



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido para
avaliação no Edital: 04/2022

Título do projeto: O papel de receptores glicocorticóides do córtex pré-límbico na alocação do engrama da memória contextual recente

Palavras-chave do projeto: córtex pré-límbico, hipocampo, amígdala, C-FOS, memória contextual, consolidação sistêmica

Área do conhecimento do projeto: Neurociência.

Sumário

Resumo	2
1. Introdução e Justificativa	5
2. Resultados Anteriores	8
3. Objetivos	12
4. Metodologia	12
5. Viabilidade	14
6. Cronograma de atividades	14
Referências	15

Resumo

Memórias episódicas são memórias declarativas, ou seja, memórias de longo-prazo que podem ser acessadas conscientemente e que possuem informações específicas sobre o espaço e tempo (contexto) do evento que gerou sua aquisição. Estas memórias são moduladas pelo hormônio adrenal Corticosterona (CORT). Estudos sugerem que os receptores de glicocorticóides do tipo II, conhecido como GRs, estão relacionados com a consolidação sináptica e estão presentes em grande densidade no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, áreas relacionadas com a aquisição, consolidação e evocação da memória. Além disso, estudos recentes sugerem a participação de uma região específica neocortical, denominada Córtex Pré-Límbico (PrL), na liberação de CORT e na retroalimentação negativa, de modo que PrL funciona inibindo a atividade de regiões que ativam a resposta do estresse, além de sugerir que esta área também se relaciona com processos de memória. O presente projeto tem o objetivo de identificar e analisar os efeitos do bloqueio de GRs no PrL, imediatamente após o treino da tarefa de condicionamento de medo ao contexto (CMC), sobre a ativação de regiões hipocampais e amígdalares durante a evocação da memória contextual recente. Para isso, serão utilizados cortes de encéfalos retirados de animais que receberam infusões pós-treino de um antagonista GR diretamente no PrL e foram testados após 2 dias para verificar tanto a força como a especificidade da memória contextual recente. Nestes cortes serão realizados ensaios de imunohistoquímica, com a finalidade de identificar a proteína FOS, indicativa de ativação neural, nas áreas de interesse. Os resultados deste projeto poderão auxiliar na compreensão das bases neuroanatômicas da memória emocional recente na teoria de consolidação sistêmica.

1. Introdução e Justificativa

Situações de aprendizado induzem diversas mudanças em neurônios e sinapses presentes em várias regiões encefálicas que, posteriormente, permitem a evocação da memória aprendida (LABAR; CABEZA, 2006; MOSCOVITCH et al., 2016; SQUIRE; WIXTED, 2011; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2011). De um ponto de vista molecular, estas mudanças são normalmente chamadas de consolidação sináptica da memória. Já as alterações ocorridas nos circuitos neuronais envolvidos com a codificação, armazenamento e evocação das memórias são chamadas de consolidação sistêmica da memória (MOSCOVITCH et al., 2016). Memórias contextuais são de longo-prazo e precisam passar pelo processo de consolidação para serem evocadas em algum momento futuro (ALVAREZ; SQUIRE, 1994; WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010).

Uma característica de memórias contextuais é que elas tendem a perder especificidade à medida que amadurecem (WANG et al., 2009; WILTGEN; SILVA, 2007). Com o passar do tempo, elas tornam-se mais esquemáticas e menos vívidas (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; MOSCOVITCH et al., 2016; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2011). A perda de especificidade acaba gerando erros durante a evocação da memória, resultando em respostas comportamentais do indivíduo quando exposto a contextos diferentes do qual a memória foi adquirida, fenômeno conhecido como generalização da memória (BIEDENKAPP; RUDY, 2007; WILTGEN; SILVA, 2007; WINOCUR; MOSCOVITCH; SEKERES, 2007). A tarefa de condicionamento de medo ao contexto é comumente aceita como um bom modelo de investigação das memórias contextuais, e apresenta ainda a vantagem de permitir a análise da especificidade dessas memórias em conjunto com intervenções farmacológicas (BUENO et al., 2017; REIS et al., 2016). Nos dias de teste, os animais treinados são reexpostos ao contexto de treino e a um novo contexto que apresenta uma pequena “dica” do contexto de treino (WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010). A avaliação da precisão ou especificidade da memória é realizada pela comparação entre as respostas comportamentais dos animais observadas nos diferentes contextos. Essa capacidade de discriminação entre contextos nos fornece uma medida direta de especificidade do traço de memória (WANG et al., 2009) e, portanto, nos permite investigar o quão precisas são as memórias contextuais. Pode-se, inclusive, realizar o teste em diferentes períodos de tempo com relação ao treino, permitindo uma avaliação experimental da consolidação sistêmica da memória.

Estudos utilizando lesões, inativação farmacológica e análises imunohistológicas em áreas encefálicas específicas, em conjunto com testes comportamentais, verificaram que memórias recentes são dependentes do hipocampo durante a evocação e que, com o tempo, tornam-se também dependentes do neocórtex. Estes dois sistemas de memória (hipocampal e neocortical) interagem de maneira dinâmica durante a evocação, um ou outro sendo o dominante de acordo com as circunstâncias presentes (FRANKLAND, 2004; WANG et al., 2009; WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010). Memórias mais específicas ao contexto parecem ser mais dependentes do hipocampo, enquanto que a evocação de uma memória generalizada está tradicionalmente ligada ao sistema neocortical (FRANKLAND, 2004; WANG et al., 2009; WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010).

Outra característica bastante evidenciada das memórias contextuais é que experiências emocionalmente carregadas são mais lembradas do que eventos neutros. Estudos em humanos e animais indicam que os hormônios adrenais – adrenalina e glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona – CORT – em ratos) – liberados durante um evento emocional ou alertante, apresentam um papel modulatório chave na consolidação de memórias contextuais (DE QUERVAIN et al., 2009; MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002; SANDI; PINELO-NAVA, 2007). Há dois sistemas principais de resposta ao estresse: o eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA), e o sistema nervoso simpático (SNS). A ativação do eixo HPA resulta na liberação de glicocorticóides do córtex da glândula adrenal, enquanto que a ativação do SNS resulta na liberação de catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina (NA), da medula da glândula adrenal. Estes hormônios, também chamados de hormônios do estresse, possuem várias funções fisiológicas periféricas que preparam o animal para reações de fuga ou luta, assim como funções centrais relacionados com o humor e a consolidação de memórias (OITZL et al 1997; SANDI, 1998; SCHWABE et al., 2012; (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). No que diz respeito aos efeitos centrais desses hormônios, os glicocorticóides conseguem atravessar a barreira hematoencefálica para exercer seus efeitos no encéfalo, enquanto que a adrenalina age em vias centrais através da ação em receptores periféricos, uma vez que não atravessa a barreira hematoencefálica (WEIL-MALHERBE; AXELROD; TOMCHICK, 1959).

Esta modulação exercida pelos hormônios adrenais é dependente de variáveis como a intensidade do treino e a concentração plasmática dos hormônios durante a janela de consolidação sináptica da memória (BALDI; BUCHERELLI, 2005; CORDERO; MERINO;

SANDI, 1998; LUX et al., 2016; ROOZENDAAL; MIRONE, 2020; SALEHI; CORDERO; SANDI, 2010; SANDI; LOSCERTALES; GUAZA, 1997; SANDI; ROSE, 1997). Em tarefas complexas, o aumento da força ou intensidade do evento emocional gera memórias mais fortes até um ponto de inflexão a partir do qual o comportamento do animal tem um desempenho pior ou com mais falhas (BALDI; BUCHERELLI, 2005; MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2014). Logo, o desempenho do indivíduo ou animal segue uma curva em U invertido, com um pico em eventos de intensidades moderadas, mas com baixo desempenho em eventos de intensidades baixas ou altas demais (SANDI, 2011).

A intensidade do treino modula a liberação de CORT plasmática em animais e a subsequente força da memória espacial e contextual (CORDERO; MERINO; SANDI, 1998; SANDI; LOSCERTALES; GUAZA, 1997; SANDI; ROSE, 1997). A injeção de CORT exógena também produz melhora no desempenho dos animais durante o teste de condicionamento de medo ao contexto quando estes são treinados com baixas intensidades, enquanto que a mesma dose de CORT exógena induz uma piora no desempenho dos animais treinados com altas intensidades de choque (KAOUANE et al., 2012; SALEHI; CORDERO; SANDI, 2010). Da mesma forma, em uma única intensidade de treino, crescentes doses de CORT injetadas pós-treino induzem uma resposta comportamental que segue a curva em U invertido (ABRARI et al., 2009; PUGH et al., 1997).

Esta relação em U invertido entre os GCs e o desempenho em testes de memória abriu espaço para a investigação dos mecanismos celulares envolvidos na modulação da consolidação sináptica e sistêmica da memória. Diversos estudos sugerem que ambos os receptores glicocorticóides, tanto do tipo I (receptores mineralocorticóides, MRs, de maior afinidade com a CORT) como do tipo II (receptores glicocorticóides, GRs, de menor afinidade com a CORT), estão relacionados com a formação da memória espacial e contextual, porém com papéis diferentes neste processo (FINSTERWALD; ALBERINI, 2014). Enquanto que os MRs estão relacionados com a fase inicial da codificação da memória e a resposta à novidade, os GRs estão relacionados com a sua consolidação (DE KLOET; OITZL; JOËLS, 1999; SANDI; ROSE, 1994; TER HORST et al., 2012). Todos estes receptores estão presentes em grande densidade no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, áreas relacionadas com a aquisição, consolidação e evocação da memória (PATEL et al., 2000). Além disso, sua ativação gera padrões eletrofisiológicos diferenciados em cada região, alterando a consolidação sináptica da memória nas diferentes áreas (HU et al., 2007; JOËLS;

KRUGERS; KARST, 2014; REVEST et al., 2010). Como estes receptores parecem modular a força da memória de medo ao contexto, é possível que também estejam relacionados com a consolidação de memórias mais precisas ou específicas.

Estudos com o CMC verificaram que roedores apresentam maior discriminação entre o contexto de treino e o novo contexto nos primeiros dias após o treino e, entre 28 a 36 dias, começam a apresentar altas porcentagens de congelamento em ambos os contextos (PEDRAZA et al., 2016; POULOS et al., 2016; WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010). Os GCs atuam junto com o sistema noradrenérgico na modulação da força da memória, e desta forma é possível que a CORT também module a taxa de consolidação sistêmica (ATUCHA et al., 2017a; DE QUERVAIN et al., 2009; PEDRAZA et al., 2016). Recentemente, Roozendaal e Mirone (2020) mostraram evidências de que o tratamento pós-treino com CORT em uma versão modificada da esquia inibitória promove generalização da memória contextual recente (ROOZENDAAL; MIRONE, 2020).

Em nosso laboratório, verificamos que a injeção sistêmica de diferentes doses de CORT, imediatamente após o treino da tarefa de CMC discriminativa de *trial* único, não melhora o desempenho dos animais nos testes de memória recente ou remota (BUENO et al., 2017). Em outro estudo mais recente, verificamos que treinos mais intensos induzem uma maior liberação de CORT em ratos em comparação aos animais treinados sem choque. Dentre estes animais que foram treinados com uma intensidade de choque de 1,0 mA, aqueles testados 2 dias depois do treino mostraram uma clara discriminação contextual. Por outro lado, outro grupo de animais treinados com esta intensidade de choque, mas testados 28 dias depois do treino apresentaram memória generalizada. Em contraste, outros animais, treinados com choques fracos de 0,3 mA, não liberaram CORT de maneira significativamente diferente do grupo sem choque. Além disso, os grupos de animais treinados com choques de 0,3 mA e testados 28 dias depois do treino apresentaram manutenção da discriminação contextual (DOS SANTOS CORRÊA et al., 2019). Esta dupla dissociação, ou seja, inversão entre os fenômenos de discriminação e generalização de acordo com a intensidade de choque e ponto no tempo na tarefa de CMC, é um resultado original e não se conhece o papel desempenhado pelos GRs ou β ARs neste fenômeno. O resultado observado apresenta uma relação entre a CORT e a especificidade da memória, mas não traz informação sobre os receptores envolvidos ou mesmo sobre a possibilidade de relação causal. Desta forma, é relevante investigar os efeitos da ativação e do bloqueio seletivo destes receptores durante a janela de

consolidação sináptica sobre a força e especificidade da memória de medo condicionado ao contexto ao longo do tempo, temática do projeto cujo presente projeto faz parte.

Alinhado com a investigação da força e especificidade da memória com os fenômenos de discriminação e generalização, avaliados pelas tarefas comportamentais de CMC, se faz necessário o estudo de como as regiões neocorticais, como no caso do córtex pré-límbico (PrL), modulam as regiões hipocampais durante o processo de consolidação da memória e como isso altera a evocação da memória. Tradicionalmente, a hipótese padrão da consolidação sistêmica da memória postula que as memórias contextuais são inicialmente consolidadas no hipocampo e, com o passar do tempo, são transferidas para regiões neocorticais (especialmente regiões parahipocampais). Esta transferência explicaria a perda de detalhes contextuais ao longo do tempo e o fenômeno de generalização do medo dependente do tempo (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). No entanto, diversas evidências surgiram desde então que confrontam esse postulado, indicando ou que o hipocampo não esteja desvinculado da evocação de memórias remotas (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020) ou que regiões neocorticais podem ser recrutadas já durante a evocação recente (QUILLFELDT, 2019). Dentre as regiões neocorticais de interesse, foram criadas diversas hipóteses que investigavam as regiões como Córtex Cingulado Anterior (CCA) e o Córtex Pré-Límbico (PrL) estariam relacionadas com a na hipótese padrão ou na tentativa de criar uma hipótese nova. Tradicionalmente, todas estas tentativas colocam o CCA em um papel central na evocação de memórias remotas e com o PrL ocupando um papel voltado na expressão adequada da resposta de medo (DIXSAUT; GRÄFF, 2021). No entanto, evidências recentes indicam um papel chave desta região na aquisição, consolidação e evocação de memórias de medo, especialmente na sua especificidade (DIXSAUT; GRÄFF, 2021; MOSCARELLO; MAREN, 2018).

Com o advento da investigação por ativação e inativação optogenética, demonstrou-se que células de engrama são alocadas no PrL durante a aquisição do CMC mas não em um protocolo de choque imediato, e estas células são reativadas durante a evocação recente (ZELIKOWSKY et al., 2014). Além disso, Kitamura e colegas demonstraram que a reativação optogenética de células de engrama no PrL induz congelamento em um novo contexto tanto em intervalos recentes como remotos, mas este engrama só é naturalmente engajado durante a evocação remota. Por fim, a inibição deste engrama prejudica somente o desempenho dos animais na evocação remota (KITAMURA et al., 2017). Em um estudo posterior, Matos e colegas (2019) verificaram que o engrama criado no PrL marcado por

TRAP2 (técnica que utiliza tamoxifeno para marcar os neurônios que expressaram FOS recentemente, e então estes mesmos neurônios começam a expressar canais inibitórios que são ativados por N-óxido de Clozapina, CNO) após um treino um fraco de CMC, quando inativado no teste de memória remota leva a um prejuízo na expressão do congelamento no contexto de treino. Por outro lado, quando o engrama é marcado após uma curta exploração de um contexto diferente ao de treino 3 dias antes do treino de CMC, o tratamento com CNO não causa o mesmo prejuízo no comportamento. Da mesma forma, a inibição remota do engrama marcado após um treino de CMC forte também não causa prejuízo no comportamento. Os autores então sugerem que o engrama criado no PrL torna-se engajado de maneira contexto-dependente somente quando a intensidade de treino é fraca e durante testes de memória remota (MATOS et al., 2019), sugerindo um papel do engrama no PrL na especificidade da memória de medo ao contexto.

Para avaliarmos o engrama no PrL e como esta região modula regiões hipocampais e amígdalares no processo de consolidação sistêmica, podemos investigar ativação neuronal dessas regiões através da presença do produto do gene de expressão imediata FOS após uma tarefa de CMC (SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019; WHEELER et al., 2013, BULLITT, 1990). Para isso, neste presente projeto, pretende-se estudar a ativação das regiões hipocampo dorsal (HPCd) e ventral (HPCv), além dos núcleos amígdalares basolateral (BLA) e central (CeA), a partir da contagem de células imunorreativas para a proteína C-FOS de animais controle e animais que receberam microinfusões bilaterais de mifepristona (antagonista GR) diretamente no PrL após o treino de condicionamento de medo ao contexto, e foram testados 2 dias após para avaliar tanto a força como a especificidade da memória contextual recente.

2. Resultados Anteriores

A etapa comportamental do presente projeto já foi realizada e teve como um dos objetivos principais investigar como o bloqueio dos GRs modula a consolidação da memória contextual em treinos de intensidade moderada na tarefa de CMC. Para isso, foi quantificado a discriminação entre o contexto do treino e o novo contexto em testes de memória recente em ratos que receberam infusão pós-treino de mifepristona (MIF) no córtex pré-límbico (PL).

Para isso foram utilizados ratos Wistar, machos, com 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Farmacologia da UNIFESP (INFAR). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e período claro/escuro de 12/12 horas (período claro começando às 7:00h) e alimento e água

“ad libitum”. Todos os procedimentos descritos serão realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins científicos e didáticos (DBCA) e com a aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA-UFABC 6932250621).

O treino e teste de CMC foram conduzidos em duas caixas automatizadas idênticas de condicionamento de medo (Med Associates, Inc., St. Albans, VT), conectadas a componentes geradores de estímulos de choque e som e, também, a uma interface computadorizada que permite a gravação de vídeo, análise e mensuração em tempo real do comportamento de congelamento e atividade locomotora do rato (Video Freeze, Versão 1.12.0.0, Med-Associates). As caixas de condicionamento (32 cm de largura, 25 cm de altura e 25 cm de profundidade) possuem paredes superior e frontal de policarbonato transparente e, ao fundo e nas laterais, de acrílico branco. Cada caixa é mantida dentro de uma caixa de isolamento acústico (64 cm × 76 cm × 42 cm), iluminada por uma fonte de luz fluorescente, que fornece um espectro de luz branca (450 – 650 nm) e de infravermelho (940 nm), invisível ao rato, possibilitando a filmagem mesmo sem luz visível.

Para verificar a discriminação de memória, foram utilizados dois contextos distintos. O contexto A foi caracterizado pela caixa em sua configuração retangular original, conforme descrito acima, com um piso de grade de aço inoxidável (20 hastes de 4,8 mm de diâmetro cada), pelas quais os animais receberam o choque nas patas. A luz da caixa permaneceu acesa, a limpeza antes do treino e teste de cada animal foi feita com álcool a 10%. O contexto B foi modificado com as seguintes características: a caixa recebeu uma parede de acrílico flexível e branca que a deixou com um formato semicircular. A luz permaneceu apagada e a limpeza antes do treino e teste de cada animal foi feita com solução de vinagre a 5%. O piso possuía grades diferenciadas das do contexto A (10 hastes dispostas em plano horizontal, de 4,8 mm e 9,5 mm de diâmetro e arrançadas alternadamente, totalizando 20 hastes). Esse arranjo possibilitou uma grande diferença no contexto, porém com uma “dica” (o piso gradeado), que pode dificultar o processo de discriminação.

A cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas-guia foi realizada conforme descrito anteriormente (DE PAIVA et al., 2021; FORNARI et al., 2012). Brevemente, os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina e xilazina e colocados no aparelho estereotáxico. O crânio foi exposto e pequenos orifícios foram feitos em cada hemisfério para a implantação bilateral de cânulas-guia no córtex pré-límbico (PrL), utilizando as seguintes coordenadas (de acordo com o atlas de Paxinos & Watson, 2007): 3,2 mm anterior ao bregma; 0,7 mm lateral, com relação à linha média; e 2,0 mm ventral à

superfície do crânio (PAXINOS; WATSON, 2007). Posteriormente as cânulas-guia foram fixadas com cimento dental. Foi colocado um mandril em cada cânula para evitar a obstrução das mesmas. Após a cirurgia os animais receberam uma injeção s.c. de 3mL de solução salina estéril para hidratação, antisedan (0,25 mg/kg, s.c.), meloxicam (2 mg/kg, s.c.) para ação antiinflamatória e rifamicina spray nas bordas do capacete, e foram colocados em caixas individuais, aquecidas por uma manta aquecedora, para se recuperarem da anestesia. O período mínimo de recuperação da cirurgia, antes do início dos testes comportamentais, foi de 7 dias para todos os animais. Após a recuperação da cirurgia, e antes do treino, os animais foram manipulados pelo experimentador por 3 dias na sala adjunta à sala de condicionamento, para se acostumarem com este e com o procedimento de infusão e injeção. No dia do treino, todos os animais foram levados do biotério para a sala adjunta em suas caixas de grupo, onde ficaram por pelo menos uma hora antes do início dos treinos de condicionamento. Para o treino de CMC, cada animal foi colocado em uma caixa individual e levado para a sala de condicionamento. Em seguida, cada animal foi colocado no contexto A e, após 2 minutos, recebeu três choques nas patas (estímulo incondicionado) de 1s e de uma mesma intensidade (0,6 mA). O intervalo entre os choques foi de trinta segundos. Um minuto após o último choque, o rato foi retirado da câmara de condicionamento. Dessa maneira, cada sessão de condicionamento durou em torno de 240s. Imediatamente após o treino, os animais receberam a infusão da MIF (10ng/0,5ml) ou veículo estéril no PrL. Um grupo controle de animais (*'home-cage'*) não passou pela cirurgia, manipulação pelo experimentador por 3 dias e nem pelo treino de CMC, mas passou pelas coletas de sangue da mesma forma que os grupos treinados.

Os testes foram realizados 2 dias após o treino, e consistiram de duas fases. Na primeira fase do teste, cada animal foi transportado em uma caixa de madeira e colocado em um novo contexto (contexto B), durante 4 minutos (240s). Nenhum choque foi liberado durante o teste. Após o final desta primeira fase, o animal foi devolvido à sua gaiola individual (a mesma do treino) e um minuto depois foi colocado no contexto de treino (contexto A – ver desenho experimental na figura 1). Ao final de 4 minutos o animal foi retirado da caixa e devolvido à sua gaiola moradia. O comportamento de congelamento dos animais foi medido automaticamente pelo software VideoFreeze durante toda a duração do teste, em ambos os contextos.

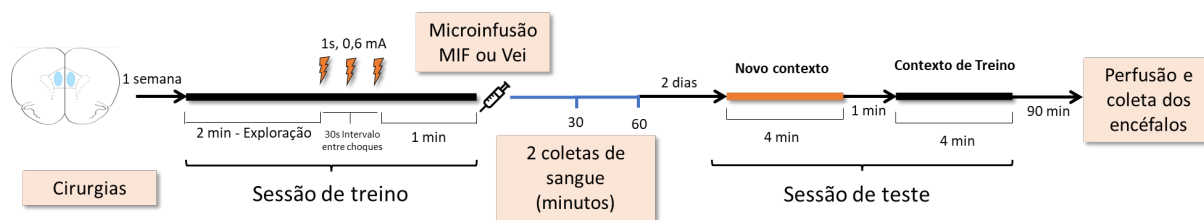


Figura 1. Esquema do delineamento experimental da etapa comportamental já realizada anteriormente para execução deste presente projeto.

Para a coleta dos encéfalos, noventa minutos após o final da segunda fase do teste de CMC, os animais foram profundamente anestesiados com uma overdose de solução de uretana a 25% e a seguir perfundidos intracardiacamente com solução de paraformaldeído a 4%, através de uma bomba peristáltica (Cole Parmer). Os encéfalos foram mantidos resfriados a 4°C dentro da cabeça do animal após a perfusão por até 5 horas, e então removidos e transferidos para uma solução de sacarose a 20% em tampão fosfato de potássio (KPBS) a 0,02 M até sua completa desidratação. Quando todos os encéfalos estavam desidratados, eles foram congelados a -80 °C e armazenados até a histologia.

Foram feitos cortes coronais seriados nos encéfalos previamente coletados, de 40 µm de espessura, utilizando um micrótomo (Leica, CM1850 UV). Para a verificação da localização das cânulas-guia, os cortes da região onde as cânulas foram implantadas (PrL) serão submetidos à técnica de coloração de Nissl e relatados futuramente. Os cortes seriados das outras regiões foram mantidos no congelador a -20° C para posterior processamento imuno-histoquímico neste presente projeto.

Os resultados obtidos durante o teste de memória recente e remota de CMC podem ser vistos na figura 2. Apesar de o índice de movimentação não ter indicado diferença entre os grupos (Figura 2B), existe uma tendência de diferença significativa entre o tempo em congelamento no novo contexto e no contexto de treino dentre os ratos do grupo VEI, enquanto que essa diferença parece não existir no grupo MIF (Figura 2A). A ANOVA de medidas repetidas do tempo em congelamento mostra valor próximo da significância na interação Contexto * Tratamento e com tamanho de efeito moderado ($F(1;17) = 3,85$; $p = 0,066$; $\eta^2_G = 0,076$), mas sem resultado significativo nos fatores Contexto ($F(1;17) = 1,90$; $p = 0,186$; $\eta^2_G = 0,039$) e Tratamento ($F(1;17) < 0,001$; $p = 0,982$; $\eta^2_G = 0$). Os testes post hoc desprotegidos e não corrigidos revelaram uma tendência de diferença entre o congelamento no novo contexto e o contexto de treino somente no grupo VEI (Diferença entre médias = $-35,11 \pm 16,7$ s; $t(16) = 2,101$; $p = 0,051$), enquanto todas outras comparações não são

significativas ($p > 0,249$). Por outro lado, a ANOVA de medidas repetidas do índice de movimentação não indicou diferença significativa em nenhum dos fatores ou interação durante a sessão de teste ($p > 0,130$).

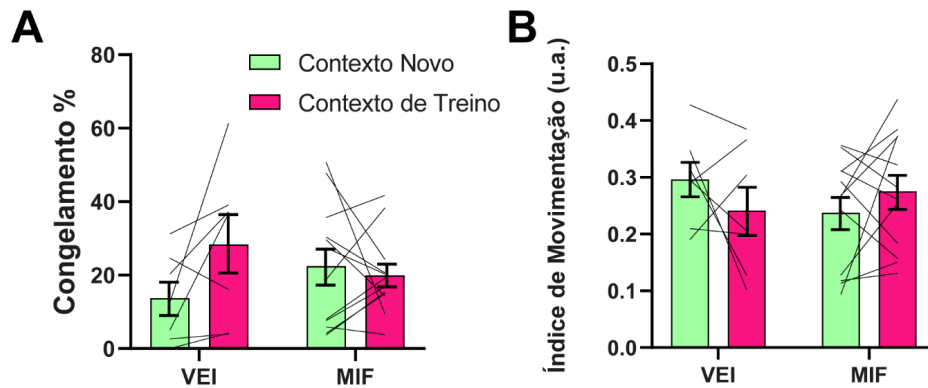


Figura 2: O bloqueio dos GRs no PrL durante a consolidação do CMC parece diminuir a especificidade contextual do traço de memória. (A) média da porcentagem do tempo em congelamento dos animais dos grupos tratados com veículo (VEI) ou mifepristona (MIF) e (B) média do índice de movimentação dos mesmos durante os testes de evocação no contexto novo e de treino.

Dessa forma, com a etapa comportamental já concluída, este projeto se faz necessário para a análise das regiões que podem estar sendo moduladas pelo bloqueio de receptores GRs no córtex pré-límbico, durante o processo de consolidação da memória. Assim, podemos analisar a atividade neuronal de regiões hipocampus e amígdalas durante o período de evocação, momento de coleta dos encéfalos, através da avaliação por imunohistoquímica.

3. Objetivos

O objetivo do presente projeto será verificar se o bloqueio de receptores GR no córtex pré-límbico, imediatamente após o treino, altera o engajamento do hipocampo (dorsal e ventral) e dos núcleos amígdalas (núcleo basolateral e central da amígdala) na evocação da memória contextual recente. Para isso, o produto do gene de expressão imediata c-fos (FOS) será avaliado por imunohistoquímica, em animais que receberam infusões de mifepristona ou veículo imediatamente após o treino da tarefa de CMC e foram testados após 2 dias.

4. Metodologia

4.1. Material biológico

Para este estudo serão utilizados os encéfalos dos animais descritos acima (Item 2 do presente projeto), os quais foram seccionados em cortes coronais seriados, de 40 μ m de

espessura, utilizando um micrótomo de congelamento (Leitz). Os cortes seriados estão mantidos no congelador a -20°C e serão usados para processamento imuno-histoquímico.

4.2. Imunohistoquímica

Os cortes serão devidamente preparados para a técnica de imunohistoquímica, utilizando o anticorpo primário anti-Fos (1:10.000). O anticorpo primário será localizado utilizando-se uma variação do sistema formado pelo complexo avidina-biotina (Kit ABC, Elite Vector). Após incubação com o anticorpo primário, os cortes serão incubados em uma solução contendo um anticorpo biotinilado anti-coelho obtido em cabra (Vector), numa diluição de 1:200 por 90 minutos, à temperatura ambiente, e a seguir colocados em uma solução contendo o composto avidina-biotina-HRP numa diluição de 1:200 por 90 minutos. O complexo peroxidase será visualizado usando como cromógeno a 3, 3' tetracloro de diaminobenzidina (Sigma) e o produto da reação da peroxidase será visualizado utilizando o procedimento da glicose oxidase. A contagem das células imunorreativas será realizada nas seguintes áreas: formação hipocampal (porções dorsal e ventral) e núcleos amigdalares (basolateral e central). Para delineamento citoarquitetônico destas regiões, os cortes serão comparados com secções adjacentes, previamente submetidas à coloração pelo método de tionina. Será utilizado o programa de análise de imagem Image-Pro Plus (versão 4.5.1 for Windows, MediaCybernetics), para contar o número de células imunorreativas presentes. A partir dessa contagem será obtida a densidade de células imunorreativas às proteínas de interesse (quantidade de células por mm^2) de cada região previamente determinada.

4.3 Contagem das células marcadas

A contagem das células imunorreativas será realizada nas áreas referentes ao hipocampo dorsal e ventral e amígdala central e basolateral. Para delineamento citoarquitetônico destas regiões, os cortes serão comparados com seções adjuntas, previamente submetidas à coloração pelo método de tionina. Será utilizado o programa de análise de imagem Image J (1.8.0.112), para contar o número de células imunorreativas presentes. A partir dessa contagem será obtida a densidade de células imunorreativas às proteínas de interesse (quantidade de células por mm^2).

4.4. Análise Estatística

A quantidade de FOS será expressa como a média dos valores normalizados pela atividade do grupo *home cage* \pm E.P.M. As médias de FOS para cada região analisada serão normalizadas pelo *home cage* e serão comparadas através do teste t para amostras independentes (veículo x mifepristona). Para todas as análises um valor de p menor ou igual a 0,05 será considerado significativo.

5. Viabilidade

Como descrito anteriormente, este projeto faz parte de um projeto maior do grupo de pesquisa do orientador, financiado pela Fapesp (Processo # 2017/24012-9) colocar projeto do moisés. A UFABC dispõe dos equipamentos necessários para a realização dos ensaios de imunohistoquímica e para a análise das células marcadas.

6. Cronograma de atividades

Atividades	Quadrimestres					
	2022.3		2023.1		2023.2	
	Set - Out	Nov - Dez	Jan - Mar	Abr - Mai	Jun - Jul	Ago - Set
Treino de Ensaios Imunohistoquímicos	x					
Ensaios Imunohistoquímicos		x	x			
Análise no microscópio e fotografias das regiões			x	x		
Contagem de células C-FOS positivas				x	x	
Análises estatísticas					x	x
Relatórios			x*			x**

x*: Relatório Parcial até 31 de março de 2023

x**: Relatório Final até 30 de setembro de 2023

Referências Bibliográficas

- ABRARI, K. et al. Post-training administration of corticosterone enhances consolidation of contextual fear memory and hippocampal long-term potentiation in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, n. 3, p. 260–265, 2009.
- ALVAREZ, P.; SQUIRE, L. R. Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 15, p. 7041–5, 1994.
- ATUCHA, E. et al. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala maintains hippocampus-dependent accuracy of remote memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201710819, 2017a.
- ATUCHA, E. et al. Recognition memory: Cellular evidence of a massive contribution of the LEC to familiarity and a lack of involvement of the hippocampal subfields CA1 and CA3. **Hippocampus**, v. 27, n. 10, p. 1083–1092, 2017b.
- ATUCHA, E.; ROOZENDAAL, B. The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 9, n. March, p. 60, 2015.
- BALDI, E.; BUCHERELLI, C. The Inverted “U-Shaped” Dose-Effect Relationships in Learning and Memory: Modulation of Arousal and Consolidation. **Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine**, v. 3, n. 1, p. nonlin.003.01.0, jan. 2005.
- BARBOSA NETO, J. B. et al. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 518–526, jan. 2012.
- BARSEGYAN, A. et al. Glucocorticoid enhancement of recognition memory via basolateral amygdala-driven facilitation of prelimbic cortex interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 14, p. 7077–7082, 2019.
- BIEDENKAPP, J. C.; RUDY, J. W. Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 3, p. 200–3, 2007.
- BUENO, A. P. A. et al. Corticosterone administration after a single-trial contextual fear conditioning does not influence the strength and specificity of recent and remote memory in

rats. **Physiology & behavior**, v. 171, p. 175–180, 15 mar. 2017.

CAHILL, L. et al. β -Adrenergic activation and memory for emotional events. **Nature**, v. 371, n. 6499, p. 702–704, 1 out. 1994.

CHAI, N. et al. Delayed noradrenergic activation in the dorsal hippocampus promotes the long-term persistence of extinguished fear. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 8, p. 1933–1945, 2014.

CHEN, D. Y. et al. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 1707–1714, 18 nov. 2012.

CORDERO, M. I.; MERINO, J. J.; SANDI, C. Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 4, p. 885–891, ago. 1998.

DAVIES, M. F. et al. Activation of $\alpha 2$ Adrenergic Receptors Suppresses Fear Conditioning: Expression of c-Fos and Phosphorylated CREB in Mouse Amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 229–239, 2004.

DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; JOËLS, M. Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 10, p. 422–426, 1999.

DE QUERVAIN, D. J. F. et al. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 358–370, 2009.

DOS SANTOS CORRÊA, M. et al. Relationship between footshock intensity, post-training corticosterone release and contextual fear memory specificity over time. **Psychoneuroendocrinology**, v. 110, n. September, p. 104447, 16 dez. 2019.

ELZINGA, B. M.; BREMNER, J. D. Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? **Journal of affective disorders**, v. 70, n. 1, p. 1–17, 2002.

FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. **The Pavlovian Journal of Biological Science : Official Journal of the Pavlovian**, v. 15, n. 4, p. 177–182, 1980.

FASTENRATH, M. et al. Dynamic modulation of amygdala-hippocampal connectivity by emotional arousal. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 42, p. 13935–13947, 2014.

FATURI, C. B. et al. Disruptions of the mother–infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 821–834, maio 2010.

FERREIRA, T. L. et al. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. **Brain Research**, v. 987, n. 1, p. 17–24, 2003.

FERREIRA, T. L. et al. The indirect amygdala–dorsal striatum pathway mediates conditioned freezing: Insights on emotional memory networks. **Neuroscience**, v. 153, n. 1, p. 84–94, 2008.

FIANCETTE, J. F. et al. Mifepristone and spironolactone differently alter cocaine intravenous self-administration and cocaine-induced locomotion in C57BL/6J mice. **Addiction Biology**, v. 15, n. 1, p. 81–87, 2010.

FIGUEREDO, L. Z. P. et al. Interaction between glutamatergic–NMDA and cholinergic–muscarinic systems in classical fear conditioning. **Brain Research Bulletin**, v. 77, n. 2–3, p. 71–76, set. 2008.

FINSTERWALD, C.; ALBERINI, C. M. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 17–29, 2014.

FORNARI, R. V. et al. Effects of nociceptin/orphanin FQ in the acquisition of contextual and tone fear conditioning in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 98–106, fev. 2008.

FORNARI, R. V. et al. Involvement of the insular cortex in regulating glucocorticoid effects on memory consolidation of inhibitory avoidance training. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 6, p. 10, 2012a.

FORNARI, R. V. et al. Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 59, p. e3528, 30 jan. 2012b.

FRANKLAND, P. W. The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 881–883, 7 maio 2004.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 119–30, 2005.

FREDRIKSSON, M.; NEDERGAARD, J.; CANNON, B. Ha/ kan THONBERG, J. Magnus

FREDRIKSSON, Jan NEDERGAARD and Barbara CANNON 1. **Society**, v. 79, p. 73–79, 2002.

GAZARINI, L. et al. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. **Learning and Memory**, v. 20, n. 4, p. 210–219, 2013.

GOLD, P. E.; VAN BUSKIRK, R. Effects of posttrial hormone injections on memory processes. **Hormones and Behavior**, v. 7, n. 4, p. 509–517, 1976.

GOLD, P. E.; VAN BUSKIRK, R. B. Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. **Behavioral Biology**, v. 13, n. 2, p. 145–153, 1975.

GUIJARRO, J. Z. et al. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 101–108, dez. 2007.

HAN, W. et al. Striatal Dopamine Links Gastrointestinal Rerouting to Altered Sweet Appetite. **Cell metabolism**, v. 23, n. 1, p. 103–112, 12 jan. 2016.

HOJJATI, M. R. et al. Kinase activity is not required for α CaMKII-dependent presynaptic plasticity at CA3-CA1 synapses. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1125–1127, 29 set. 2007.

HU, H. et al. Emotion Enhances Learning via Norepinephrine Regulation of AMPA-Receptor Trafficking. **Cell**, v. 131, n. 1, p. 160–173, 2007.

HUCKLEBERRY, K. A.; FERGUSON, L. B.; DREW, M. R. Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice. **Learning & Memory**, v. 23, n. 12, p. 703–709, 2016.

HUI, G. K. et al. Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 81, n. 1, p. 67–74, 2004.

JOËLS, M.; KRUGERS, H.; KARST, H. Regulation of excitatory synapses by stress hormones. **Synaptic Stress and Pathogenesis of Neuropsychiatric Disorders**, v. 5, n. October, p. 19–32, 2014.

KABITZKE, P. A.; SILVA, L.; WIEDENMAYER, C. Norepinephrine mediates contextual fear learning and hippocampal pCREB in juvenile rats exposed to predator odor. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 2, p. 166–172, 2011.

KAOUANE, N. et al. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 335, n. 6075, p. 1510–3, 23 mar. 2012.

KLEMENHAGEN, K. C. et al. Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 1, p. 101–111, 2006.

LABAR, K. S.; CABEZA, R. Cognitive neuroscience of emotional memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 54–64, 2006.

LAYTON, B.; KRIKORIAN, R. Memory Mechanisms in Posttraumatic Stress Disorder. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 3, p. 254–261, ago. 2002.

LOVITZ, E. S.; THOMPSON, L. T. Memory-enhancing intra-basolateral amygdala clenbuterol infusion reduces post-burst afterhyperpolarizations in hippocampal CA1 pyramidal neurons following inhibitory avoidance learning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 119, p. 34–41, 2015.

LUX, V. et al. Imaging a memory trace over half a life-time in the medial temporal lobe reveals a time-limited role of CA3 neurons in retrieval. **eLife**, v. 5, n. FEBRUARY2016, p. 1–19, 2016.

LYNCH, J. F. et al. Hippocampal cytosolic estrogen receptors regulate fear generalization in females. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 130, p. 83–92, 2016a.

LYNCH, J. F. et al. Aromatized testosterone attenuates contextual generalization of fear in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 84, p. 127–135, 2016b.

MATOS, M. R. et al. Memory strength gates the involvement of a CREB-dependent cortical fear engram in remote memory. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 2315, 2019.

MCCARTY, R.; GOLD, P. E. Plasma catecholamines: Effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. **Hormones and Behavior**, v. 15, n. 2, p. 168–182, 1981.

MCGAUGH, J. L. Involvement of Hormonal and Neuromodulatory Systems in the Regulation of Memory Storage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 255–287, mar. 1989.

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

MCHUGH, T. J. et al. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the

hippocampal network. **Science**, v. 317, n. 5834, p. 94–99, 2007.

MCINTYRE, C. K. et al. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10718–10723, 2005.

MCLEAN, J. H.; HARLEY, C. W. Olfactory learning in the rat pup: A model that may permit visualization of a mammalian memory trace. **NeuroReport**, v. 15, n. 11, p. 1691–1697, 2004.

MOREIRA, K. M. et al. Modafinil prevents inhibitory avoidance memory deficit induced by sleep deprivation in rats. **Sleep**, v. 33, n. 7, p. 990–3, jul. 2010.

MOSCOVITCH, M. et al. Episodic Memory and Beyond: The Hippocampus and Neocortex in Transformation. **Annual Review of Psychology**, v. 67, n. 1, p. 105–134, 4 jan. 2016.

MYERS, B.; MCKLVEEN, J. M.; HERMAN, J. P. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 180–196, 2014.

OKUDA, S.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 853–858, 2004.

PATEL, P. D. et al. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. **Journal of Psychiatric Research**, v. 34, n. 6, p. 383–392, 2000.

PEDRAZA, L. K. et al. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. **Hippocampus**, v. 26, n. 3, p. 362–371, 2016.

POULOS, A. M. et al. Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 23, n. 7, p. 379–85, 2016.

PUGH, C. R. et al. A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. **Behavioral neuroscience**, v. 111, n. 3, p. 503–511, 1997.

RAO-RUIZ, P. et al. Engram-specific transcriptome profiling of contextual memory consolidation. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2019.

REIS, F. M. C. V. et al. Rapid Activation of Glucocorticoid Receptors in the Prefrontal Cortex

Mediates the Expression of Contextual Conditioned Fear in Rats. **Cerebral Cortex**, v. 26, n. 6, p. 2639–2649, jun. 2016.

REVEST, J.-M. et al. The enhancement of stress-related memory by glucocorticoids depends on synapsin-Ia/Ib. **Molecular psychiatry**, v. 15, n. 12, p. 1125, 1140–1151, 2010.

REVEST, J.-M. et al. BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 9, p. 1001–9, set. 2014.

REVEST, J.-M. M. et al. The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 664–672, 17 maio 2005.

RICHARDSON, M. P.; STRANGE, B. A.; DOLAN, R. J. Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 278–285, 2004.

RODRIGUES, S.; FERREIRA, T. L. Muscimol injection into the substantia nigra but not globus pallidus affects prepulse inhibition and startle reflex. **Neuropharmacology**, v. 162, n. April 2019, p. 107796, 2020.

RODRIGUES, S. M.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 75–91, 2004.

ROOZENDAAL, B. et al. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11642–7, 1999.

ROOZENDAAL, B. et al. Basolateral amygdala-nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 7, p. 2518–2525, 2001.

ROOZENDAAL, B.; BOHUS, B.; MCGAUGH, J. L. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 681–693, 1996.

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

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect

glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. **Neurobiology of learning and memory**, v. 65, n. 1, p. 1–8, 1996.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid Receptor Agonist and Antagonist Administration into the Basolateral but Not Central Amygdala Modulates Memory Storage. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 67, n. 2, p. 176–179, mar. 1997.

ROOZENDAAL, B.; MIRONE, G. Opposite Effects of Noradrenergic and Glucocorticoid Activation on Accuracy of Episodic-like Memory. **Psychoneuroendocrinology**, p. 104588, jan. 2020.

ROOZENDAAL, B.; PORTILLO-MARQUEZ, G.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. **Behavioral neuroscience**, v. 110, n. 5, p. 1074–1083, 1996.

ROSSI, V. C. et al. Effects of sleep deprivation on different phases of memory in the rat: dissociation between contextual and tone fear conditioning tasks. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. November, p. 389, 7 nov. 2014.

SAHAY, A. et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 466–470, 2011.

SAHAY, A.; WILSON, D. A.; HEN, R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 582–8, 26 maio 2011.

SALEHI, B.; CORDERO, M. I.; SANDI, C. Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. **Learning & Memory**, v. 17, n. 10, p. 522–530, 2010.

SANDI, C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 4, p. 165–176, 2011.

SANDI, C.; LOSCERTALES, M.; GUAZA, C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. **The European journal of neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 637–642, 1997.

SANDI, C.; PINELO-NAVA, M. T. Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. 1–20, 2007.

SANDI, C.; ROSE, S. P. R. Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. **Brain Research**, v. 647, n. 1, p. 106–112, 1994.

SANDI, C.; ROSE, S. P. R. Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks. **Psychopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 152–160, 1997.

SARINANA, J. et al. Differential roles of the dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in hippocampal dependent memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 22, p. 8245–8250, 2014.

SOARES, J. C. K.; OLIVEIRA, M. G. M.; FERREIRA, T. L. Inactivation of muscarinic receptors impairs place and response learning: Implications for multiple memory systems. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 320–326, 2013.

SOYA, S. et al. Orexin modulates behavioral fear expression through the locus coeruleus. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T. The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 259–288, 21 jul. 2011.

SUCHECKI, D.; TIBA, P. A.; TUFIK, S. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats J English Article Suchecki, D, Univ Fed Sao Paulo, Dept Psychobiol, Rua Napoleao Barros 925, BR-04024002 Sao Paulo, SP, Brazil 16 12 ELSEVIER SCI IRELA. **Neuroscience Letters**, v. 320, n. 1–2, p. 45–48, 2002.

TER HORST, J. P. et al. Stress or no stress: Mineralocorticoid receptors in the forebrain regulate behavioral adaptation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 98, n. 1, p. 33–40, 2012.

TIBA, P. A. et al. Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. **Sleep**, v. 31, n. 4, p. 505–15, abr. 2008.

TIBA, P. A.; TUFIK, S.; SUCHECKI, D. Long lasting alteration in REM sleep of female rats submitted to long maternal separation. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 3, p. 444–452, fev. 2008.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

VANVOSSSEN, A. C. et al. Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 137, p. 154–162, 2017.

WANG, S.-H. et al. The precision of remote context memories does not require the hippocampus. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 253–255, 2009.

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

WICHMANN, R.; FORNARI, R. V.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids interact with the noradrenergic arousal system in the nucleus accumbens shell to enhance memory consolidation of both appetitive and aversive taste learning. **Neurobiology of learning and memory**, v. 98, n. 2, p. 197–205, set. 2012.

WILTGEN, B. J.; SILVA, A. J. Memory for context becomes less specific with time. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 4, p. 313–317, 2007.

WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M. Memory Transformation and Systems Consolidation. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 17, n. 05, p. 766–780, 2011.

WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M.; BONTEMPI, B. Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. **Neuropsychologia**, v. 48, n. 8, p. 2339–2356, 2010.

WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M.; SEKERES, M. Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 555–557, 2007.

YIM, A. J. et al. Protein synthesis inhibition in the basolateral amygdala following retrieval does not impair expression of morphine-associated conditioned place preference. **Behavioural Brain Research**, v. 171, n. 1, p. 162–169, 2006.

ZALACHORAS, I. et al. Differential targeting of brain stress circuits with a selective glucocorticoid receptor modulator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 19, p. 7910–5, 7 maio 2013.

ZHOU, M. et al. Both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors regulate emotional memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 4, p. 530–537, nov. 2010.