

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

HENRIQUE SCHAAN FERNANDES

**AS CONDIÇÕES LIMITANTES DO
DESCONDICIONAMENTO, UMA NOVA ABORDAGEM
PARA ELIMINAR MEMÓRIAS TRAUMÁTICAS**

Porto Alegre

2018

HENRIQUE SCHAAN FERNANDES

**AS CONDIÇÕES LIMITANTES DO
DESCONDICIONAMENTO, UMA NOVA ABORDAGEM
PARA ELIMINAR MEMÓRIAS TRAUMÁTICAS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Lucas de Oliveira Alvares

Coorientador: Bruno Popik

Porto Alegre

2018

1. INTRODUÇÃO

A memória é o mecanismo através do qual as informações vindas do ambiente são codificadas, armazenadas e evocadas pelo nosso sistema nervoso central. A retenção de informação possibilita que um indivíduo procure repetir experiências positivas e evite as negativas, o que é essencial para a sobrevivência. Memórias aversivas são, portanto, importantíssimas para que associemos uma experiência perigosa a um contexto e possamos nos preservar futuramente.

Em contrapartida, memórias aversivas muito fortes podem causar transtornos mentais, como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Experiências extremamente nocivas como assédio sexual, guerras, acidentes automobilísticos ou assaltos podem criar memórias que alteram persistentemente os padrões neurológicos de um indivíduo. Estes padrões podem permanecer alterados até muito tempo após o trauma e fazem a pessoa ser hipersensível a quaisquer futuras situações aversivas, reduzindo significativamente a qualidade de vida.

A neurociência já criou diversas abordagens para estudar os diferentes tipos de memória. A grande maioria dos estudos é feita com animais, principalmente roedores. Há protocolos que analisam memórias sem significativa valência emocional, como a memória espacial; a localização de objetos é uma tarefa comum para este fim.

No início do século XX, Ivan Pavlov criou o que hoje é conhecido como condicionamento clássico, que nos permite avaliar memórias associadas a emoções positivas ou negativas. Nele, um estímulo nocivo ou benéfico (estímulo incondicionado ou *unconditioned stimulus* - US), como um choque ou uma recompensa (comida), é associado a um estímulo neutro, como um contexto ou sinal (estímulo condicionado ou *conditioned stimulus* - CS); após o condicionamento, quando o animal percebe o CS, se comporta como se fosse receber o US. No estudo da memória aversiva, dois protocolos de condicionamento se destacam como mais eficazes: o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) e o condicionamento aversivo ao tom (CAT).

Com a utilização dessas ferramentas, muitos avanços no conhecimento da memória aversiva foram obtidos nas últimas décadas, e, conseqüentemente,

conceitos foram e são estabelecidos. Não obstante, para que sejam reduzidos ou eliminados os exagerados efeitos que transtornos como o TEPT causam nos seres humanos, se faz necessário entender como as memórias aversivas são formadas, armazenadas, atualizadas e, se possível, apagadas.

A consolidação é a progressiva estabilização pós-aquisição da memória de longa duração (Dudai, 2004). Ela pode ser dividida em dois processos de diferentes magnitudes: a consolidação sináptica, que ocorre de minutos a poucas horas após o aprendizado, e a consolidação sistêmica, que leva muito mais tempo, e na qual memórias inicialmente dependentes do hipocampo são reorganizadas e podem se tornar independentes do hipocampo.

Na consolidação sináptica, a informação recebida causa o início de cascatas intracelulares de transdução de sinal, levando à modificação de proteínas sinápticas e subsequentemente à alteração de excitabilidade sináptica e da quantidade de neurotransmissores liberados aos neurônios-alvo. Essas mesmas cascatas também podem ativar fatores de transcrição, levando à modulação da expressão gênica, o que culmina em modificação de longo prazo de proteínas sinápticas e remodelamento e crescimento sinápticos. A ativação, expressão e função de certos fatores de transcrição é uma parte essencial da sequência de eventos, que ocorre durante uma janela limitada de tempo durante e imediatamente após o evento que causa a formação da memória. Essa janela de tempo corresponde à consolidação sináptica (Dudai, 2004).

A consolidação sistêmica se refere ao processo de reorganização em que memórias deixam de ser dependentes do hipocampo, onde foram inicialmente codificadas, e são gradualmente levadas ao córtex para uma forma mais permanente de armazenamento (Roediger et. al., 2007). A memória é retida no hipocampo até uma semana após o aprendizado inicial, representando o estágio hipocampo-dependente (Frankland e Bontempi, 2005). A partir daí, a memória é progressivamente transferida ao neocórtex, onde se torna permanentemente armazenada (Dudai, 2004).

Para que uma memória consolidada seja alterada, ela precisa ser evocada. A evocação de um traço mnemônico consolidado é um processo dinâmico que pode dar início a outros dois processos: reconsolidação e extinção (Baldi 2015).

A reconsolidação é o fenômeno que ocorre quando a evocação de uma memória previamente estável a torna vulnerável a perturbações. Logo, a evocação traz a memória de volta a um estado plástico (Lee, 2009), e requer um novo processo de consolidação para ser preservada. A reconsolidação permite a integração de nova informação ao traço original da memória, permitindo, portanto, a atualização da mesma, e também seu fortalecimento ou enfraquecimento (Alberini, 2005; Alberini e LeDoux, 2013).

A reconsolidação difere da consolidação inicial, por exemplo, no que tange às janelas de tempo em que ocorrem, e as estruturas cerebrais e processos moleculares envolvidos não são necessariamente os mesmos (Alberini, 2005; Bucherelli et al., 2006; Tronson e Taylor, 2007).

Por outro lado, se, durante a evocação, a reativação de uma memória aversiva ocorrer via uma mais longa reexposição a um contexto semelhante ao do aprendido, se inicia o processo da extinção, que resulta em progressiva redução na expressão de medo (Baldi, 2015). Entretanto, a extinção não modifica diretamente a memória original, mas sim cria uma nova memória inibitória que compete com a original. Isso significa que a extinção é um novo aprendizado.

O problema da extinção é que fenômenos como *recuperação espontânea* (reaparição da extinta memória aversiva com a passagem do tempo), *renewal* (recuperação da extinta memória aversiva quando o indivíduo é exposto ao contexto onde a memória aversiva original foi formada) e *reinstatement* (reaparição de memória aversiva extinta após exposição do indivíduo a estímulo semelhante ao que causou a formação da memória aversiva original) demonstram que a memória original não se apaga, mas se mantém codificada no cérebro, apenas não sendo expressa enquanto durar a memória de extinção (Baldi e Bucherelli, 2010; Myers e Davis, 2007; Quirk e Mueller, 2008).

A compreensão dos mecanismos de reconsolidação e extinção tem, portanto, grande importância clínica para o tratamento de transtornos de ansiedade humanos, como fobias específicas, síndrome do pânico e transtorno de estresse pós-traumático (Baldi, 2015). Dentre estes, destaca-se o último.

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é um transtorno psiquiátrico debilitante (Nawijn et al., 2015), e é um dos poucos transtornos mentais nos quais a causa é facilmente identificável (Kirkpatrick e Heller, 2014). O TEPT se manifesta após exposição a um evento traumático e é caracterizado por uma desregulação do sistema aversivo que é provavelmente causada por fraca inibição ou extinção do medo, generalização aumentada e/ou elevada consolidação ou aquisição do medo. Estes fenótipos podem ser modelados em animais utilizando condicionamento aversivo, o que permite investigação da subjacente neurobiologia do medo normativo e patológico (Bowers e Ressler, 2015).

Entender os mecanismos neurobiológicos do TEPT é de vital importância para o desenvolvimento de biomarcadores e uma mais eficiente farmacoterapia para essa desordem, e modelos animais se fazem necessários para capturarmos a complexidade das características comportamentais da TEPT (Daskalakis et al., 2013).

Nesse cenário, tratamentos envolvendo procedimentos de reconsolidação e extinção têm sido usados para reduzir a expressão da memória de medo (Alberini, 2005; Monfils et al., 2009; Quirk et al., 2010; Schiller et al., 2010; Rao-Ruiz et al., 2011; Parsons and Ressler, 2013; Todd et al., 2014). Entretanto, o retorno do medo condicionado após efetiva extinção é um problema significativo no tratamento de transtornos de ansiedade e TEPT (Drexler et al., 2015). Como o processo de extinção resulta numa nova memória que inevitavelmente acaba se enfraquecendo, possibilitando o retorno da expressão da memória aversiva original, investigar o fenômeno da reconsolidação se faz importante.

Até há pouco tempo, os principais resultados eficientes em reduzir ou eliminar memórias aversivas através da reconsolidação o fizeram através do uso de fármacos que inibem a síntese proteica necessária para a atualização da memória (Nader et al., 2000; Parsons et al., 2006; Kindt et al., 2014). Entretanto, os compostos utilizados nesses estudos são tóxicos para humanos (Schiller, 2011).

Além disso, existem parâmetros experimentais que podem inibir a ocorrência da reconsolidação: as *boundary conditions* (Wang et al., 2009). Dentre eles, são os mais evidentes a idade da memória (quanto mais velha, mais resistente à labilização) e a intensidade do trauma (quanto mais forte, mais resistente à

labilização). Isso configura um problema para possíveis tratamentos, porque é muito comum que eles se iniciem muito tempo depois do evento traumatizante, o que impossibilita grandes mudanças (Milekic e Alberini, 2002).

Contudo, recentemente foi criada e testada uma nova abordagem à perturbação da reconsolidação, sem a utilização de fármacos. Em estudo publicado em 2009, Monfils e colaboradores tiveram a ideia de, após a indução da reconsolidação (através de uma sessão de evocação), realizar uma sessão de extinção. Como o período de instabilidade ou de labilização (a janela de reconsolidação) persiste por algumas horas após a evocação (Duvarci e Nader, 2004), hipotetiza-se que esse novo protocolo faz com que a memória original seja alterada.

Após esse estudo inicial com ratos, um ano depois o mesmo grupo de pesquisa (Schiller et al., 2010) obteve resultado semelhante em humanos, eliminando a expressão de medo de memórias consolidadas até 1 ano antes.

Estudos posteriores, tentando replicar estes dados, encontraram resultados semelhantes (Clem and Huganir, 2010; Oyarzun et al., 2012; Graff et al., 2014); outros obtiveram resultados contraditórios ou pouco conclusivos (Chan et al., 2010; Costanzi et al., 2011; Kindt and Soeter, 2013; Stafford et al., 2013; Luyten and Beckers, 2017). Porém, há a possibilidade de estes estudos terem sido conduzidos desrespeitando as *boundary conditions* (força e idade das memórias; Suzuki et al., 2008; Wang et al., 2009) anteriormente citadas, o que impossibilitaria uma verdadeira interferência na reconsolidação.

Nesse contexto, pesquisadores do nosso laboratório (Neurobiologia da Memória, UFRGS) visaram desenvolver novas metodologias para, fazendo uso da reconsolidação, atenuar ou eliminar memórias traumáticas sem o uso de fármacos. Após alguns testes, foi desenvolvido o protocolo de *descondicionamento* (ou, do inglês, *decontitioning-update*).

O raciocínio que culminou na criação do protocolo de descondicionamento foi o seguinte: sabendo que, após treinarmos um animal a associar um tom sonoro específico a um estímulo aversivo forte (choque), a simples reexposição do animal ao mesmo tom faz com que a memória entre em estado plástico mas retorne ao

estado estável sem alteração do medo, foi formulada a hipótese de que, durante a sessão de reexposição ao tom, o acréscimo da aplicação de um choque muito fraco conseguisse efetivamente atualizar o traço, atenuando ou mesmo removendo o componente aversivo daquela memória.

Os resultados dos primeiros experimentos utilizando o protocolo de descondicionamento foram bastante satisfatórios. Realizando treinos com choques de 0,5mA (média intensidade) e 1mA (forte), sessões de reativação acrescidas de choques de 0,1mA (muito fraca) efetivamente reduziram a expressão da memória de medo em teste posterior. Além disso, a expressão continuou reduzida ou nula nos testes de *renewal* e de recuperação espontânea, o que indica que essas memórias não sofreram extinção, mas, sim, reconsolidação, atualizando o traço original com a informação não aversiva.

Sendo assim, o próximo passo que se faz necessário é descobrir em quais condições este protocolo funciona, em quais ele deixa de funcionar e por quê. Em suma, o objetivo deste trabalho é definir as condições limitantes (*boundary conditions*) do protocolo de descondicionamento.

A hipótese deste trabalho é que os limites do descondicionamento sejam governados pelo contraste entre as intensidades dos choques de treino e de reativação: um treino muito forte pode não ser alterado por reativações com choques muito fracos, assim como um treino de intensidade não muito diferente da de reativação. Resumindo, a distância entre as magnitudes do treino e da reativação não deve ser nem muito grande, nem muito pequena.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Periódico: Journal of Neuroscience

Título: As condições limitantes do descondicionamento, uma nova abordagem para eliminar memórias traumáticas

Normas da revista: Disponível no Anexo A e no link <http://www.jneurosci.org/content/information-authors>

RESUMO

Historicamente, os tratamentos para transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) se baseiam em terapias de extinção, que inibem a expressão da memória traumática. A descoberta de que a evocação de traços mnemônicos pode desestabilizar e atualizá-los através da reconsolidação abriu portas para o desenvolvimento de novas abordagens. Inicialmente, porém, só se conseguiu eliminar essas memórias através do uso de fármacos como inibidores de síntese proteica, tóxicos para humanos. Alguns estudos recentes demonstraram avanço promissor na busca por métodos não nocivos de atualização via reconsolidação, como o protocolo de *reactivation-extinction*, embora tentativas de replicá-los tenham encontrado resultados contraditórios. Aqui, nós apresentamos uma nova abordagem, o *descondicionamento*, que possibilita a atualização de uma memória através da reexposição do indivíduo a uma fraca representação do US que originou o traço. Definimos também os limites até os quais este protocolo funciona, com base no conceito do erro de predição, que determina que uma memória já consolidada só será desestabilizada se o indivíduo for exposto a um estímulo diferente, mas não muito, do estímulo que originou o traço.

1. INTRODUÇÃO

Os tratamentos para transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) comumente se utilizam de um dos dois fenômenos que podem resultar da evocação da memória traumática e conseqüentemente alterar sua expressão: a extinção ou a reconsolidação. A extinção se trata de um novo aprendizado, induzido por uma longa reexposição a um estímulo condicionado (contexto ou tom - *conditioned stimulus*, CS) na ausência do estímulo incondicionado (choque - *unconditioned stimulus*, US), que inibe a expressão da memória original (Bouton et al. 2012). Descrita mais recentemente, a reconsolidação consiste na indução da desestabilização do traço original da memória após breve reexposição ao CS, o que pode resultar em alteração tanto na sua força quanto no seu conteúdo (De Oliveira Alvares et al., 2013).

Logo, enquanto a extinção apenas altera temporariamente a expressão da memória traumática, a reconsolidação pode alterar persistentemente seu conteúdo. Porém, a maioria dos compostos conhecidos que bloqueiam a reconsolidação são tóxicos para humanos (Haubrich e Nader, 2018). Portanto, a maioria dos tratamentos para TEPT faz uso da extinção (Schiller 2010). Entretanto, existem limites que os tornam insuficientes.

Uma memória atenuada pela extinção pode voltar a ser expressa em três condições: *renewal*, quando o CS é apresentado em um contexto distinto ao da extinção (Effting e Kindt, 2007); *reinstatement*, quando o estímulo incondicionado (*unconditioned stimulus*, US) original é apresentado de forma inesperada (Westbrook et al., 2002); ou recuperação espontânea, quando uma quantidade significativa de tempo passa após a extinção (Schiller et al., 2008). Portanto, a atenuação do medo decorrente de uma terapia de extinção não é permanente.

Alguns estudos recentes visaram desenvolver métodos através dos quais fosse possível alterar o conteúdo da memória via reconsolidação sem o uso de drogas (Monfils et al., 2009; Schiller et al., 2010). Tentativas de replicar estes experimentos obtiveram resultados contraditórios (Clem e Hugarir, 2010; Rao-Ruiz et al., 2011; Constanzi et al., 2011; Kindt e Soeter, 2013). Neste cenário, o desenvolvimento de novas abordagens com esse objetivo se faz necessário.

Assim, foi desenvolvido, em nosso laboratório, o protocolo de *descondicionamento*, no qual uma memória aversiva é atenuada através da aplicação, durante reativação, de um estímulo de mesma natureza (choque) do que

foi aplicado no treino, mas com intensidade muito baixa (trabalho em publicação). Após conseguirmos com sucesso eliminar com choques muito fracos (0,1mA) uma memória aversiva criada por um treino de intensidade média (0,5mA), visamos estabelecer os limites até os quais o protocolo funciona.

Nossa hipótese se baseou nos conceitos de *erro de predição* e das *boundary conditions* da reconsolidação. Para que ocorra a desestabilização da memória, precisa haver uma discrepância entre o que o animal espera e o que ele de fato experimenta; caso contrário, a memória não é alterada (Rescorla e Wagner, 1972; Sevenster et al., 2013). Além disso, quanto mais forte uma memória, mais resistente ela será a interferências (Suzuki et al. 2008). Assim, supusemos que, tanto aumentando quanto diminuindo a intensidade do choque dado no treino, sem alterar o choque da reativação, chegaríamos a um ponto em que o protocolo já não seria mais capaz de reduzir, com sucesso, a expressão de medo por um longo período de tempo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (2 a 3 meses de idade) oriundos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e mantidos no biotério do Departamento de Biofísica. Os animais foram alojados em caixas moradias com 4 ratos, com água e comida *ad libitum*, à temperatura ambiente entre 20°C-22°C e ciclo 12 horas claro/12 horas escuro. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia nacional (Lei Federal 11.794/2008) de cuidados com animais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da universidade e possui o número 34547.

2.2. Procedimentos comportamentais

Para avaliar a memória aversiva dos animais, utilizamos o condicionamento aversivo ao tom (CAT). Nele, são mensurados os níveis de *freezing* (quando o animal permanece imóvel, exceto pelos movimentos respiratórios). Para descartar algum efeito de comportamento do tipo ansioso ou algum prejuízo locomotor,

utilizamos a tarefa de campo aberto. Todas as tarefas comportamentais foram padronizadas no nosso laboratório.

2.2.1. Condicionamento Aversivo ao Tom

O aparato consiste em uma caixa automatizada (Insight) com dois contextos, ambos com dimensões 33 x 22 x 22cm (A x L x P); seu assoalho é composto por uma grade de barras metálicas de 1mm de diâmetro cada e distantes 1cm uma das outras. Nessa grade aplica-se a corrente elétrica com duração de 1s. As características dos tons são de 5 kHz com 75 dB com duração de 30s. Para o condicionamento é feito o pareamento de cada tom com um choque (*unconditioned stimulus*, US), enquanto nas sessões de reativação, *renewal*, teste, recuperação espontânea ou extinção, são apresentados apenas os tons (*conditioned stimulus*, CS).

No nosso protocolo, o treino é realizado no contexto A e consiste em 5 pareamentos de US+CS. As reativações iniciam 48h depois do treino no contexto B e se dividem em 4 sessões separadas por 24h de 3 pareamentos de US+CS no grupo choque e 3 apresentações do CS no grupo sem choque. O teste é realizado 24h depois da última sessão de reativação no contexto B com a apresentação de 3 CS. No *renewal*, os animais voltam ao contexto A e são expostos a 3 CS. 20 dias depois, os animais voltam a receber 3 CS no contexto B no teste de recuperação espontânea.

2.2.2. Campo Aberto

A atividade locomotora e o comportamento do tipo ansioso dos animais serão verificados por meio da tarefa do campo aberto. O aparato consiste em uma arena circular com diâmetro de 180cm cujo chão é subdividido em 12 quadrados. Os animais serão colocados no aparato durante 5 minutos e será contabilizado o número de cruzamentos entre setores e a distância total percorrida pelo animal, para assim avaliar o desempenho motor dos animais, além do tempo de permanência na área central e periférica como medida de ansiedade.

3. RESULTADOS

3.1. O descondicionamento reduz persistentemente a memória aversiva criada por um treino médio

Primeiramente, testamos a eficácia do protocolo padrão em reduzir a expressão da memória criada por um treino com estímulo aversivo de intensidade média (fig. 1A). Todos os ratos foram treinados no contexto A com cinco pareamentos de tom com choque (US) de 0,5mA. Quarenta e oito horas depois, dividimos os ratos em três grupos: um passou por quatro sessões de reativação (uma por dia) no contexto B com três tons (CS) sem a aplicação de US (grupo sem choque); outro passou por quatro sessões de reativação, também no contexto B, com três CS pareados a US de 0,1mA (grupo choque); e o terceiro grupo (grupo controle) não passou por sessões de reativação, permanecendo na caixa durante o período. Já nas duas últimas sessões de reativação, observamos redução no *freezing* dos animais do grupo choque em relação ao grupo sem choque (fig. 1B).

Vinte e quatro horas depois da última reativação dos grupos choque e sem choque, os três grupos foram testados novamente no contexto B, expostos a três CS. A redução na expressão do medo observada no grupo choque durante as reativações se manteve, tanto em relação ao grupo sem choque quanto ao grupo controle (fig. 1C).

Para investigar se a redução na expressão de medo não se devia à extinção dessa memória, caracterizada pela sua inibição temporária, conduzimos mais dois testes: *renewal* e recuperação espontânea. Se tivesse ocorrido extinção, o *freezing* dos animais do grupo choque voltaria a níveis altos nesses testes.

Vinte e quatro horas depois do teste no contexto B, os três grupos foram reexpostos ao contexto A (*renewal* – fig. 1A) com três CS; e vinte dias depois do *renewal*, foram reexpostos ao contexto B (recuperação espontânea) com três CS. A robusta redução no *freezing* do grupo choque observada nas reativações e no teste se manteve tanto no *renewal* (fig. 1D) quanto na recuperação espontânea (fig. 1E). O grupo sem choque também permaneceu imóvel significativamente menos que o grupo controle durante o *renewal*, mas essa redução não se manteve na recuperação espontânea.

Estes resultados sugerem que a robusta redução no *freezing* no grupo choque, que persistiu durante os testes de *renewal* e recuperação espontânea, se deve a uma atualização do traço original da memória de medo, em vez de sua

inibição pela criação de uma nova memória. Sendo assim, o protocolo padrão de descondicionamento se mostrou muito eficaz. Os próximos experimentos tiveram como objetivo estabelecer os limites até os quais ele funcionaria.

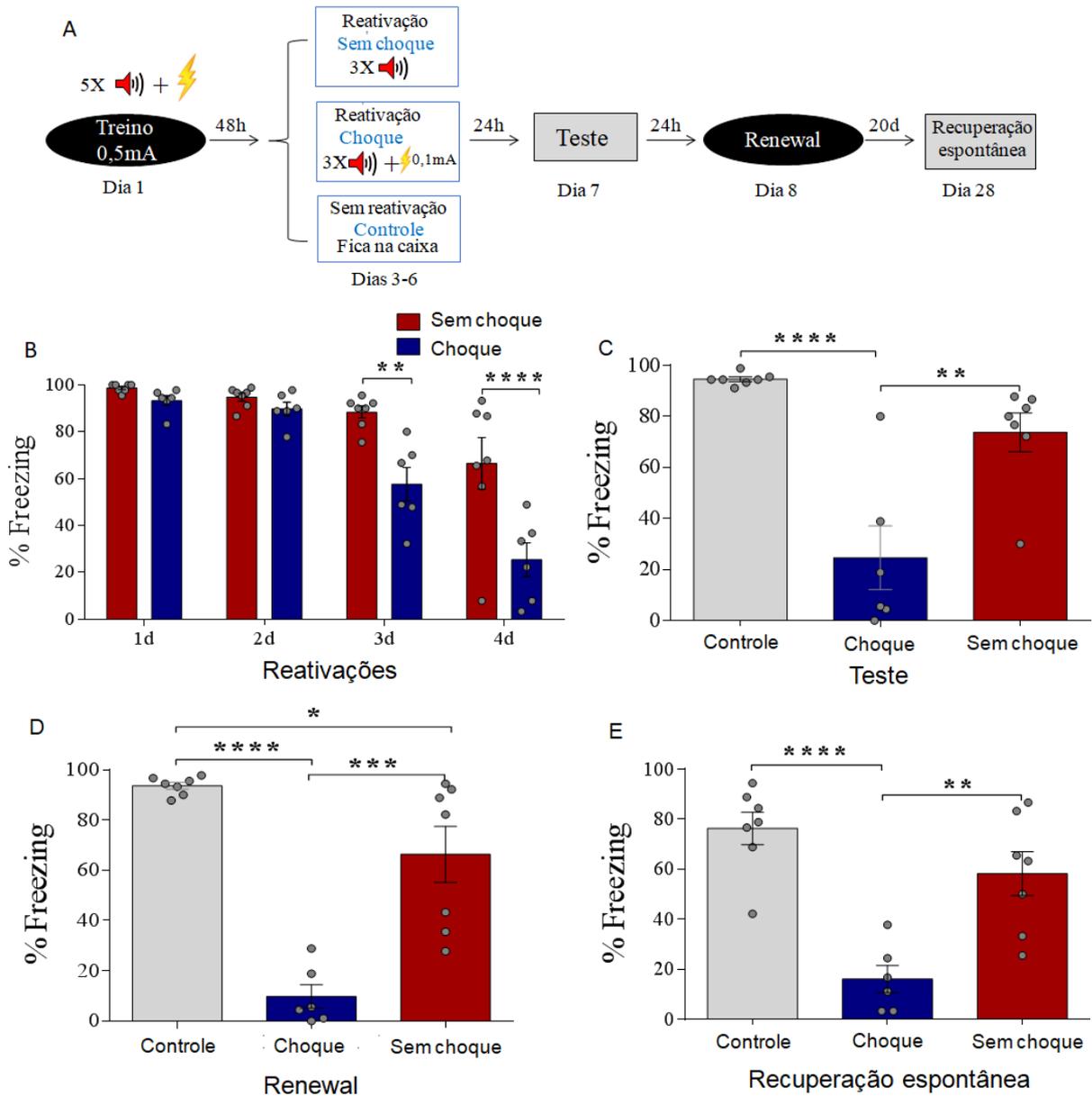


Figura 1. O descondicionamento reduz persistentemente a memória aversiva criada por um treino médio. (A) Representação esquemática do desenho experimental do protocolo de descondicionamento. A porcentagem de *freezing* foi registrada nas sessões de (B) reativação (ANOVA de duas vias com medidas repetidas – interação $F(3,33) = 5.897$, $p = 0.002$; tempo $F(3,33) = 37.1$, $p < 0.0001$; tratamento $F(1,11) = 20.24$, $p = 0.0009$; post hoc de Bonferroni 3d $p = 0.001$ e 4d $p < 0.0001$), (C) teste (ANOVA de uma via; $F(2,15) = 11.63$, $P = 0.0009$) (post hoc de Tukey; controle vs. choque $P < 0.0001$; controle vs. sem choque $P = 1.16$; choque vs. sem choque $P = 0.001$), (D) *renewal* (ANOVA de uma via; $F(2,15) = 31.06$, $P < 0.0001$) (post hoc de Tukey; controle vs. choque $P < 0.0001$; controle vs. sem choque $P = 0.36$; choque vs. sem choque $P = 0.0001$) e (E) recuperação espontânea (ANOVA de uma

via; $F(2,15) = 21.68$, $P < 0.0001$) (post hoc de Tukey; controle vs. choque $P < 0.0001$; controle vs. sem choque $P = 0.2$; choque vs. sem choque $P = 0.002$).

3.2. O descondicionamento não reduz a memória aversiva criada por um treino fraco

Os estudos sobre erro de predição sugerem que uma evocação causada por estímulo muito semelhante ao que originou a memória não a desestabiliza, assim impossibilitando sua atualização via reconsolidação. Nesse contexto, supusemos que reduzindo a intensidade do US no treino, de 0,5mA a 0,3mA, talvez tornássemos o protocolo ineficaz, pela maior semelhança entre os estímulos do treino (0,3mA) e das reativações (0,1mA) (fig. 2A). Neste e nos próximos experimentos, as etapas restantes foram iguais às do protocolo padrão (fig. 1A), apenas se alterando a intensidade do US no treino.

Não houve diferença no *freezing* entre os grupos choque e sem choque em nenhum dos testes (fig. 2). A redução no comportamento de medo de ambos os grupos em relação ao controle no teste (fig. 2C) e do grupo choque em comparação ao controle no *renewal* (fig. 2D) poderia ser explicada pelo desenvolvimento de uma memória de extinção durante as reativações. Estes resultados, aliados aos do nosso primeiro experimento, sustentam a hipótese de que estímulos de treino e reativações muito próximos em intensidade não resultam na desestabilização do traço da memória.

3.3. O descondicionamento reduz persistentemente a memória aversiva criada por um treino forte

Para testar a eficácia do protocolo de descondicionamento em reduzir memórias traumáticas mais fortes, aumentamos a intensidade do US no treino para 1mA (fig. 3A). Assim como no protocolo padrão (fig. 1B-E), o *freezing* no grupo choque estava significativamente reduzido nas últimas duas reativações (fig. 3B) e no teste (fig. 3C) e assim se manteve no *renewal* (fig. 3D) e na recuperação espontânea (fig. 3E). O grupo sem choque apresentou redução no *freezing* em relação ao grupo controle no teste (fig. 3C), mas isso não se manteve no *renewal* (fig. 3D) nem na recuperação espontânea (fig. 3E), o que sugere que essa memória sofreu extinção.

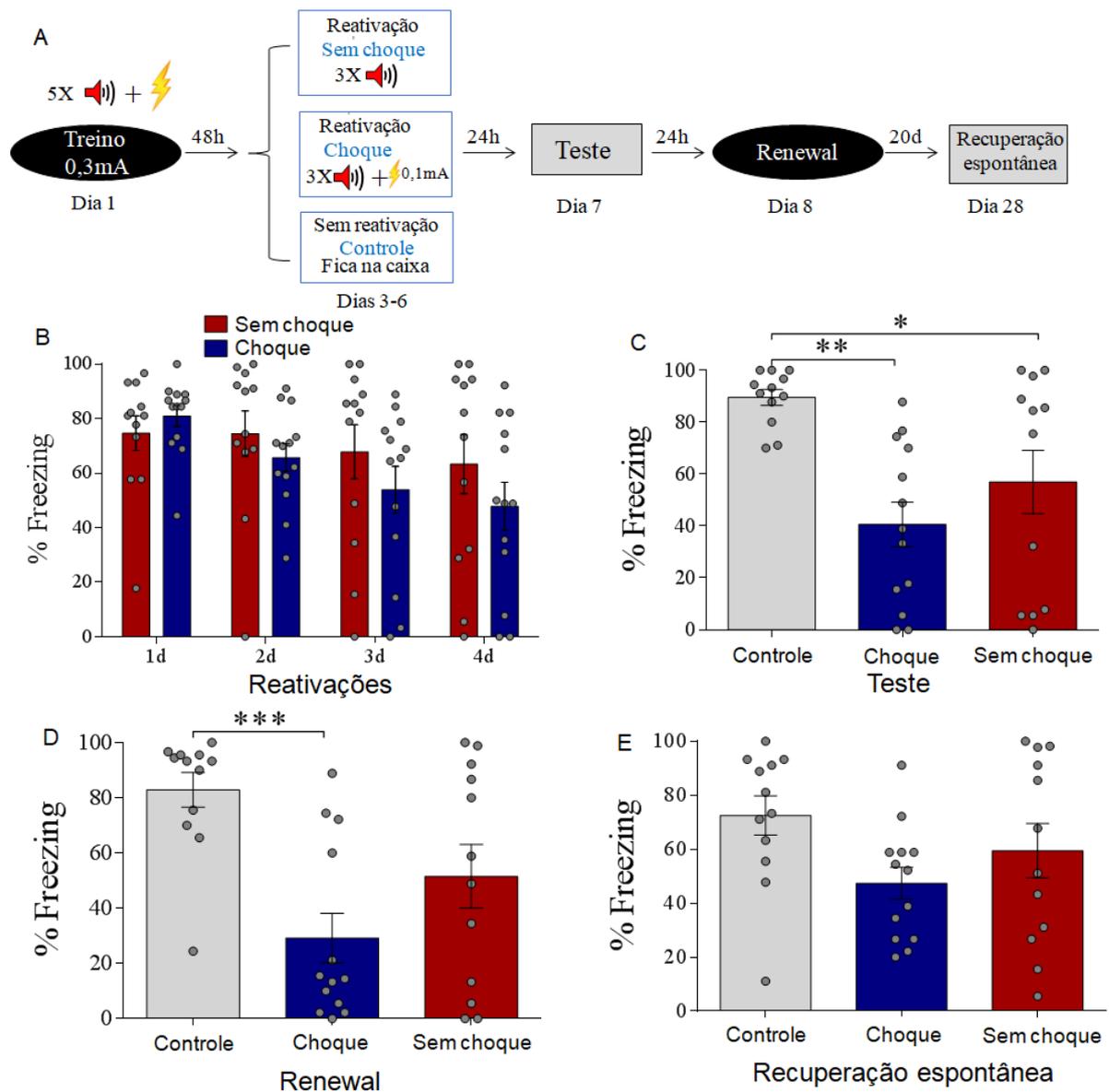


Figura 2. O descondicionamento não reduz a memória aversiva criada por um treino fraco. (A) Representação esquemática do desenho experimental do protocolo. A porcentagem de *freezing* foi registrada nas sessões de (B) reativação (ANOVA de duas vias para medidas repetidas – interação $F(3,27) = 0.7222$, $p = 0.55$; tempo $F(3,27) = 7.782$ $p = 0.0007$; tratamento $F(1,9) = 0.001420$ $p = 0.97$), (C) teste (ANOVA de uma via; $F(2,34) = 7.967$, $P = 0.001$) (post hoc de Tukey; controle vs. choque $P = 0.001$; controle vs. sem choque $P = 0.038$; choque vs. sem choque $P = 0.39$), (D) *renewal* (ANOVA de uma via; $F(2,34) = 8.757$, $P = 0.0009$) (post hoc de Tukey; controle vs choque $P = 0.0006$; controle vs sem choque $P = 0.057$; choque vs sem choque $P = 0.2$) e (E) recuperação espontânea (ANOVA de uma via; $F(2,34) = 2.585$, $P = 0.09$) (post hoc de Tukey; controle vs choque $P = 0.07$; controle vs sem choque $P = 0.49$; choque vs sem choque $P = 0.5$).

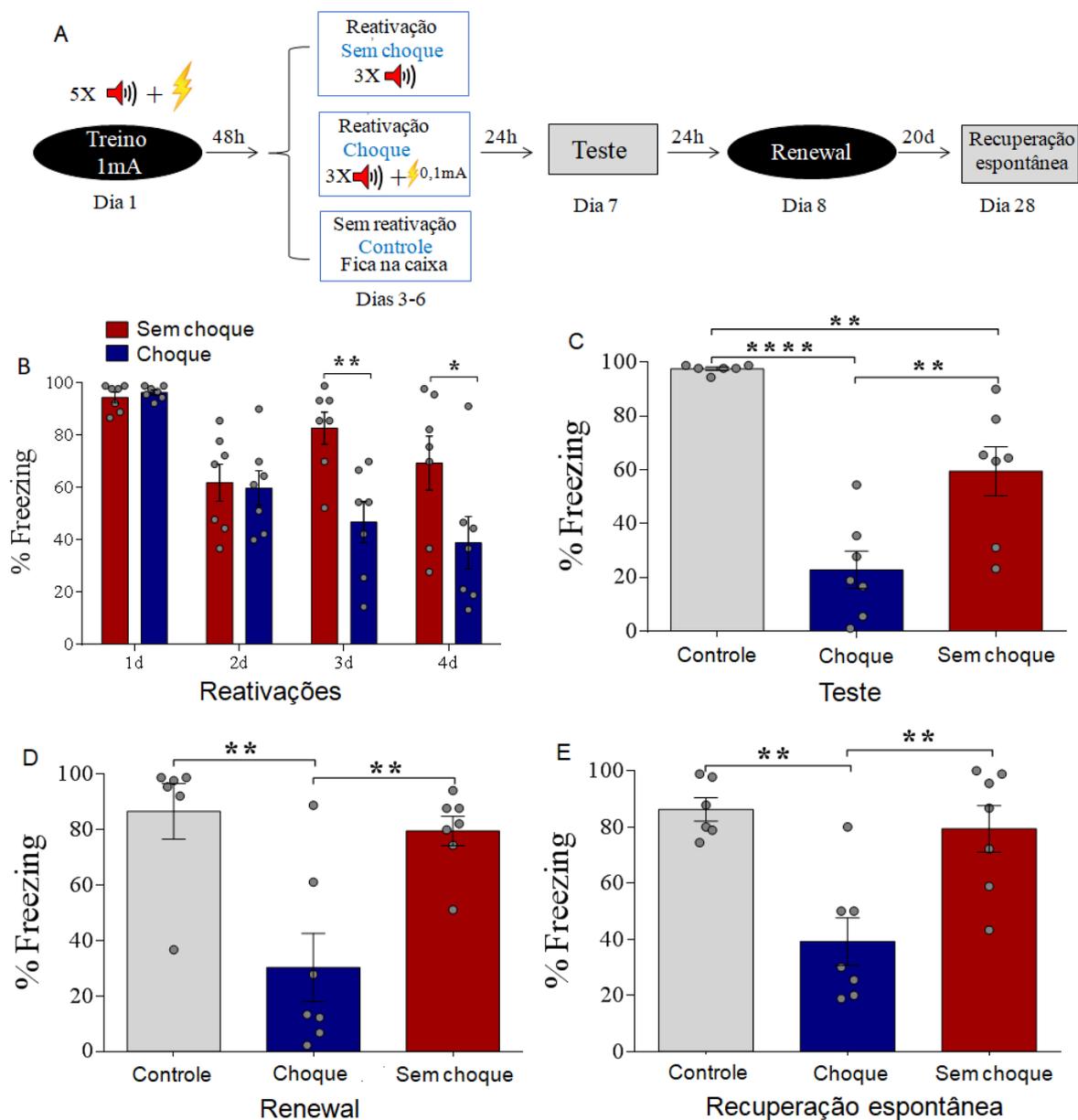


Figura 3. O descondicionamento reduz persistentemente a memória aversiva criada por um treino forte. (A) Representação esquemática do desenho experimental do protocolo. A porcentagem de freezing foi registrada nas sessões de (B) reativação (ANOVA de duas vias para medidas repetidas – interação $F(3,36) = 7.596$, $P = 0.0005$; tempo $F(3,36) = 27.23$, $P < 0.0001$; tratamento $F(1,12) = 4.304$, $P = 0.06$; post hoc de Bonferroni 3d $P = 0.003$ e 4d $P = 0.015$), (C) teste (ANOVA de uma via; $F(2,17) = 27.83$, $P < 0.0001$) (post hoc de Tukey; controle vs choque $P < 0.0001$; controle vs sem choque $P = 0.004$; choque vs sem choque $P = 0.004$), (D) *renewal* (ANOVA de uma via; $F(2,17) = 10.24$, $P = 0.0012$) (post hoc de Tukey; controle vs choque $P = 0.002$; controle vs sem choque $P = 0.87$; choque vs sem choque $P = 0.004$) e (E) recuperação espontânea (ANOVA de uma via; $F(2,17) = 11.62$, $P = 0.0007$) (post hoc de Tukey; controle vs sem choque $P = 0.001$; controle vs sem choque $P = 0.8$; choque vs sem choque $P = 0.003$).

3.4.O descondicionamento não reduz a memória aversiva criada por um treino muito forte

Por último, testamos o descondicionamento em uma memória muito forte. O descondicionamento não foi capaz de reduzir uma memória criada por treino de 2mA (fig. 1A-E); isso provavelmente se deve à grande discrepância entre as intensidades dos US do treino e das reativações, um erro de predição grande demais para que a memória seja desestabilizada.

Novamente, assim como no experimento com treino forte (fig. 3C), o grupo sem choque apresentou redução no *freezing* em relação ao grupo controle no teste (fig. 4C), mas essa redução não se manteve no *renewal* (fig. 4D) nem na recuperação espontânea (fig. 4E); mais uma vez, esta memória pode ter passado pelo processo de extinção.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de terapias para patologias psiquiátricas como TEPT, fobias e depressão encontrou novo rumo com a relativamente recente visão de que traços mnemônicos já consolidados não são permanentes; a antiga noção de que a memória era estocada de forma fixa até quando persistisse (McGaugh, 1966) foi atualizada com as descobertas de que a evocação é na verdade um processo ativo e pode desencadear alterações nesse traço, num processo então denominado reconsolidação (Lee, 2009; Nader et al., 2000).

Os primeiros trabalhos envolvendo reconsolidação focaram em interromper o processo natural de reestruturação molecular catalisado pela evocação através do uso de fármacos como inibidores de síntese proteica e antagonistas de receptores NMDA. Embora muito eficientes em eliminar memórias traumáticas em roedores, tais drogas têm seu uso limitado em humanos, por serem tóxicas e necessitarem de procedimentos invasivos como infusões intracraniais. Estudos recentes apresentam o propranolol, um bloqueador beta-adrenérgico utilizado como anti-hipertensivo, como um potencial candidato menos nocivo para tratar o TEPT (Soeter e Kindt, 2012; Brunet et al., 2014); entretanto, ainda não é consenso se essa droga afeta a reconsolidação ou a extinção (Pitman et al., 2002; Giustino et al., 2017).

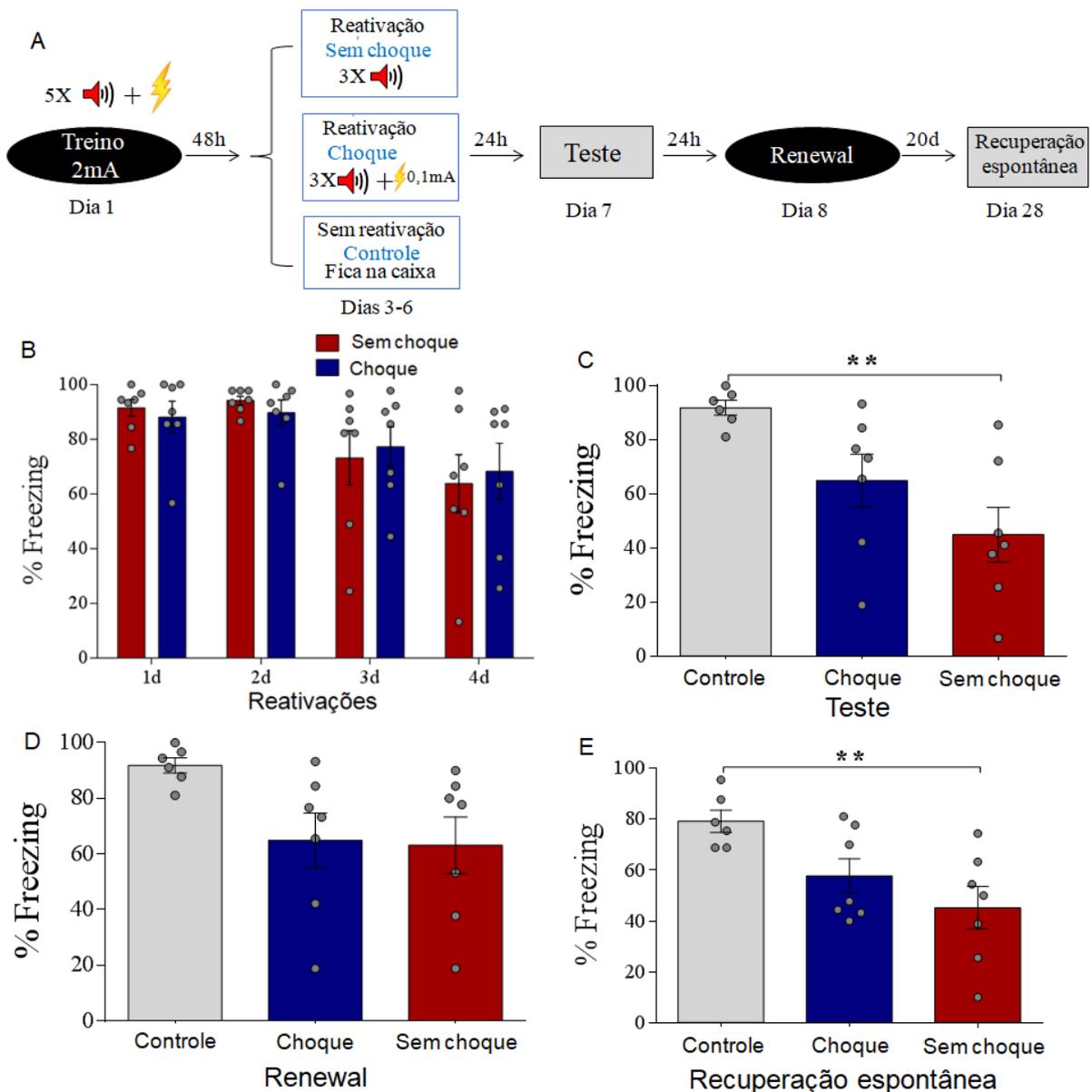


Figura 4. O descondicionamento não reduz a memória aversiva criada por um treino muito forte. (A) Representação esquemática do desenho experimental do protocolo. A porcentagem de freezing foi registrada nas sessões de (B) reativação (ANOVA de duas vias para medidas repetidas – interação $F(3,36) = 0.3720$, $P = 0.77$; tempo $F(3,36) = 9.980$, $P < 0.0001$; tratamento $F(1,12) = 0.00061$, $P = 0.98$), (C) teste (ANOVA de uma via; $F(2,17) = 7.077$, $P = 0.0058$) (post hoc de Tukey; controle vs choque $P = 0.1$; controle vs sem choque $P = 0.004$; choque vs sem choque $P = 0.24$), (D) *renewal* (ANOVA de uma via; $F(2,17) = 3.208$, $P = 0.06$) e (E) recuperação espontânea (ANOVA de uma via; $F(2,17) = 5.935$, $P = 0.01$) (post hoc de Tukey; controle vs choque $P = 0.1$; controle vs sem choque $P = 0.008$; choque vs sem choque $P = 0.4$).

Em 2009, foi publicado o primeiro trabalho em que memórias aversivas eram persistentemente atenuadas sem o uso de fármacos. Monfils e colaboradores desenvolveram o procedimento então chamado de *reactivation-extinction*, onde a longa reexposição ao CS característica da extinção é conduzida dentro da janela de

reconsolidação, 1h depois da evocação por uma breve reexposição de 3min ao CS. O fato de os animais não expressarem medo nos testes de *renewal*, *reinstatement* e recuperação espontânea suportam a hipótese de que o traço original foi atualizado com a informação de segurança do protocolo de extinção. O experimento foi replicado com sucesso por vários autores, inclusive em humanos (Clem e Haganir, 2010; Rao-Ruiz et al., 2011; Schiller et al., 2010); entretanto, outros não obtiveram resultados convincentes (Constanzi et al., 2011; Kindt e Soeter, 2013). Estes achados contraditórios provavelmente se devem às condições limitantes (*boundary conditions*) da reconsolidação, que ditam que o processo da desestabilização de uma memória depende da sua força e idade (Suzuki et al. 2008; Wang et al., 2009).

Aqui, nós utilizamos uma nova abordagem: o *descondicionamento*. Ao conduzirmos as reativações com o auxílio de um US muito fraco, em vez de apenas o CS, conseguimos eliminar persistentemente a memória aversiva criada por treinos de intensidade média (fig. 1) e forte (fig. 3). Nós supomos que a reexposição ao US altere as *boundary conditions*, de forma que mesmo uma memória forte e recente possa assim ser desestabilizada e atualizada com uma nova informação de segurança. Os baixíssimos índices de *freezing* nos testes de *renewal* e recuperação espontânea (fig. 1D-E; fig. 3D-E) sustentam essa hipótese.

Uma premissa básica da reconsolidação é o *erro de predição*. Para que a evocação de uma memória a desestabilize, uma incompatibilidade entre o que é esperado baseado em experiências anteriores e o que realmente acontece é necessária (Rescorla e Wagner, 1972); ou seja, a reconsolidação só ocorre quando há possibilidade de um novo aprendizado durante a reativação (Sevenster et al., 2013). Esse fenômeno pode explicar por que o descondicionamento não foi capaz de atenuar uma memória fraca (fig. 2) e uma muito forte (fig. 4): no primeiro caso, os US do treino e das reativações são parecidos demais; no segundo, muito distintos.

Nossos resultados demonstram a eficácia do protocolo de descondicionamento para atenuação de memórias aversivas de diferentes intensidades. Investigar os possíveis mecanismos moleculares através dos quais o descondicionamento age é um dos próximos passos necessários para que ele possa ser mais bem entendido e aplicado, de forma que seja no futuro utilizado para o desenvolvimento de novas terapias.

5. REFERÊNCIAS

1. Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, *28*(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.001>
2. Alberini, C. M., & LeDoux, J. E. (2013). Memory reconsolidation. *Current Biology*, *23*(17), R746–R750. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.046>
3. 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. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2010.05.007>
4. Baldi, E., & Bucherelli, C. (2015). Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *53*, 160–190. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.003>
5. Bouton, M. E., Winterbauer, N. E., & Todd, T. P. (2012). Relapse processes after the extinction of instrumental learning: renewal, resurgence, and reacquisition. *Behavioural Processes*, *90*(1), 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.03.004>
6. Bowers, M. E., & Ressler, K. J. (2015). An Overview of Translationally Informed Treatments for Posttraumatic Stress Disorder: Animal Models of Pavlovian Fear Conditioning to Human Clinical Trials. *Biological Psychiatry*, *78*(5), E15-27. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.06.008>
7. Brunet, A., Orr, S. P., Tremblay, J., Robertson, K., Nader, K., & Pitman, R. K. (2008). Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, *42*(6), 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2007.05.006>
8. Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M. B., & Blandina, P. (2006). Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *13*(4), 426–430. <https://doi.org/10.1101/lm.326906>
9. Chan, W. Y. M., Leung, H. T., Westbrook, R. F., & McNally, G. P. (2010). Effects of recent exposure to a conditioned stimulus on extinction of Pavlovian fear conditioning. *Learning & Memory*, *17*(10), 512–521. <https://doi.org/10.1101/lm.1912510>
10. Clem, R. L., & Huganir, R. L. (2010). Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science*, *330*(6007), 1108–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1195298>
11. Costanzi, M., Cannas, S., Sarauilli, D., Rossi-Arnaud, C., & Cestari, V. (2011). Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *18*(8), 508–518. <https://doi.org/10.1101/lm.2175811>
12. Daskalakis, N. P., Yehuda, R., & Diamond, D. M. (2013). Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(9), 1895–1911. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.006>
13. De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quilfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, *244*, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>

14. Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, *55*(1), 51–86.
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
15. Duvarci, S., & Nader, K. (2004). Characterization of Fear Memory Reconsolidation. *Journal of Neuroscience*, *24*(42), 9269–9275.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2971-04.2004>
16. Effting, M., & Kindt, M. (2007). Contextual control of human fear associations in a renewal paradigm. *Behaviour Research and Therapy*, *45*(9), 2002–2018.
<https://doi.org/10.1016/j.brat.2007.02.011>
17. Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(2), 119–130.
<https://doi.org/10.1038/nrn1607>
18. Giustino, T. F., Fitzgerald, P. J., & Maren, S. (2016). Revisiting propranolol and PTSD: Memory erasure or extinction enhancement? *Neurobiology of Learning and Memory*, *130*, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.009>
19. Golkar, A., Bellander, M., & Öhman, A. (2013). Temporal properties of fear extinction--does time matter? *Behavioral Neuroscience*, *127*(1), 59–69.
<https://doi.org/10.1037/a0030892>
20. Gräff, J., Joseph, N. F., Horn, M. E., Samiei, A., Meng, J., Seo, J., ... Tsai, L.-H. (2014). Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell*, *156*(1–2), 261–276.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.020>
21. Haubrich, J., & Nader, K. (2016). Memory Reconsolidation. In *Current topics in behavioral neurosciences* (Vol. 37, pp. 151–176).
https://doi.org/10.1007/7854_2016_463
22. Kindt, M., & Soeter, M. (2013). Reconsolidation in a human fear conditioning study: a test of extinction as updating mechanism. *Biological Psychology*, *92*(1), 43–50.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2011.09.016>
23. Kindt, M., Soeter, M., & Sevenster, D. (2014). Disrupting Reconsolidation of Fear Memory in Humans by a Noradrenergic β-Blocker. *Journal of Visualized Experiments*, (94). <https://doi.org/10.3791/52151>
24. Kirkpatrick, H. A., & Heller, G. M. (2014). Post-Traumatic Stress Disorder: Theory and Treatment Update. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, *47*(4), 337–346.
<https://doi.org/10.2190/PM.47.4.h>
25. Lee, J. L. C. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in Neurosciences*, *32*(8), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.002>
26. Luyten, L., & Beckers, T. (2017). A preregistered, direct replication attempt of the retrieval-extinction effect in cued fear conditioning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *144*, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.07.014>
27. McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science (New York, N.Y.)*, *153*(3742), 1351–1358.
28. Meir Drexler, S., Merz, C. J., Hamacher-Dang, T. C., Tegenthoff, M., & Wolf, O. T. (2015). Effects of Cortisol on Reconsolidation of Reactivated Fear Memories. *Neuropsychopharmacology*, *40*(13), 3036–3043. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.160>
29. Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, *36*(3), 521–525.

30. Monfils, M.-H., Cowansage, K. K., Klann, E., & LeDoux, J. E. (2009). Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. *Science*, 324(5929), 951–955. <https://doi.org/10.1126/science.1167975>
31. Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120–150. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001939>
32. Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
33. Nawijn, L., van Zuiden, M., Frijling, J. L., Koch, S. B. J., Veltman, D. J., & Olf, M. (2015). Reward functioning in PTSD: A systematic review exploring the mechanisms underlying anhedonia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 51, 189–204. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2015.01.019>
34. Oyarzún, J. P., Lopez-Barroso, D., Fuentemilla, L., Cucurell, D., Pedraza, C., Rodriguez-Fornells, A., & de Diego-Balaguer, R. (2012). Updating fearful memories with extinction training during reconsolidation: a human study using auditory aversive stimuli. *PloS One*, 7(6), e38849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038849>
35. Parsons, R. G., Riedner, B. A., Gafford, G. M., & Helmstetter, F. J. (2006). The formation of auditory fear memory requires the synthesis of protein and mRNA in the auditory thalamus. *Neuroscience*, 141(3), 1163–1170. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2006.04.078>
36. Parsons, R. G., & Ressler, K. J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*, 16(2), 146–153. <https://doi.org/10.1038/nn.3296>
37. Pitman, R. K., Sanders, K. M., Zusman, R. M., Healy, A. R., Cheema, F., Lasko, N. B., ... Orr, S. P. (2002). Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol. *Biological Psychiatry*, 51(2), 189–192.
38. Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56–72. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301555>
39. Quirk, G. J., Paré, D., Richardson, R., Herry, C., Monfils, M. H., Schiller, D., & Vicentic, A. (2010). Erasing fear memories with extinction training. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(45), 14993–14997. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4268-10.2010>
40. Rao-Ruiz, P., Rotaru, D. C., van der Loo, R. J., Mansvelder, H. D., Stiedl, O., Smit, A. B., & Spijker, S. (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nature Neuroscience*, 14(10), 1302–1308. <https://doi.org/10.1038/nn.2907>
41. Roediger, H. L., & Geraci, L. (2007). Aging and the misinformation effect: a neuropsychological analysis. *Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition*, 33(2), 321–334. <https://doi.org/10.1037/0278-7393.33.2.321>
42. Schiller, D., Levy, I., Niv, Y., LeDoux, J. E., & Phelps, E. A. (2008). From fear to safety and back: reversal of fear in the human brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(45), 11517–11525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2265-08.2008>
43. Schiller, D., Monfils, M. H., Raio, C. M., Johnson, D. C., Ledoux, J. E., & Phelps, E. A. (2010). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature*, 463(7277), 49–53. <https://doi.org/10.1038/nature08637>

44. Schiller, D., & Phelps, E. A. (2011). Does Reconsolidation Occur in Humans? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 24. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00024>
45. Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2013). Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science*, 339(6121), 830–833. <https://doi.org/10.1126/science.1231357>
46. Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2014). Prediction error demarcates the transition from retrieval, to reconsolidation, to new learning. *Learning and Memory*, 21(11), 580–584. <https://doi.org/10.1101/lm.035493.114>
47. Soeter, M., & Kindt, M. (2011). Disrupting reconsolidation: Pharmacological and behavioral manipulations. *Learning & Memory*, 18(6), 357–366. <https://doi.org/10.1101/lm.2148511>
48. Stafford, J. M., Maughan, D. K., Ilioi, E. C., & Lattal, K. M. (2013). Exposure to a fearful context during periods of memory plasticity impairs extinction via hyperactivation of frontal-amygdalar circuits. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 20(3), 156–163. <https://doi.org/10.1101/lm.029801.112>
49. Suzuki, A. (2004). Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
50. Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P. W., & Kida, S. (2008). Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 15(6), 426–433. <https://doi.org/10.1101/lm.888808>
51. Todd, T. P., Vurbic, D., & Bouton, M. E. (2014). Behavioral and neurobiological mechanisms of extinction in Pavlovian and instrumental learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 108, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.08.012>
52. Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(4), 262–275. <https://doi.org/10.1038/nrn2090>
53. Wang, S.-H., de Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature Neuroscience*, 12(7), 905–912. <https://doi.org/10.1038/nn.2350>
54. Westbrook, R. F., Iordanova, M., McNally, G., Richardson, R., & Harris, J. A. (2002). Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: two roles for context. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 28(1), 97–110.

6. ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF NEUROSCIENCE

Organization of a Regular Manuscript

Manuscripts must be written in English. The entire text should be double-spaced, including references. Submitting an incomplete manuscript or a manuscript that does not adhere to the word limits will cause a delay in review.

Multiple-part papers are discouraged. Although this arrangement is sometimes necessary, authors will often be asked to collapse multiple papers into a single manuscript.

JNeurosci now supports [extended data sets](#). Please refer to the [policy](#) on what materials are allowed. Supplemental material, such as control experiments, etc., are not considered extended data and must be included in the body of the manuscript. Submitted manuscripts must make no reference to supplemental material.

Manuscripts must include the following sections in the order listed:

- [Title Page](#)
- [Abstract](#)
- [Significance Statement](#) (120 words maximum)
- [Introduction](#) (650 words maximum, including citations)
- [Materials & Methods](#)
- [Results](#)
- [Discussion](#) (1500 words maximum, including citations)
- [References](#)
- [Legends](#)
- [Illustrations and Tables](#)

All lines of text should be numbered. Line numbers are automatically added in Microsoft Word documents.

Title Page

The first page of the manuscript should be a title page with the following:

- Title (50 word maximum)
- Abbreviated title(50 character maximum)
- Author names and affiliation, including postal codes
- Corresponding author with complete address, including an email address and postal code
- Number of pages
- Number of figures, tables, multimedia and 3D models (separately)
- Number of words for Abstract, Introduction, and Discussion (separately)
- Conflict of Interest
- Acknowledgements

Submitting and Communicating Authors: *JNeurosci* distinguishes submitting and communicating authors. The submitting author is the author who submits the manuscript. A manuscript can have

only one submitting author. The submitting author acts on behalf all other authors, and is the only author with authority to resubmit, withdraw, correct or retract manuscripts and published articles.

The corresponding author is the person identified on a published article as "corresponding author". This author is responsible for responding to reader queries about the article. While submitting author is often the corresponding author, that is not necessary. *J. Neurosci* allows either one or two authors to be designated as "corresponding author". When two are listed, no priority is given to either. Corresponding authors do not have authority to correct or retract a published article; only the submitting author as noted above.

Author Names: Authors who normally write their names in non-Latin characters may include their names in their native writing system in parentheses immediately following a transliterated version, for example, Jingbing Xue (薛晶冰). Any non-Latin languages that can be represented in Unicode characters will be accepted. This second rendering is allowed only for the original written form of a transliterated name, and may not be used to include nicknames, degrees, ranks, titles, etc. Please size the name, including the surrounding parentheses, in your manuscript .pdf file so that it can be used as a graphic to produce the name in the final article.

The name of a formal group or consortium may be included in the author list only if that group made essential contributions to the results and there is at least one individual author in addition to the group. The individual authors must be listed first followed by, "for [Group Name]". We do not allow "and [Group Name]". The group name must be spelled out. A statement in the acknowledgements may specify the contribution(s) of the group and may include a URL that provides further information about the group (such as a list of its membership), but may not list individual group members or differentiate contributions made by subgroups or individuals within the group.

Author Affiliations: Authors affiliations should be their home institutions at the time when their primary contribution to the research was made. If an author's current affiliation differs, the current affiliation may be listed as a separate paragraph in the Acknowledgements.

Acknowledgements: Acknowledgements should be used to identify all funding sources. Acknowledgements may also be used to note intellectual, technical or other assistance that does not warrant authorship. Individuals should be informed before the publication of any such acknowledgements and given the opportunity to decline the recognition. Promotional statements are not permitted. Funding sources should be listed first with any acknowledgements of assistance following.

Dedications: *JNeurosci* generally does not allow dedications. The only exception we allow is dedications to recently deceased neuroscientists who made a specific scientific contribution to the work described in the article. But in this case, the deceased should not be a co-author. We do not allow dedications to living people.

Conflict of Interest: Conflict of interest declarations are included in the Acknowledgments section. For "no conflict," the current preferred wording is: "The authors declare no competing financial interests." It is expected that authors submitting papers to *JNeurosci* are in accordance with the Society's [Policy on Conflict of Interest](#).

Abstract (250 words maximum, including citations)

The abstract should be clearly written and readily comprehensible to the broad readership of *JNeurosci*. It should provide a concise summary of the objectives, methodology (including the species studied and whether one or both sexes were included), key results, and major conclusions of the study. It should be written in complete sentences, without subheadings.

Significance Statement (120 words maximum)

The significance statement should provide a clear explanation of the importance and relevance of the research in a manner accessible to researchers without specialized knowledge in the field and informed lay readers. The Significance Statement will appear within the paper below the abstract.

Introduction (650 words maximum, including citations)

The Introduction should briefly indicate the objectives of the study and provide enough background information to clarify why the study was undertaken and what hypotheses were tested.

Materials and Methods

The materials and methods section should be brief but sufficient to allow other investigators to repeat the research (see also [Policy Concerning Availability of Materials](#)). Reference should be made to published procedures wherever possible; this applies to the original description and pertinent published modifications. The sex of subjects should be stated. If the sex of subjects is unknown, this should be stated. All companies from which materials were obtained should be listed. If materials were obtained from an individual, an affiliation for that individual should be listed. A manuscript that presents only a theory may omit the Materials and Methods section.

Starting March 2017, *JNeurosci* requires every research manuscript to include an Experimental Design and Statistical Analysis section as a subsection of the Materials and Methods that describes the experimental design and the statistical tests used in the study (see [Policy on Reporting Experimental Design and Statistical Analyses](#)).

In cases where a new method within the submission would benefit from step-by-step protocols in addition to the methods described in the article, we would encourage authors to also consider submitting a detailed protocol to [Bio-protocol](#). If you have submitted to Bio-protocol or your protocol is already published there, please reference it in the Materials and Methods section (e.g., "Preparation and analysis of crude autolytic enzyme extracts from *Staphylococcus aureus* is described in detail at Bio-protocol (Vaz and Filipe, 2015)").

Code/Software

Studies using custom code deemed central to the conclusions should include a statement, under the heading "Code Accessibility," indicating whether and how the code can be accessed, including any accession numbers or restrictions, and be cited in the references. Studies that include new software or algorithm should include a similar statement, under the heading "Software Accessibility." Authors must provide their analysis software to another scientist upon request.

JNeurosci encourages the use of links to web pages providing detailed specification for animal lines, reagents, software packages, etc., when it is impossible or impractical to include a unique

identifier or unambiguous description. URLs should be cited in parentheses in the text: e.g., "Experiments were done using C57BL mice (<http://jaxmice.jax.org/strain/013636.html>).

URLs of sites providing tutorial material (e.g., <http://en.wikipedia.org/>) are not allowed in articles because their authority and permanence cannot be verified.

URLs of personal or laboratory web sites, or dropboxes, are also prohibited because the content of such pages can easily change and visiting those pages could compromise reviewer anonymity. Published articles may include in a footnote a URL for any external web site that holds supplemental material, together with a brief description of the contents of the supplemental material added to the manuscript at time of revision.

None of the Materials and Methods may be placed in Supplemental Materials.

RRIDS

JNeurosci encourages use of Research Resource Identifiers (RRIDs) through the [Resource Identification Initiative](#), a project aimed at clearly identifying key biological resources used in the course of scientific research. The project helps address concerns of reproducibility by providing unique searchable identifiers, RRIDs, for critical reagents and tools. RRIDs can be used to link readers to external resources and enable search engines to return all papers in which a particular antibody, organism, or tool was used.

To find an RRID: visit <https://scicrunch.org/resources> and enter your search term(s).

- Antibodies: searching for the catalog number usually narrows the search to only a few relevant results.
- Cell Lines: searching for the catalog number of an established cell line is usually best, searching for common cell lines such as HeLa cells is expected to produce several pages of results.
- Organisms: you can include PubMed IDs (PMIDs) in your search or filter your search results by PMID, species, phenotype, and other criteria.
- Software tools: usually the name of the tool (MATLAB or ImageJ) or the institution where it is housed will bring back relevant results.

Search help is available at: rii-help@scicrunch.org.

Once you have located an RRID, insert "RRID:" plus the identifier in the appropriate location in the manuscript. For example:

- Antibodies: "Sections were stained with a rabbit polyclonal antibody against ERK1 (Abgent Cat# AP7251E, RRID: AB_2140114)."
- Cell Lines: "Subjects include the following cell line: CLS Cat# 300384/p699_HeLa_S3, RRID:CVCL_0058."
- Genetically modified organisms: "Subjects in this study were Fgf9Eks/Fgf9+ mice (RRID: MGI_3840442)..."
- Software tools: "...terminals were mapped with a computer-assisted mapping program (NeuroLucida, v 10; MicroBrightField RRID:nif-0000-10294)."

If you cannot find an RRID for a model organism or antibody that you used, you can submit the reagent so that it can be given proper identifiers for future use at the [Resource Identification](#)

[Portal](https://scicrunch.org/resources/about/guidelines#organism) (instructions at <https://scicrunch.org/resources/about/guidelines#organism> [for a new organism] <http://antibodyregistry.org/add> [for antibodies]). Note that login is required on that site.

Journal Style Guidelines

Manuscripts with many mathematical characters and equations should be prepared using MathType version 6.0 or higher (available from [Design Science, Inc.](#)). Our publisher can pull equations in this format directly from the text, thereby avoiding typographical errors that frequently occur in composing equations. Manuscripts with a minimal amount of math may be prepared using word-processing tools such as Word's Equation Editor, or with features such as bold, italics, superscript and subscript together with characters in the Symbol or Greek fonts. Do not use the Wingdings or Webdings fonts.

[List of Some Standard Abbreviations](#)

Nonstandard abbreviations should be used only if a term appears two or more times. Spell out the term at first occurrence, and introduce the abbreviation by placing it in parentheses after the term. Units should conform to the International System of Units (SI) (see the [International System of Units Brochure](#)), except for temperatures, which should be expressed in degrees Celsius.

Re-Analysis of Published Data

Reanalyses of published data are allowed if the original study reporting the data collection is clearly and thoroughly cited, if there are no duplications of figures or graphs that have already been published, and if the study clearly acknowledges that this is a previously acquired data.

Results

This section should present the experimental findings, clearly and succinctly. Only results essential to establish the main points of the work should be included.

Numerical data should be analyzed using appropriate statistical tests. Authors must provide detailed information for each statistical test applied including: the type of test; specific p values (not > or <); degrees of freedom; population size; definition of population (e.g., number of individual measurements, number of animals of each sex, number of slices, number of times treatment was applied, etc.); and if performed, what correction was used to adjust for multiple pairwise comparisons.

Starting March 2017, JNeurosci requires every research manuscript to report in full the complete results of the statistical analyses, including degrees of freedom and any estimates of effects size, should be reported in the Results section. Report exact p values rather than ranges (e.g. $p = 0.026$ rather than $p < 0.05$). There are many types of analyses that can be reported, but examples include F values ($F(1, 72) = 14.5, p = 0.003$, ANOVA), t values ($t(10) = 2.98, p = 0.043$, paired t-test), coefficient of determination (R^2), and Bayes factors.

The Journal of Neuroscience encourages authors to report all data in addition to traditional line and bar graphs, using histograms, scatter plots or other means to represent the variability and complexity of the data.

If the raw data are freely available please state this and how to find them. In addition, if you have pre-registered your study, please state that in the Experimental Design.

The following resources offer helpful guidelines on how to report statistical results:

- Hesson-McInnis, American Psychological Association. (2010) Publication manual of the American Psychological Association (6th ed.). Washington, DC. http://my.ilstu.edu/~mshesso/apa_stats.htm
- Curran-Everett & Benos Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Physiological Genomics* (2004) 18(3): 249-251 <http://physiolgenomics.physiology.org/content/18/3/249>
- Sarter M, Fritschy JM. [Reporting statistical methods and statistical results in EJN](#). *Eur J Neurosci*. 2008 Dec;28(12):2363-2364

([see Policy on Reporting Experimental Design and Statistical Analyses](#)).

Discussion (1500 words maximum, including citations)

The discussion section should be as concise as possible and should include a brief statement of the principal findings, a discussion of the validity of the observations, a discussion of the findings in light of other published work dealing with the same or closely related subjects, and a statement of the possible significance of the work. Extensive discussion of the literature is discouraged.

References

Only published and "in press" (i.e., accepted for publication in a specific journal or book) references should appear in the reference list at the end of the paper. The latest information on "in press" references should be provided. Any "in press" references that are relevant for reviewers to see in order to make a well-informed evaluation should be included as a separate document text file along with the submitted manuscript. "Submitted" references should be cited only in text and in the following form: (A. B. Smith, C. D. Johnson, and E. Greene, unpublished observations). The form for personal communications is similar: (F. G. Jackson, personal communication). Authors are responsible for all personal communications and must obtain written approval from persons cited before submitting the paper to *JNeurosci*. Proof of such approval may be requested by *JNeurosci*. Published abstracts that are publicly available may be cited.

References should be cited in the text as follows: "The procedure used has been described elsewhere (Green, 1978)," or "Our observations are in agreement with those of Brown and Black (1979) and of White et al. (1980)," or with multiple references, in chronological order: "Earlier reports (Brown and Black, 1979, 1981; White et al., 1980; Smith, 1982, 1984).... "

In the [list of references](#) papers should be given in alphabetical order according to the surname of the first author. In two-author papers with the same first author, the order is alphabetical by the second author's name. In three-or-more-author papers with the same first author, the order is chronological. The name of the author(s) should be followed by the date in parentheses, the full title of the paper as it appeared in the original together with the source of the reference, the volume number, and the first and last pages. Do not number or bullet the references. If the author list for a paper in the references exceeds 20, the paper should be cited as Author A et al. The following illustrate the format to be used:

Journal article

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952a) The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 116:473-496.

Hodgkin AL, Huxley AF (1952b) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 116:497-506.

Book

Hille B (1984) *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer.

Chapter in a book

Stent GS (1981) Strength and weakness of the genetic approach to the development of the nervous system. In: *Studies in developmental neurobiology: essays in honor of Viktor Hamburger* (Cowan WM, ed), pp288-321. New York: Oxford UP.

Abbreviations of journal titles should follow those listed in the *Index Medicus*. Responsibility for the correctness of the references lies with the author(s). After manuscript revisions, authors should double-check that all in-text citations are in the reference list and that all references on the reference list have at least one corresponding in-text citation. Failure to do so will result in the delay of proof generation and possibly publication. *Please make sure that the References are double-spaced and no bullets, numbers, or other listing formats are used.*

Legends

Manuscripts that include figures, tables, multimedia, and/or extended data must include legends as part of the main manuscript text. Each file must have a separate legend and be numbered independently. The text of the article should refer to figures as "Figure 1," "Figure 2," etc., tables as "Table 1," "Table 2," etc., videos as "Movie 1," "Movie 2," etc and Extended data as Figure 1-1, Figure 1-2, Table 1-1, Table 1-2, etc. These text citations of figures, tables, multimedia and extended data need to be in numerical order, in part to aid in placing the illustrations in the proper position on the PDF page. *Note:* Extended Data must be referenced in the legend of the table or figure that they support.

Illustrations and Tables

All illustrations must adhere to *JNeurosci's* [Policy on Image Manipulation](#).

JNeurosci will publish multimedia and 3D models embedded in the HTML and PDF versions of articles. Multimedia and models will be displayed in line with the article text, as is done for figures. Authors should be aware that multimedia and 3D models will be unavailable to readers who only access the printed version. See [Illustrations and Tables](#) for details on preparing material.

Tables should be included in the manuscript file, but figures, models, and 3D models must be submitted as separate files (see [Illustrations and Tables](#) for acceptable file formats).