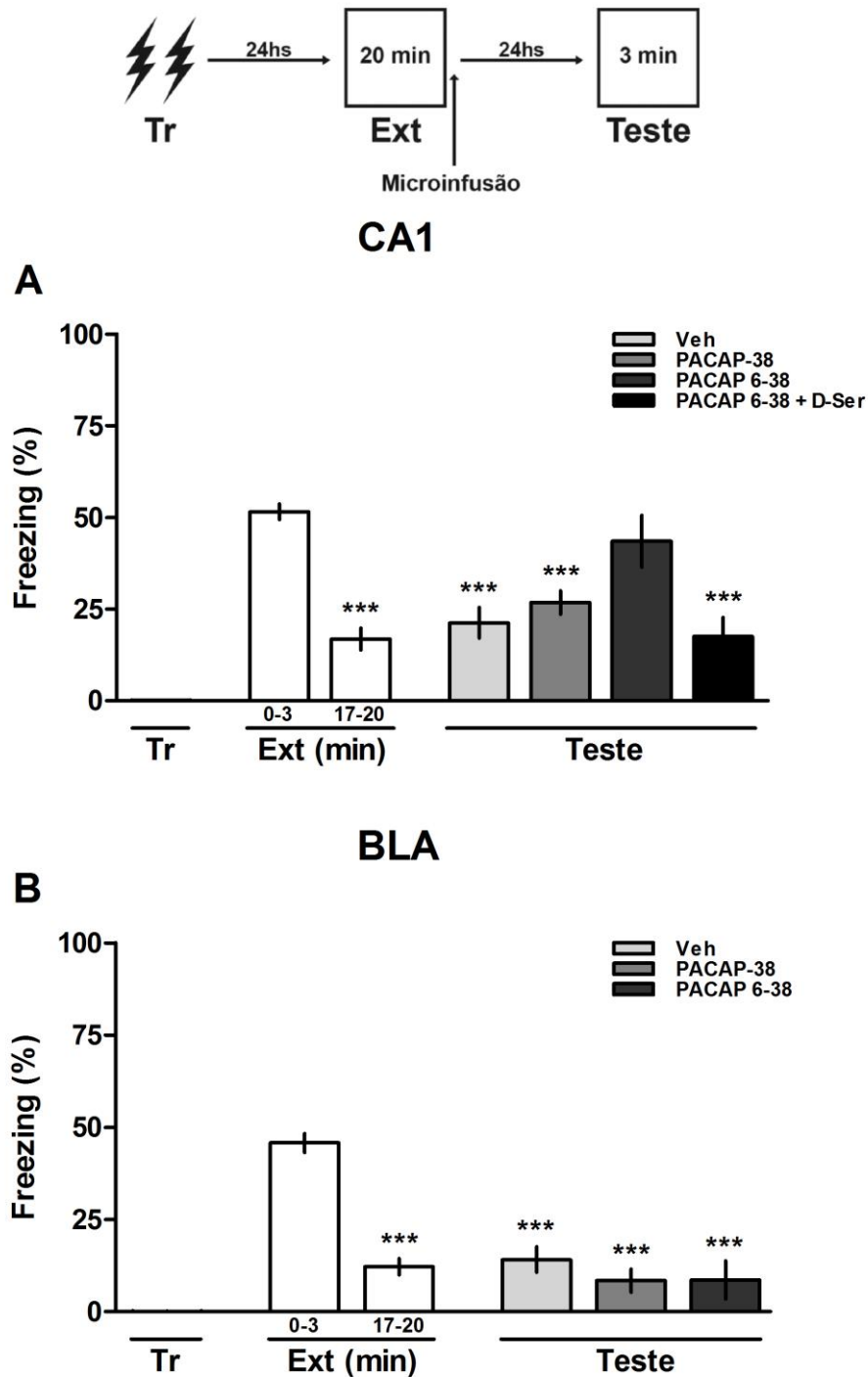
4.2. Participação do PACAP na extinção da memória de MCC

Com o objetivo de verificar a participação do PACAP na extinção da memória de medo condicionado ao contexto, animais foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de MCC. Vinte e quatro horas após, foram submetidos a uma sessão de treino de extinção do MCC, com duração de 20 min e, imediatamente depois, os animais foram infundidos bilateralmente, na região CA1 do hipocampo dorsal (1 μ l/lado) ou na amígdala basolateral (0,5 μ l/lado), com Veh (salina 0,9%), PACAP-38 (40 pg/lado) ou PACAP 6-38 (40 pg/lado). A retenção da memória de extinção foi avaliada através de uma sessão de teste realizada 24 h depois (FIORENZA et al., 2012). Os animais que receberam a infusão, intra-CA1 (Fig. 6A) ou intra-BLA (Fig. 6B) de PACAP-38 apresentaram tempo de imobilidade, durante a sessão de teste, similar ao grupo controle. O mesmo resultado foi obtido quando os animais receberam a infusão de PACAP 6-38 intra-BLA (Fig. 6B), no entanto, os animais que receberam a infusão de PACAP 6-38 intra-CA1 (Fig. 6A), apresentaram um tempo de imobilidade, durante a sessão de teste, superior ao grupo controle.

Com o objetivo de verificar se o efeito do PACAP, na região CA1 do hipocampo, sobre a memória de MCC é devido a uma interação com os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, animais foram submetidos a uma sessão de treino de extinção da memória de MCC e, imediatamente depois, foram infundidos intra-CA1 com Veh ou PACAP 6-38 juntamente com D-serina (50 μ g/lado). Como pode ser observado na Figura 6A, durante a sessão de teste, o grupo controle e o grupo PACAP 6-38 mais D-serina expressaram um tempo total de imobilidade semelhante.

Os resultados apresentados acima sugerem que, na região CA1 do hipocampo dorsal, o PACAP participa da extinção da memória de medo condicionado ao contexto, e que esta ação ocorre através dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

Figura 6: Participação do PACAP na extinção da memória de medo condicionado ao contexto



Nota: Animais foram submetidos a uma sessão de treino (Tr) na tarefa de MCC. Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a uma sessão de treino da extinção (Ext) do MCC e, imediatamente depois, receberam infusões bilaterais, intra-CA1 (A) ou intra-BLA (B), de Veh (salina 0,9%), PACAP-38 (40 pg/lado), PACAP 6-38 (40 pg/lado) ou PACAP 6-38 (40 pg/lado) mais D-serina (50 ug/lado). Depois de 24 h os animais realizaram um teste de retenção (Teste). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da porcentagem de tempo de *freezing* *** p < 0,001 vs. os primeiros 3 min do treino de extinção. ANOVA de uma via seguido do Teste de Newman-Keuls (n = 10-12 animais por grupo).

4.3. Participação do PACAP na consolidação da memória de RS

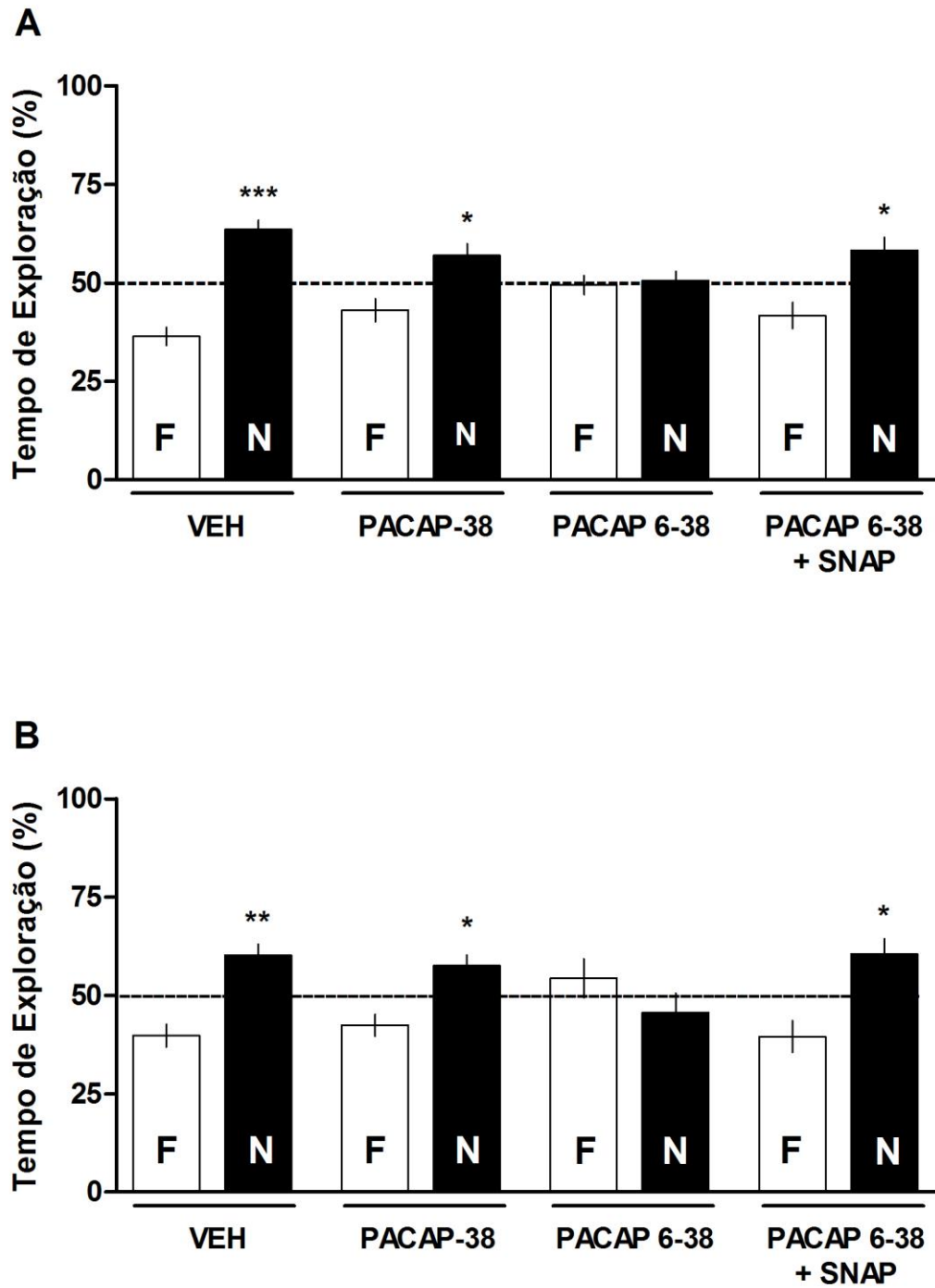
Com o objetivo de verificar a participação do PACAP na consolidação da memória de reconhecimento social, animais foram habituados por 4 dias ao campo aberto, conforme descrito anteriormente e, no 5º dia, foram colocados no mesmo aparato na presença de um animal juvenil (primeiro encontro) por um período de 1 hora. Imediatamente depois, foram infundidos bilateralmente, na região CA1 do hipocampo dorsal (1 µl/lado) ou na amígdala basolateral (0,5 µl/lado) com Veh (salina 0,9%), PACAP-38 ou PACAP 6-38. No 6º dia (segundo encontro), os animais foram recolocados no campo aberto na presença do juvenil familiar e de um novo (nunca apresentado antes), por 5 minutos.

Como pode ser observado na Figura 7A, os animais que receberam Veh ou PACAP-38 na região CA1 do hipocampo imediatamente após o primeiro encontro, passaram significativamente mais tempo explorando o juvenil novo (one sample *t*-test para o grupo veículo $t_{(11)}=5,95$; $p<0,0001$ e para o grupo PACAP-38 $t_{(8)}=2,34$; $p<0,05$). O mesmo resultado foi observado quando os animais foram infundidos com Veh ou PACAP-38 na amígdala basolateral (one sample *t*-test para o grupo veículo $t_{(11)}=3,59$; $p<0,01$ e para o grupo PACAP-38 $t_{(8)}=2,74$; $p<0,05$) (Fig 7B). Por outro lado, os animais que receberam a infusão de PACAP 6-38 intra-CA1 (Fig. 7A) ou intra-BLA (Fig. 7B), não mostraram diferença entre o tempo gasto na exploração do juvenil familiar e o novo (CA1: one sample *t*-test para o grupo PACAP 6-38 $t_{(7)}=0,21$; $p>0,05$; e BLA: one sample *t*-test para o grupo PACAP 6-38 $t_{(8)}=0,87$; $p>0,05$).

Com o objetivo de verificar se a participação do PACAP na memória de reconhecimento social se dá através do óxido nítrico, animais foram habituados ao campo aberto por 4 dias e, no 5º dia, foram expostos a um juvenil por 1 hora. Imediatamente depois, foram infundidos intra-CA1 ou intra-BLA com Veh ou PACAP 6-38 juntamente com SNAP (doador de NO). No dia 6, os animais foram expostos por 5 min ao juvenil familiar e a um juvenil novo. Os animais que receberam a infusão de PACAP 6-38 juntamente com SNAP, intra-CA1 ou intra-BLA, passaram mais tempo explorando o juvenil novo (CA1: one sample *t*-test para o grupo PACAP 6-38 + SNAP $t_{(11)}=2,49$; $p<0,05$; BLA: one sample *t*-test para o grupo PACAP 6-38 + SNAP $t_{(9)}=2,59$; $p<0,05$).

Os resultados apresentados acima sugerem que, na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral, o PACAP participa da formação da memória de reconhecimento social, e que esta participação se dá através da ação do óxido nítrico.

Figura 7: Participação do PACAP na consolidação da memória de reconhecimento social



Nota: Animais foram habituados ao campo aberto por 4 dias e, no 5º dia, foram expostos a um juvenil (F) por 1 hora. Imediatamente depois, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 (A) ou intra-BLA (B) de Veh, PACAP-38 (40 pg/lado), PACAP 6-38 (40 pg/lado) ou PACAP 6-38 (40 pg/lado) mais SNAP (5 ug/lado). No dia 6, os animais foram expostos ao juvenil familiar (F) e um juvenil novo (N), por 5 min. Os dados estão apresentados como porcentagem média \pm erro padrão do tempo total de exploração. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. valor teórico de 50% (n = 8-12 animais por grupo).

5. DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que o peptídeo PACAP participa da consolidação e da extinção da memória de medo condicionado ao contexto, e que esse efeito parece ocorrer através de uma interação com os receptores NMDA. Além disso, os resultados também demonstram que o PACAP participa da consolidação da memória de reconhecimento social, e que esse efeito parece ocorrer através da ação do óxido nítrico.

Evidências experimentais sugerem que o PACAP desempenha importantes funções fisiológicas como neurotransmissor, neuromodulador, neuroprotetor e fator neurotrófico (BRENNEMAN et al., 1990; FAHRENKRUG, 1993; LIOUDYNO et al., 1998; PINCUS; DICICCO-BLOOM; BLACK, 1990; VAUDRY et al., 2000), além de possuir um importante papel na modulação da aprendizagem e memória, bem como na modulação da resposta do cérebro ao estresse (HASHIMOTO; SHINTANI; BABA, 2006; HATTORI et al., 2012; SACCHETTI et al., 2001; YANG et al., 2010). Ainda, estudos demonstram que o PACAP e seu receptor PAC1 são altamente expressos no hipocampo e amígdala (HANNIBAL, 2002; HASHIMOTO et al., 1996; JAWORSKI; PROCTOR, 2000), regiões cerebrais que estão diretamente envolvidas no processamento das memórias (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001; BALDI; BUCHERELLI, 2010; DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; DE CARVALHO MYSKIW et al., 2014; FIORENZA et al., 2012; FISCHER et al., 2004, 2007; KIM; FANSELOW, 1992; MYERS; DAVIS, 2007; QUIRK; MUELLER, 2008; SANANBENESI et al., 2007).

Em concordância com estas observações, os resultados do presente trabalho demonstram que o peptídeo PACAP é necessário para que ocorra a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto, uma vez que a infusão do antagonista do receptor PAC1 (PACAP 6-38), tanto na região CA1 do hipocampo como na BLA, levou a um prejuízo desta memória, enquanto que seu agonista (PACAP-38) ocasionou uma facilitação da consolidação da memória quando infundido na região CA1. Com relação ao processo de extinção, a participação do PACAP parece ser mais complexa, visto que o antagonista PACAP 6-38 prejudicou a extinção da memória de medo condicionado ao contexto apenas quando administrado na região CA1 do hipocampo, enquanto que a administração de PACAP 6-38 intra-BLA não interferiu no processo de extinção desta memória.

Sauvage e colaboradores (2000) já haviam demonstrado, em camundongos *Knockout*, que o receptor PAC1 é importante para a aprendizagem do medo condicionado.

Além disso, recentes trabalhos demonstraram um aumento na expressão do gene para o receptor PAC1 (ADCYAP1R1) na amígdala duas horas após o MCC (HAMMACK et al., 2009; RESSLER et al., 2011).

Durante muito tempo, se acreditou que as mesmas estruturas cerebrais envolvidas na consolidação deveriam estar também envolvidas na extinção de diferentes tarefas comportamentais, porém, embora isto possa ser verdade em alguns casos, não é o que acontece na grande maioria (FURINI; MYSKIW; IZQUIERDO, 2014; MYSKIW et al., 2010). Nas memórias aversivas, evidências sugerem que a BLA é o sítio da associação entre o estímulo condicionado e o estímulo incondicionado (GOOSENS; MAREN, 2001), enquanto que o hipocampo está relacionado com a construção das representações contextuais da tarefa aversiva, além de outras informações simultâneas (LEDOUX, 2014; MAREN, 2001; ORSINI; MAREN, 2012; PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Assim, tem sido proposto que cada região cerebral está relacionada com um aspecto diferente da extinção ou da tarefa a ser extinta (ORSINI; MAREN, 2012). Além disso, já se demonstrou que diferentes sistemas modulatórios podem ou não serem requeridos para a extinção do MCC na região CA1 do hipocampo ou na BLA (FIORENZA et al., 2012). Outra questão relevante está relacionada com o fato do efeito positivo do PACAP na memória seguir uma curva dose-resposta em forma de U invertido (SACCHETTI et al., 2001), como já descrito previamente para muitas outras drogas que melhoram a memória (PARSONS; GOLD, 1992). Ainda, diferentes concentrações de PACAP podem inibir (CIRANNA; CAVALLARO, 2003; ROBERTO; SCURI; BRUNELLI, 2001; STER et al., 2009), aumentar (MICHEL et al., 2006; ROBERTO; BRUNELLI, 2000; ROBERTO; SCURI; BRUNELLI, 2001; STER et al., 2009), ou apresentar um efeito bifásico (ROBERTO; SCURI; BRUNELLI, 2001) sobre a transmissão sináptica basal na região CA1 do hipocampo. Em conjunto, estes dados podem ser uma possível explicação para o fato do PACAP não ter efeito na extinção do MCC quando infundido intra-BLA.

Nossos resultados também demonstram que a ação do PACAP na consolidação e extinção do MCC na região CA1, bem como na consolidação do MCC na BLA, é mediada pelos receptores glutamatérgicos NMDA, uma vez que a administração de D-Serina foi capaz de reverter o prejuízo induzido pela administração de PACAP 6-38.

Estudos *in vitro* já haviam sugerido que o PACAP melhora os potenciais do receptor NMDA nos neurônios hipocampais (KIDANE; ROUBOS; JENKS, 2008; YAKA et al., 2003), além de outros estudos demonstrarem que o receptor PAC1 modula a atividade dos

receptores NMDA através da proteína quinase A (PKA) (YAKA et al., 2003), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase Src (MACDONALD et al., 2005), três vias de sinalização conhecidas por participar do processamento das memórias (IZQUIERDO et al., 2006). Também há evidências de que o PACAP atue através de outros sistemas de neurotransmissores, como o colinérgico. Em 1993, Masuo e seus colaboradores demonstraram que o PACAP estimula a atividade colinérgica no hipocampo dorsal de ratos, uma vez que a liberação espontânea de acetilcolina aumentou após a administração do peptídeo. Alguns anos mais tarde, Roberto e Brunelli (2000) observaram que o PACAP induz a facilitação da transmissão sináptica no hipocampo através da ativação do sistema colinérgico, e que esta ação ocorre através dos receptores muscarínicos.

Além da participação do PACAP no processamento da memória aversiva de MCC, o presente trabalho também demonstra que o peptídeo PACAP participa da consolidação da memória de reconhecimento social na região CA1 do hipocampo e na amígdala basolateral, visto que a administração do antagonista PACAP 6-38 levou a um prejuízo na consolidação desta memória. Em estudos prévios, realizados com camundongos *Knockout* para PAC1 e PACAP, observou-se que esses animais apresentavam alterações no comportamento social (OTTO et al., 2001) e prejuízos na interação social (ISHIHAMA et al., 2010), respectivamente. Em contrapartida, Hattori e seus colaboradores (2012) observaram, em camundongos *Knockout* para PACAP, uma melhora no contato social, entretanto, segundo os pesquisadores, esta melhora pode ser atribuída ao fato desses animais terem apresentado um aumento da procura pela novidade.

Ainda, verificou-se que o efeito do PACAP na consolidação da memória de reconhecimento social ocorre através da ação do óxido nítrico, uma vez que a infusão do doador de NO, SNAP, foi capaz de reverter o prejuízo causado pela infusão do antagonista do PACAP, o PACAP 6-38, tanto na região CA1 do hipocampo quanto na BLA. Estes resultados estão de acordo com o recente trabalho de Jayakar e colaboradores (2014), no qual verificou-se que a sinalização de PACAP/PAC1 induz a plasticidade sináptica através de um aumento na produção de NO.

Dessa forma, os resultados da presente dissertação demonstram que o peptídeo PACAP participa da consolidação e da extinção da memória de medo condicionado ao contexto, bem como da memória de reconhecimento social. Também demonstrou-se que o efeito do PACAP nas memórias de MCC e de RS ocorre, respectivamente, através dos receptores NMDA e da ação do óxido nítrico. Tomados em conjunto, esses dados ampliam o

conhecimento sobre os mecanismos moleculares que modulam as memórias de medo condicionado ao contexto e de reconhecimento social.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desta dissertação de mestrado demonstram que:

- O PACAP participa da consolidação da memória de medo condicionado ao contexto na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral.
- O PACAP participa da extinção da memória de medo condicionado ao contexto na região CA1 do hipocampo dorsal.
- A ação do PACAP na consolidação e extinção da memória de medo condicionado ao contexto na região CA1 do hipocampo dorsal é mediada pelos receptores glutamatérgicos NMDA.
- A ação do PACAP na consolidação da memória de medo condicionado ao contexto na região da amígdala basolateral é mediada pelos receptores glutamatérgicos NMDA.
- O PACAP participa da consolidação da memória de reconhecimento social na região CA1 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral.
- A ação do PACAP na consolidação da memória de reconhecimento social na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral é mediada através da ação do óxido nítrico.

Desta forma, o presente trabalho constitui um importante complemento para o conhecimento da modulação da consolidação e extinção da memória de medo condicionado ao contexto, bem como da consolidação da memória de reconhecimento social. Além disso, os resultados aqui apresentados podem auxiliar no desenvolvimento de novas drogas que atuem diretamente sobre o PACAP e que, no futuro, possam vir a auxiliar no tratamento de distúrbios motivados pelo medo e de transtornos do comportamento social, como o PTSD e o autismo, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ABEL, T.; KANDEL, E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 360–378, maio 1998.
- ABELL, F. et al. The neuroanatomy of autism: a voxel-based whole brain analysis of structural scans. **Neuroreport**, v. 10, n. 8, p. 1647–1651, 3 jun. 1999.
- ALBERINI, C. M.; MILEKIC, M. H.; TRONEL, S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 63, n. 9, p. 999–1008, maio 2006.
- ALBRIGHT, T. D.; KANDEL, E. R.; POSNER, M. I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 5, p. 612–624, out. 2000.
- ALMLI, L. M. et al. ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. **American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 162B, n. 3, p. 262–272, abr. 2013.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, v. 11, n. 1, p. 8–17, 2001.
- ARIMURA, A. Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research. **Regulatory peptides**, v. 37, n. 3, p. 287–303, 18 fev. 1992.
- ARIMURA, A. Perspectives on pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 48, n. 5, p. 301–331, out. 1998.
- 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.
- AYLWARD, E. H. et al. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. **Neurology**, v. 53, n. 9, p. 2145–2150, 10 dez. 1999.
- BADDELEY, A. Working memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 255, n. 5044, p. 556–559, 31 jan. 1992.
- BADDELEY, A.; ANDERSON, M. C.; EYSENCK, M. W. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- BAILEY, C. H.; BARTSCH, D.; KANDEL, E. R. Toward a molecular definition of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13445–13452, 26 nov. 1996.

BALDERAS, I. et al. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 9, p. 618–624, set. 2008.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Substantia nigra, nucleus basalis magnocellularis and basolateral amygdala roles in extinction of contextual fear conditioning in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 2, p. 199–205, set. 2010.

BANERJEE, A. et al. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 387, 2014.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BECKETT, W. S. Post-traumatic stress disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 19, p. 1495–1498; author reply 1495–1498, 9 maio 2002.

BERMUDEZ-RATTONI, F. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 109, p. 207–216, mar. 2014.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 7 jan. 1993.

BLUTHÉ, R. M.; GHEUSI, G.; DANTZER, R. Gonadal steroids influence the involvement of arginine vasopressin in social recognition in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, n. 4, p. 323–335, 1993.

BREDT, D. S.; FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10976–10981, 5 jun. 1992.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 22, p. 9030–9033, nov. 1989.

BRENNEMAN, D. E. et al. Vasoactive intestinal peptide: a neurotrophic releasing agent and an astroglial mitogen. **Journal of Neuroscience Research**, v. 25, n. 3, p. 386–394, mar. 1990.

BRISCIONE, M. A.; JOVANOVIĆ, T.; NORRHOLM, S. D. Conditioned fear associated phenotypes as robust, translational indices of trauma-, stressor-, and anxiety-related behaviors. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, p. 88, 2014.

BROWN, M. W.; XIANG, J. Z. Recognition memory: neuronal substrates of the judgement of prior occurrence. **Progress in Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 149–189, jun. 1998.

BURGOS-ROBLES, A. et al. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. **Neuron**, v. 53, n. 6, p. 871–880, 15 mar. 2007.

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, 1 jan. 2010.

BYCHOWSKI, M. E.; MENA, J. D.; AUGER, C. J. Vasopressin infusion into the lateral septum of adult male rats rescues progesterone-induced impairment in social recognition. **Neuroscience**, v. 246, p. 52–58, ago. 2013.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 7, p. 294–299, jul. 1998.

CHOLERIS, E. et al. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor-alpha and -beta knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 6192–6197, 13 maio 2003.

CHOLERIS, E. et al. Involvement of estrogen receptor alpha, beta and oxytocin in social discrimination: A detailed behavioral analysis with knockout female mice. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 5, n. 7, p. 528–539, out. 2006.

CHOLERIS, E. et al. Microparticle-based delivery of oxytocin receptor antisense DNA in the medial amygdala blocks social recognition in female mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 11, p. 4670–4675, 13 mar. 2007.

CIRANNA, L.; CAVALLARO, S. Opposing effects by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide on hippocampal synaptic transmission. **Experimental Neurology**, v. 184, n. 2, p. 778–784, dez. 2003.

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.

COLGAN, P. W. **Comparative social recognition**. Canada: Wiley, 1983.

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

COSTA, L. et al. Modulation of AMPA receptor-mediated ion current by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in CA1 pyramidal neurons from rat hippocampus. **Hippocampus**, v. 19, n. 1, p. 99–109, jan. 2009.

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.

DA SILVA, W. C. et al. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus**, v. 18, n. 1, p. 29–39, 2008.

DAVIS, M. et al. Combining pharmacotherapy with cognitive behavioral therapy: traditional and new approaches. **Journal of Traumatic Stress**, v. 19, n. 5, p. 571–581, out. 2006.

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

DE CARVALHO MYSKIW, J.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 1071–1076, 15 jan. 2013.

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

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.

DOLCOS, F.; LABAR, K. S.; CABEZA, R. Interaction between the amygdala and the medial temporal lobe memory system predicts better memory for emotional events. **Neuron**, v. 42, n. 5, p. 855–863, 10 jun. 2004.

EDWARDS, T. M.; RICKARD, N. S. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 3, p. 413–425, 2007.

ENGELMANN, M. et al. Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 90, n. 1, p. 89–94, jan. 1998.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1 nov. 1988.

EVERTS, H. G.; KOOLHAAS, J. M. Lateral septal vasopressin in rats: role in social and object recognition? **Brain Research**, v. 760, n. 1-2, p. 1–7, 20 jun. 1997.

FAHRENKRUG, J. Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. **Pharmacology & Toxicology**, v. 72, n. 6, p. 354–363, jun. 1993.

FAHRENKRUG, J.; HANNIBAL, J. Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 393–401, mar. 2004.

FEINBERG, L. M. et al. Recognition memory for social and non-social odors: Differential effects of neurotoxic lesions to the hippocampus and perirhinal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 1, p. 7–16, jan. 2012.

FERGUSON, J. N. et al. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 284–288, jul. 2000.

FERGUSON, J. N. et al. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8278–8285, 15 out. 2001.

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.

FISCHER, A. et al. Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 1962–1966, 25 fev. 2004.

FISCHER, A. et al. Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 149–158, jan. 2007.

FURINI, C.; MYSKIW, J.; IZQUIERDO, I. The learning of fear extinction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 47C, p. 670–683, 29 out. 2014.

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.

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

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 683–706, 1995.

GHEUSI, G. et al. Ethological study of the effects of tetrahydroaminoacridine (THA) on social recognition in rats. **Psychopharmacology**, v. 114, n. 4, p. 644–650, maio 1994.

GOOSENS, K. A.; MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 8, n. 3, p. 148–155, jun. 2001.

HAMMACK, S. E. et al. Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 833–843, jul. 2009.

HANBAUER, I. et al. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. **Neuroreport**, v. 3, n. 5, p. 409–412, maio 1992.

HANNIBAL, J. et al. PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 418, n. 2, p. 147–155, 6 mar. 2000.

HANNIBAL, J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 453, n. 4, p. 389–417, 25 nov. 2002.

HARMAR, A. J. et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 1, p. 4–17, maio 2012.

HASHIMOTO, H. et al. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 371, n. 4, p. 567–577, 5 ago. 1996.

HASHIMOTO, H. et al. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13355–13360, 6 nov. 2001.

HASHIMOTO, H.; SHINTANI, N.; BABA, A. New insights into the central PACAPergic system from the phenotypes in PACAP- and PACAP receptor-knockout mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1070, p. 75–89, jul. 2006.

HATTORI, S. et al. Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, p. 58, 2012.

HLINÁK, Z.; KREJČÍ, I. N-methyl-D-aspartate improved social recognition potency in rats. **Neuroscience Letters**, v. 330, n. 3, p. 227–230, 27 set. 2002.

HO, M. L.; LEE, J. N. Ovarian and circulating levels of oxytocin and arginine vasopressin during the estrous cycle in the rat. **Acta Endocrinologica**, v. 126, n. 6, p. 530–534, jun. 1992.

HURT, K. J. et al. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 41, p. 16624–16629, 9 out. 2012.

ISHIHAMA, T. et al. Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioral abnormalities in adult PACAP-deficient mice. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 274–280, 19 jun. 2010.

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

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 18 jun. 1998.

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. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci**, v. 29, p. 496–505, set. 2006.

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

JAWORSKI, D. M.; PROCTOR, M. D. Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC(1) receptor mRNA expression in the rat central nervous system. **Brain Research. Developmental Brain Research**, v. 120, n. 1, p. 27–39, 15 mar. 2000.

JAYAKAR, S. S. et al. PACAP induces plasticity at autonomic synapses by nAChR-dependent NOS1 activation and AKAP-mediated PKA targeting. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 63C, p. 1–12, 25 ago. 2014.

JOO, K. M. et al. Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 476, n. 4, p. 388–413, 30 ago. 2004.

KANDEL, E. R. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2 nov. 2001.

KEMPER, T. L.; BAUMAN, M. L. The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. **Neurologic Clinics**, v. 11, n. 1, p. 175–187, fev. 1993.

KIDANE, A. H.; ROUBOS, E. W.; JENKS, B. G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates brain-derived neurotrophic factor exon IV expression through the VPAC1 receptor in the amphibian melanotrope cell. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 4177–4182, ago. 2008.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5057, p. 675–677, 1 maio 1992.

KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. **Hippocampus**, v. 10, n. 1, p. 47–56, 2000.

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.

LAURENT, V.; WESTBROOK, R. F. Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 9, p. 657–666, set. 2008.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 25 fev. 2014.

LEE, E. H.; SEO, S. R. Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. **BMB reports**, v. 47, n. 7, p. 369–375, jul. 2014.

LEES, G. V.; JONES, E. G.; KANDEL, E. Expressive genes record memories. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 5, p. 533–536, out. 2000.

LIOUDYNO, M. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in vitro. **Journal of Neuroscience Research**, v. 51, n. 2, p. 243–256, 15 jan. 1998.

MACDONALD, D. S. et al. Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G alpha q, protein kinase C, and activation of Src. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11374–11384, 7 dez. 2005.

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

MARKHAM, J. A.; JURASKA, J. M. Social recognition memory: influence of age, sex, and ovarian hormonal status. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 5, p. 881–888, 5 dez. 2007.

MASUO, Y. et al. Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the spontaneous release of acetylcholine from the rat hippocampus by brain microdialysis. **Brain Research**, v. 611, n. 2, p. 207–215, 21 maio 1993.

MAYFORD, M.; KANDEL, E. R. Genetic approaches to memory storage. **Trends in genetics: TIG**, v. 15, n. 11, p. 463–470, nov. 1999.

MAYFORD, M.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, jun. 2012.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, p. 1351–8, set. 1966.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, p. 248–51, jan. 2000.

MICHEL, S. et al. Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. **BMC neuroscience**, v. 7, p. 15, 2006.

MILEKIC, M. H.; ALBERINI, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 521–525, 24 out. 2002.

MIYATA, A. et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 164, n. 1, p. 567–574, 16 out. 1989.

MIYATA, A. et al. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 170, n. 2, p. 643–648, 31 jul. 1990.

MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 120–150, fev. 2007.

MYSKIW, J. C. et al. On the participation of mTOR in recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 89, p. 338–51, mar. 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. **Neurobiol Learn Mem**, v. 94, p. 285–91, set. 2010.

O'DELL, T. J. et al. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 24, p. 11285–11289, 15 dez. 1991.

O'DELL, T. J. et al. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5171, p. 542–546, 22 jul. 1994.

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

OTTO, C. et al. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 15, p. 5520–5527, 1 ago. 2001.

PARSONS, M. W.; GOLD, P. E. Glucose enhancement of memory in elderly humans: an inverted-U dose-response curve. **Neurobiology of Aging**, v. 13, n. 3, p. 401–404, jun. 1992.

PAVLOV, I. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex**. London: Oxford University Press, 1927.

PAXINOS, G. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed ed. Sydney ; Orlando: Academic Press, 1986.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274–285, abr. 1992.

PIERMAN, S. et al. Activational effects of estradiol and dihydrotestosterone on social recognition and the arginine-vasopressin immunoreactive system in male mice lacking a functional aromatase gene. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 98–106, jun. 2008.

PINCUS, D. W.; DICICCO-BLOOM, E. M.; BLACK, I. B. Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. **Nature**, v. 343, n. 6258, p. 564–567, 8 fev. 1990.

PIZZORUSSO, T. Neuroscience. Erasing fear memories. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5945, p. 1214–1215, 4 set. 2009.

POPIK, P.; VAN REE, J. M. Neurohypophyseal peptides and social recognition in rats. **Progress in brain research**, v. 119, p. 415–436, 1998.

POPIK, P.; VETULANI, J.; VAN REE, J. M. Low doses of oxytocin facilitate social recognition in rats. **Psychopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 71–74, 1992.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 51–68, maio 2001.

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

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.

QUIRK, G. J. et al. Erasing fear memories with extinction training. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 14993–14997, 10 nov. 2010.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 56–72, jan. 2008.

RADELOFF, D. et al. Structural alterations of the social brain: a comparison between schizophrenia and autism. **PloS One**, v. 9, n. 9, p. e106539, 2014.

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.

RESCH, J. M. et al. Augmented cystine-glutamate exchange by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling via the VPAC1 receptor. **Synapse (New York, N.Y.)**, 28 jul. 2014.

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

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

RESSLER, K. J. et al. Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. **Nature**, v. 470, n. 7335, p. 492–497, 24 fev. 2011.

RICHTER, K.; WOLF, G.; ENGELMANN, M. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 12, n. 4, p. 407–413, ago. 2005.

ROBERTO, M.; BRUNELLI, M. PACAP-38 Enhances Excitatory Synaptic Transmission in the Rat Hippocampal CA1 Region. **Learning & Memory**, v. 7, n. 5, p. 303–311, 1 set. 2000.

ROBERTO, M.; SCURI, R.; BRUNELLI, M. Differential effects of PACAP-38 on synaptic responses in rat hippocampal CA1 region. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 8, n. 5, p. 265–271, out. 2001.

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

ROSSATO, J. I. et al. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 50, p. 21801–21805, 14 dez. 2010.

RUETTI, E. et al. Corticosterone and propranolol's role on taste recognition memory. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 127, p. 37–41, dez. 2014.

SACCHETTI, B. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 76, n. 1, p. 1–6, jul. 2001.

SANANBENESI, F. et al. A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 1012–1019, ago. 2007.

SARKAR, D. K.; FRAUTSCHY, S. A.; MITSUGI, N. Pituitary portal plasma levels of oxytocin during the estrous cycle, lactation, and hyperprolactinemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 652, p. 397–410, 12 jun. 1992.

SAUVAGE, M. et al. Mild deficits in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor type 1 (PAC1) performing on memory tasks. **Brain research. Molecular brain research**, v. 84, n. 1-2, p. 79–89, 8 dez. 2000.

SCHUCHARD, J.; THOMPSON, C. K. Implicit and explicit learning in individuals with agrammatic aphasia. **Journal of Psycholinguistic Research**, v. 43, n. 3, p. 209–224, jun. 2014.

SCHULKIN, J. Autism and the amygdala: an endocrine hypothesis. **Brain and Cognition**, v. 65, n. 1, p. 87–99, out. 2007.

SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5037, p. 1503–1506, 6 dez. 1991.

SERGERIE, K.; LEPAGE, M.; ARMONY, J. L. A process-specific functional dissociation of the amygdala in emotional memory. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1359–1367, ago. 2006.

SHAHAR-GOLD, H.; GUR, R.; WAGNER, S. Rapid and Reversible Impairments of Short- and Long-Term Social Recognition Memory Are Caused by Acute Isolation of Adult Rats via Distinct Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e65085, 31 maio 2013.

SHER, L.; VILENS, A. **Neurobiology of post-traumatic stress disorder**. New York: Nova Biomedical, 2010.

SHERWOOD, N. M.; KRUECKL, S. L.; MCRORY, J. E. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 6, p. 619–670, dez. 2000.

SON, H. et al. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell**, v. 87, n. 6, p. 1015–1023, 13 dez. 1996.

SQUIRE, L.; KANDEL, E. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SQUIRE, L. R. The organization and neural substrates of human memory. **International Journal of Neurology**, v. 21-22, p. 218–222, 1988 1987.

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

SQUIRE, L. R.; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annual Review of Psychology**, v. 44, p. 453–495, 1993.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T.; CLARK, R. E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 872–883, nov. 2007.

STER, J. et al. Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 1, p. 101–113, 15 jan. 2009.

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

STEVENS, J. S. et al. PACAP receptor gene polymorphism impacts fear responses in the amygdala and hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 8, p. 3158–3163, 25 fev. 2014.

STEVENSON, E. L.; CALDWELL, H. K. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. **The European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 9, p. 3294–3301, nov. 2014.

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.

TANG, A. C. et al. Effects of long-term estrogen replacement on social investigation and social memory in ovariectomized C57BL/6 mice. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 3, p. 350–357, mar. 2005.

TAUBENFELD, S. M. et al. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 813–818, ago. 2001.

THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 96, n. 6, p. 1000, 1982.

- UDDIN, M. et al. Adcyap1r1 genotype, posttraumatic stress disorder, and depression among women exposed to childhood maltreatment. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 3, p. 251–258, mar. 2013.
- UEKITA, T.; OKANOYA, K. Hippocampus lesions induced deficits in social and spatial recognition in *Octodon degus*. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 2, p. 302–309, jun. 2011.
- VAN DER KOOIJ, M. A.; SANDI, C. Social memories in rodents: methods, mechanisms and modulation by stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1763–1772, ago. 2012.
- VAN WIMERSMA GREIDANUS, T. B.; MAIGRET, C. The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. **Brain Research**, v. 713, n. 1-2, p. 153–159, 25 mar. 1996.
- VANELZAKKER, M. B. et al. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 113, p. 3–18, set. 2014.
- VAUDRY, D. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 2, p. 269–324, jun. 2000.
- VAUDRY, D. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 3, p. 283–357, set. 2009.
- VIANNA, M. R. et al. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et AL.]**, v. 34, n. 2, p. 233–240, fev. 2001.
- WANG, L. et al. PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype is associated with PTSD's emotional numbing symptoms in Chinese earthquake survivors. **Journal of Affective Disorders**, v. 150, n. 1, p. 156–159, 15 ago. 2013.
- WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, 12 out. 2014.
- WILMER, J. B.; GERMINE, L. T.; NAKAYAMA, K. Face recognition: a model specific ability. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 769, 2014.
- YAKA, R. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP(1-38)) enhances N-methyl-D-aspartate receptor function and brain-derived neurotrophic factor expression via RACK1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9630–9638, 14 mar. 2003.
- YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Simultaneous measurement of nitrite and nitrate levels as indices of nitric oxide release in the cerebellum of conscious rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 3, p. 1234–1243, mar. 1997a.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Two pathways of nitric oxide production through glutamate receptors in the rat cerebellum in vivo. **Neuroscience Research**, v. 28, n. 2, p. 93–102, jun. 1997b.

YANG, K. et al. The Involvement of PACAP/VIP System in the Synaptic Transmission in the Hippocampus. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 42, n. 3, p. 319–326, nov. 2010.

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, maio 2011.

ANEXO A – Aprovação do projeto pela CEUA – PUCRS



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

Ofício 038/13 – CEUA

Porto Alegre, 13 de junho de 2013.


Senhor Pesquisador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00335, **“Participação do peptídeo PACAP na formação de diferentes tipos de memória”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Lembramos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação.

Atenciosamente,


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

Ilmo. Sr.
Prof. Iván Izquierdo
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



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

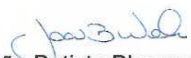
Ofício 63/14 - CEUA

Porto Alegre, 29 de agosto de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A CEUA/PUCRS informa que apreciou e aprovou sua solicitação datada de 01 de agosto do corrente ano para alteração de tarefa comportamental no projeto 13/00335.

Atenciosamente,


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

Ilmo. Sr. →
Prof. Iván Izquierdo
INSCER
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B – Artigo Original

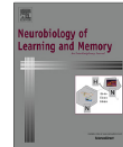
Neurobiology of Learning and Memory 118 (2015) 120–124



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme



PACAP modulates the consolidation and extinction of the contextual fear conditioning through NMDA receptors



S.D. Schmidt^a, J.C. Myskiw^{a,b}, C.R.G. Furini^{a,b}, B.E. Schmidt^a, L.E. Cavalcante^a, I. Izquierdo^{a,b,*}

^a Memory Center, Brain Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690, 2nd Floor, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil
^b National Institute of Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2014
Revised 24 November 2014
Accepted 27 November 2014
Available online 6 December 2014

Keywords:

PACAP
Consolidation
Extinction
Contextual fear conditioning
NMDA receptors

ABSTRACT

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a broad spectrum of biological functions including neurotransmitter, neurotrophic and neuroprotective. Moreover, it has been suggested that PACAP plays a role in the modulation of learning and memory as well as on the modulation of glutamate signaling. Thus, in the current study we investigated in the CA1 region of hippocampus and in the basolateral amygdala (BLA) the role of PACAP in the consolidation and extinction of contextual fear conditioning (CFC) and the interaction between PACAP and NMDA receptors. Male rats with cannulae implanted in the CA1 region of the hippocampus or in the BLA received immediately after the training or extinction training of the CFC infusions of the Vehicle, PACAP-38 (40 pg/side), PACAP 6-38 (40 pg/side) or PACAP 6-38 plus D-serine (50 µg/side). After 24 h, the animals were subjected to a 3-min retention test. The results indicated that in the CA1 region of hippocampus, PACAP participates in the consolidation and extinction of the CFC, and in the BLA, PACAP participates only in the consolidation of the CFC. Additionally, the results suggest that the action of PACAP on the consolidation and extinction of the CFC is mediated by the glutamate NMDA receptors.

© 2014 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a pleiotropic bioactive peptide that belongs to the secretin/glucagon/vasoactive intestinal polypeptide (VIP) superfamily (Harmar et al., 1998; Lee & Seo, 2014). Originally isolated from ovine hypothalamic extracts, PACAP is widely expressed in the central and peripheral nervous systems in two different forms, PACAP-38 and PACAP-27, which have 38 and 27 amino acids respectively (Miyata et al., 1989, 1990).

In the brain, PACAP and its receptor subtype 1 (PAC1) are expressed in several regions that play a key role in learning and memory, such as the hippocampus, amygdala, and cingulate and entorhinal cortices (Sauvage, Brabet, Holsboer, Bockaert, & Steckler, 2000). It has been suggested that PACAP is synthesized and released from glutamate neurons (Fahrenkrug & Hannibal, 2004; Hannibal, Møller, Ottersen, & Fahrenkrug, 2000), allowing PACAP to have a potential modulatory role on glutamate signaling (Resch et al., 2014). This is supported by the fact that PACAP

enhances both NMDA and AMPA currents in the hippocampus through PAC1 receptors (PAC1R) (Costa, Santangelo, Li Volsi, & Ciranna, 2009; Hannibal et al., 2000; Macdonald et al., 2005; Yaka, He, Phamluong, & Ron, 2003).

Recently, the increase in circulating PACAP and a polymorphism in its PAC1R have been proposed as biomarkers for Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) (Almli et al., 2013; Hammack et al., 2009; Ressler et al., 2011; Uddin et al., 2013; Vaudry et al., 2009; Wang et al., 2013), one of the most serious and prevalent disorder motivated by fear (Beckett, 2002; Sher & Vilens, 2010). The most effective treatment for PTSD is exposure therapy, which is based on extinction learning. During the extinction sessions, subjects learn to inhibit the retrieval of previously acquired memories (Brisicione, Jovanovic, & Norrholm, 2014; De Carvalho Myskiw, Benetti, & Izquierdo, 2013; De Carvalho Myskiw, Furini, Benetti, & Izquierdo, 2014; Myskiw, Izquierdo, & Furini, 2014).

Extinction is an active learning process that requires the activation of the glutamate NMDA receptor and can be modulated by H2-histaminergic, β-noradrenergic and D1-dopaminergic receptors in the hippocampus, basolateral amygdala and prefrontal cortex (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez, Santini, & Quirk, 2007; Fiorenza, Rosa, Izquierdo, & Myskiw, 2012; Laurent & Westbrook, 2008; Szapiro, Vianna, McGaugh, Medina, & Izquierdo, 2003).

* Corresponding author at: Av. Ipiranga, 6690, IPB, 2nd Floor, HSL, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), 90.610-000 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 3320 3312.

E-mail address: izquier@terra.com (I. Izquierdo).

Based on fact that PACAP appears to play a role in the modulation of learning and memory as well as on the modulation of glutamate signaling, in the current study, we investigated whether PACAP is involved in the consolidation and extinction of contextual fear conditioning in the CA1 region of hippocampus and in the basolateral amygdala.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male *Wistar* rats (3 months old, 300–330 g) purchased from Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (our regular provider) were used. The animals were housed four to a cage and kept with free access to food and water, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The temperature of the animals' room was maintained at 22–24 °C. All procedures are in accordance with the National Institutes of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by Bioethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

2.2. Surgery

Animals were anesthetized with intraperitoneal injections of a mixture of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and implanted with a 22-gauge bilateral guide cannula 1 mm above of the dorsal CA1 area of the hippocampus (anterior, –4.2 mm; lateral, ±3.0 mm; ventral, –1.8 mm) or the basolateral amygdala (BLA; anterior, –2.4; lateral, ±5.1; ventral, –7.5 mm) (I. Izquierdo et al., 1997; Paxinos & Watson, 1986). Acrylic cement was used to affix the cannulae to the skull. Animals were allowed 7 days to recover from surgery prior to behavioral procedures. Animals were handled once daily for 3 consecutive days and all behavioral procedures was conducted between 8:00 and 11:00 a.m.

2.3. Contextual fear conditioning apparatus

Contextual fear conditioning (CFC) and extinction was performed in the same conditioning chamber (Panlab, Barcelona, Spain) with aluminum walls (35 × 35 × 35 cm) and a clear front lid. The floor of the chamber consisted of parallel stainless-steel grid bars, spaced 0.8 mm between them. The grid was connected to a device to deliver the foot shocks presentations. The conditioning chamber was placed inside a sound-attenuating box (Panlab, Barcelona, Spain) with a ventilating fan. The chamber was cleaned with 70% ethanol before and after each use. The percentage of the time that the animals spent freezing in the apparatus were measured automatically by a counter connected to photocells. Freezing (no visible movement except for respiration) was scored and converted into a percentage.

2.4. Behavioral procedures

2.4.1. Consolidation of the contextual fear conditioning

On the training day the animals were placed into the conditioning chamber and after 2 min two electrical foot shocks (0.5 mA, 2 s) were delivered at a 30 s interval. Animals were removed from the conditioning chamber 30 s after the last foot shock and placed back in their home cages. After 24 h, the animals were placed in the same apparatus for a 3-min retention test with no foot shocks (de Carvalho Myskiw et al., 2013; Fiorenza et al., 2012).

2.4.2. Extinction of the contextual fear conditioning

The training session of the contextual fear conditioning was performed as described above and, 24 h later the animals were placed in the same conditioning chamber for a 20-min extinction training of contextual fear, in the absence of the foot shocks. After 24 h the animals were placed again in the same apparatus for a 3-min extinction retention test, again with no foot shocks (de Carvalho Myskiw et al., 2013; Fiorenza et al., 2012).

2.5. Pharmacological treatments

Microinjections were carried out less than 1 min after the contextual fear conditioning training or extinction training sessions. The animals were gently restrained by hand, and the injection needle (30 gauge) was fitted tightly into the guides, extending 1 mm from the tip of the guide cannulae. The injection needle was connected to a 10 µl Hamilton microsyringe and the infusions were performed at a rate of 0.5 µl/30 s. The microinfusion volume used was 1.0 µl per side into the dorsal CA1 area of the hippocampus and 0.5 µl per side into the BLA. At the end of the microinfusion, the injection needle was left in place 1 min, to allow the solution to diffuse away from the cannula tip, then carefully withdrawn and placed on the other side.

The drugs and the doses used were the peptide PACAP-38 (Sigma–Aldrich; St Louis, MO, USA), 40 pg/side; the antagonist PACAP 6-38 (Tocris), 40 pg/side (Sacchetti et al., 2001) and; the agonist of the NMDA receptor glycine site, D-Serine (Sigma–Aldrich; St Louis, MO, USA), 50 µg/side (Fiorenza et al., 2012; Sacchetti et al., 2001). All drugs were freshly dissolved in sterile saline 0.9%.

2.6. Cannula placement

Correct cannulae placements were verified 2–4 days after the end of the last behavioral procedure. Animals were infused with a 4% methylene blue solution over 30 s into the CA1 region of the dorsal hippocampus (1.0 µl/side) or into the BLA (0.5 µl/side) at the coordinates mentioned above. Thirty min later, the animals were sacrificed by excess anesthesia and the brains were removed and kept in 10% formalin. The extension of the spread of the dye was considered to represent an estimate of the amount of drug infused. Cannula placement was considered correct when the spread was ≤1 mm from the intended infusion site; this occurred in 98% of the animals (Fig. 1).

2.7. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Effects of PACAP on contextual fear conditioning

Immediately after CFC training, rats received bilateral intra-CA1 or intra-BLA infusions of Vehicle (Veh), PACAP-38 (40 pg/side), PACAP 6-38 (40 pg/side) or PACAP 6-38 (40 pg/side) plus D-serine (50 µg/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test (Fiorenza et al., 2012).

As shown in Fig. 2, animals that received PACAP-38 into the CA1 region of hippocampus (Fig. 2A), but not into the BLA (Fig. 2B) after the CFC training exhibited higher levels of freezing during the retention test than the animals that received Veh. On the other

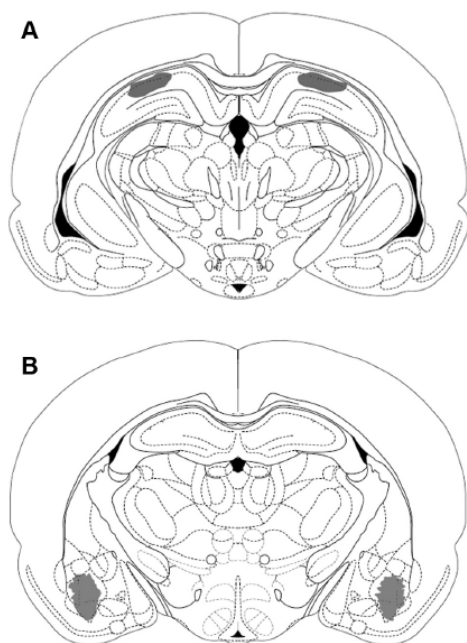


Fig. 1. Schematic drawing shows the area reached by the infusions. The correct cannula placement was verified by infusion of a 4% methylene blue solution (1.0 μ l/side) into the CA1 region of the dorsal hippocampus (A) or (0.5 μ l/side) into the BLA (B) at the coordinates derived from Atlas Paxinos and Watson (1986).

hand, the animals that received PACAP 6-38 intra-CA1 or intra-BLA after the CFC training exhibited lower levels of freezing than the Veh group during the retention test. Thus, the animals that received PACAP 6-38 plus D-serine intra-CA1 but not intra-BLA after the CFC training expressed higher levels of freezing than the Veh group during the retention test. These results indicate that PACAP modulates the CFC and the NMDA receptors activity in the CA1 region of the dorsal hippocampus and in the BLA.

3.2. Effects of PACAP on the extinction of contextual fear conditioning

Rats trained in CFC were subjected to an extinction training 24 h later, and immediately after the animals received bilateral intra-CA1 or intra-BLA infusions of Vehicle (Veh), PACAP-38 (40 pg/side), PACAP 6-38 (40 pg/side) or PACAP 6-38 (40 pg/side) plus D-serine (50 μ g/side). 24 h later they were subjected to a 3-min extinction retention test (Fiorenza et al., 2012).

As shown in Fig. 3, animals that received PACAP-38 into the CA1 (Fig. 3A) or into the BLA (Fig. 3B), after the extinction training exhibited similar levels of freezing than the Veh group during the extinction retention test. On the other hand, animals that received PACAP 6-38 into CA1 but not intra-BLA after the extinction training exhibited higher levels of freezing than the Veh group during the extinction retention test. Thus, the animals that received PACAP 6-38 plus D-serine intra-CA1 after the extinction training expressed lower levels of freezing than the Veh group during the extinction retention test. These results indicate that in the CA1 PACAP modulates the extinction of CFC and suggest that this effect relies on an interaction between PACAP and NMDA receptors.

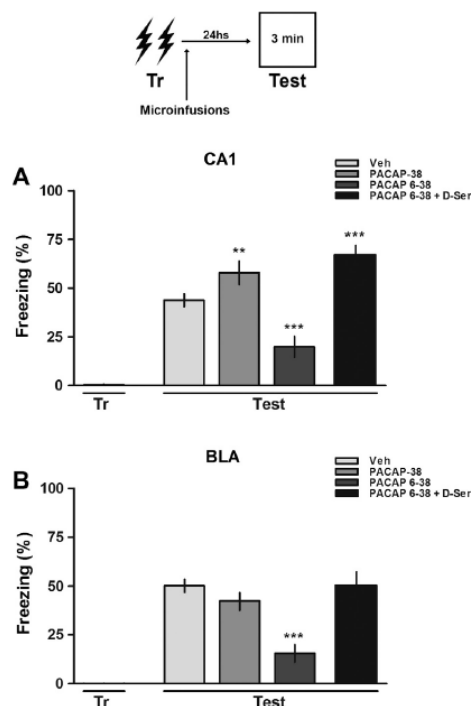


Fig. 2. The effect of PACAP in the CA1 and in the BLA on the consolidation of contextual fear conditioning. Immediately after CFC training animals received bilateral intra-CA1 (A) or intra-BLA (B) infusions of Veh, PACAP-38 (40 pg/side), PACAP 6-38 (40 pg/side) or PACAP 6-38 (40 pg/side) plus D-serine (50 μ g/side) and 24 h later they were subjected to a 3-min retention test. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of time spent freezing. * p < 0.05, *** p < 0.001 vs. control group. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; n = 11 or 12 animals per group. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocol used.

4. Discussion

PACAP has a broad spectrum of biological functions including neuromodulator, neurotransmitter, neurotrophic and neuroprotective (Brenneman, Nicol, Warren, & Bowers, 1990; Fahrenkrug, 1993; Lioudyno, Skoglösa, Takei, & Lindholm, 1998; Pincus, DiCicco-Bloom, & Black, 1990; Vaudry et al., 2000). More recently, PACAP has been suggested to also play a role in the modulation of learning and memory.

Here we show that in the CA1 region of hippocampus and in the basolateral amygdala PACAP modulates the consolidation and extinction of CFC, through an interaction with glutamatergic NMDA receptors.

PACAP and its PAC1R are highly expressed in hippocampus and amygdala (Hannibal, 2002; Hashimoto et al., 1996; Jaworski & Proctor, 2000), brain regions that are involved in both consolidation and extinction of the contextual fear conditioning (Anagnostaras, Gale, & Fanselow, 2001; Baldi & Bucherelli, 2010; de Carvalho Myskiw et al., 2013, 2014; Fiorenza et al., 2012; Fischer, Sananbenesi, Schrick, Spiess, & Radulovic, 2004; Fischer et al., 2007; Kim & Fanselow, 1992; McGaugh, 2000; Myers & Davis, 2007; Quirk & Mueller, 2008; Sananbenesi et al., 2007). In the current study we demonstrated that PACAP in the CA1 acts as a modulator in the consolidation and extinction of the CFC,

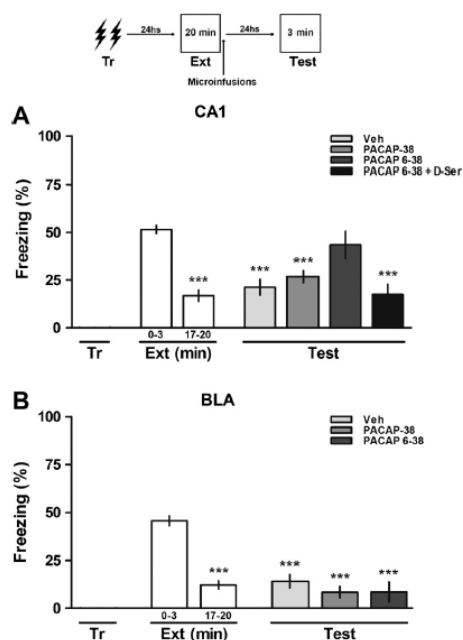


Fig. 3. The effect of PACAP in the CA1 and in the BLA on the extinction of contextual fear conditioning. Immediately after the extinction training of the CFC animals received bilateral intra-CA1 (A) or intra-BLA (B) infusions of Veh, PACAP-38 (40 pg/side), PACAP 6-38 (40 pg/side) or PACAP 6-38 (40 pg/side) plus D-serine (50 μ g/side) and 24 h later the animals were subjected to a 3-min extinction retention test. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of time spent freezing. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. the first 3 min of the extinction training. Newman-Keuls test after one-way ANOVA; $n = 11$ or 12 animals per group. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocol used.

furthermore in the BLA PACAP modulates only the consolidation of the CFC. The results fit with previous findings that mice without PAC1 receptor present deficit in the CFC and in the passive avoidance learning (Telegdy & Kokavszky, 2000).

Recently it was shown that the levels of the PAC1R mRNA (ADCYAP1R1) are increased in the amygdala 2 h after the classical fear conditioning (Hammack et al., 2009; Ressler et al., 2011). In the current study we demonstrated that PACAP in the BLA acts as a modulator in the CFC consolidation but not in the extinction. The possible explanations for this result lays on the fact that it has been reported that positive effect of PACAP in memory follows an inverted U-shaped dose–response curve, as described for many others memory enhancing drugs (Parsons & Gold, 1992).

Additionally, the results presented here suggest that the PACAP action in the CA1 on the consolidation and extinction of the CFC is mediated by glutamatergic NMDA receptors. It has been suggested that PAC1R modulates NMDA receptors activity through processes mediated by protein kinase A (PKA) (Yaka et al., 2003), protein kinase C (PKC) and Src (Macdonald et al., 2005). The three sets of signaling enzymes are known to participate in memory processes, particularly in fear-motivated tasks (see Izquierdo et al., 2006). One possible explanation of why PACAP had no effect on extinction when given into the BLA, a region clearly involved both in the original consolidation and in the extinction of CFC (Fiorenza et al., 2012) is that the signaling enzymes mentioned or the effect of PACAP thereon are activated to a different degree by both behavioral procedures; a topic that deserves further research.

The present work provides an important addition to the knowledge of modulation of consolidation and extinction of CFC. The results may support the development of new drugs that act directly on PACAP and that will help in the treatment of disorders motivated by fear like PTSD.

Acknowledgment

Work supported by Grants and fellowships from the National Research Council of Brazil (CNPq) and CAPES.

References

- Almli, L. M., Mercer, K. B., Kerley, K., Feng, H., Bradley, B., Conneely, K. N., et al. (2013). ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 162B(3), 262–272. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.32145>.
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., & Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus*, 11(1), 8–17. [http://dx.doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7](http://dx.doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7).
- Baldi, E., & Bucherelli, C. (2010). Substantia nigra, nucleus basalis magnocellularis and basolateral amygdala roles in extinction of contextual fear conditioning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(2), 199–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2010.05.007>.
- Beckett, W. S. (2002). Post-traumatic stress disorder. *The New England Journal of Medicine*, 346(19), 1495–1498 (author reply 1495–1498).
- Breneman, D. E., Nicol, T., Warren, D., & Bowers, L. M. (1990). Vasoactive intestinal peptide: A neurotrophic releasing agent and an astroglial mitogen. *Journal of Neuroscience Research*, 25(3), 386–394. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.490250316>.
- Brisicione, M. A., Jovanovic, T., & Norrholm, S. D. (2014). Conditioned fear associated phenotypes as robust, translational indices of trauma-, stressor-, and anxiety-related behaviors. *Frontiers in Psychiatry*, 5, 88. <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2014.00088>.
- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., & Quirk, G. J. (2007). Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*, 53(6), 871–880. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.021>.
- Costa, L., Santangelo, F., Li Volsi, G., & Ciranna, L. (2009). Modulation of AMPA receptor-mediated ion current by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in CA1 pyramidal neurons from rat hippocampus. *Hippocampus*, 19(1), 99–109. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20488>.
- De Carvalho Myskiw, J., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), 1071–1076. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1220875110>.
- De Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2014). Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(12), 4572–4577. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1400423111>.
- Fahrenkrug, J. (1993). Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacology & Toxicology*, 72(6), 354–363.
- Fahrenkrug, J., & Hannibal, J. (2004). Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides*, 25(3), 393–401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.01.010>.
- 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(1), 210–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.015>.
- Fischer, A., Radulovic, M., Schrick, C., Sananbenesi, F., Godovac-Zimmermann, J., & Radulovic, J. (2007). Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(1), 149–158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2006.08.003>.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Schrick, C., Spiess, J., & Radulovic, J. (2004). Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *The Journal of Neuroscience. The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(8), 1962–1966. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5112-03.2004>.
- Hammack, S. E., Cheung, J., Rhodes, K. M., Schutz, K. C., Falls, W. A., Braas, K. M., et al. (2009). Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): Roles for PACAP in anxiety-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 34(6), 833–843. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.12.013>.
- Hannibal, J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 453(4), 389–417. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10418>.

- Hannibal, J., Møller, M., Ottersen, O. P., & Fahrenkrug, J. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *The Journal of Comparative Neurology*, 418(2), 147–155.
- Harmar, A. J., Arimura, A., Gözes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J. R., et al. (1998). International union of pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 265–270.
- Hashimoto, H., Nogi, H., Mori, K., Ohishi, H., Shigemoto, R., Yamamoto, K., et al. (1996). Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 371(4), 567–577. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960805\)371:4<567::AID-CNE6-3.0.CO;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960805)371:4<567::AID-CNE6-3.0.CO;2-2).
- Izquierdo, I., Bevilacqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29(9), 496–505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005>.
- Izquierdo, I., Quilfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., et al. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 9(4), 786–793.
- Jaworski, D. M., & Proctor, M. D. (2000). Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC1 receptor mRNA expression in the rat central nervous system. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 120(1), 27–39.
- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5057), 675–677.
- Laurent, V., & Westbrook, R. F. (2008). Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* (pp. 657–666). Vol. 15(9), doi: 10.1101/lm.1080108.
- Lee, E. H., & Seo, S. R. (2014). Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB Reports*, 47(7), 369–375.
- Lioudyno, M., Skoglóska, Y., Takei, N., & Lindholm, D. (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 51(2), 243–256.
- Macdonald, D. S., Weerapura, M., Beazely, M. A., Martin, L., Czerwinski, W., Roder, J. C., et al. (2005). Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G alpha q, protein kinase C, and activation of Src. *The Journal of Neuroscience. The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(49), 11374–11384. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3871-05.2005>.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory – A century of consolidation. *Science*, 287, 248–251.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., et al. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic peptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164(1), 567–574.
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R. R., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., et al. (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170(2), 643–648.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120–150. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001939>.
- Myskiw, J. C., Izquierdo, I., & Furini, C. R. G. (2014). Modulation of the extinction of fear learning. *Brain Research Bulletin*, 105, 61–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.04.006>.
- Parsons, M. W., & Gold, P. E. (1992). Glucose enhancement of memory in elderly humans: An inverted-U dose-response curve. *Neurobiology of Aging*, 13(3), 401–404.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pincus, D. W., DiCicco-Bloom, E. M., & Black, I. B. (1990). Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature*, 343(6258), 564–567. <http://dx.doi.org/10.1038/343564a0>.
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56–72. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301555>.
- Resch, J. M., Albano, R., Liu, X., Hjelmhaug, J., Lobner, D., Baker, D. A., et al. (2014). Augmented cystine-glutamate exchange by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide signaling via the VPAC1 receptor. *Synapse (New York, N.Y.)*. <http://dx.doi.org/10.1002/syn.21772>.
- Ressler, K. J., Mercer, K. B., Bradley, B., Jovanovic, T., Mahan, A., Kerley, K., et al. (2011). Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*, 470(7335), 492–497. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09856>.
- Sacchetti, B., Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Roberto, M., Tassoni, G., et al. (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 76(1), 1–6. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.2001.4014>.
- Sananbenesi, F., Fischer, A., Wang, X., Schrick, C., Neve, R., Radulovic, J., et al. (2007). A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. *Nature Neuroscience*, 10(8), 1012–1019. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1943>.
- Sauvage, M., Brabet, P., Holsboer, F., Bockaert, J., & Steckler, T. (2000). Mild deficits in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor type 1 (PAC1) performing on memory tasks. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 84(1–2), 79–89.
- Sher, L., & Vilems, A. (2010). *Neurobiology of post-traumatic stress disorder*. New York: Nova Biomedical.
- Szapiro, G., Vianna, M. R. M., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, 13(1), 53–58. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.10043>.
- Telegdy, G., & Kokavszky, K. (2000). The action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on passive avoidance learning. The role of transmitters. *Brain Research*, 874(2), 194–199.
- Uddin, M., Chang, S.-C., Zhang, C., Ressler, K., Mercer, K. B., Galea, S., et al. (2013). Adcyap1r1 genotype, posttraumatic stress disorder, and depression among women exposed to childhood maltreatment. *Depression and Anxiety*, 30(3), 251–258. <http://dx.doi.org/10.1002/da.22037>.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., et al. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological Reviews*, 61(3), 283–357. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.109.001370>.
- Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., & Vaudry, H. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From structure to functions. *Pharmacological Reviews*, 52(2), 269–324.
- Wang, L., Cao, C., Wang, R., Qing, Y., Zhang, J., & Zhang, X. Y. (2013). PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype is associated with PTSD's emotional numbing symptoms in Chinese earthquake survivors. *Journal of Affective Disorders*, 150(1), 156–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2013.01.010>.
- Yaka, R., He, D.-Y., Phamluong, K., & Ron, D. (2003). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP(1-38)) enhances N-methyl-D-aspartate receptor function and brain-derived neurotrophic factor expression via RACK1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9630–9638. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209141200>.