

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Walquíria Souza Nunes

**ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FLUOXETINA ALTERA A DINÂMICA
TEMPORAL DA CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Porto Alegre

2017

WALQUÍRIA SOUZA NUNES

**ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FLUOXETINA ALTERA A DINÂMICA
TEMPORAL DA CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Walquíria Souza

ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FLUOXETINA ALTERA A
DINÂMICA TEMPORAL DA CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS / Walquíria Souza Nunes. -- 2017.
65 f.

Orientador: Lucas de Oliveira Alvares.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Memórias Aversivas. 2. Fluoxetina. 3.
Consolidação Sistêmica. 4. Generalização. I. Alvares,
Lucas de Oliveira, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

WALQUÍRIA SOUZA NUNES

**ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FLUOXETINA ALTERA A DINÂMICA
TEMPORAL DA CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Paula Lunardi - HCPA

Ms. Fernanda Nunes - UFRGS

Prof. Dr. Lucas de Oliveira Álvares - UFRGS (orientador)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Lucas de Oliveira Alvares por ter me aceito em seu laboratório. Agradeço por todo o carinho e incentivo durante esse um ano em que atuei como Iniciação Científica. Esse período da graduação foi muito especial pra mim, pois pude aprender muito e melhor como profissional e indivíduo.

Agradeço ao mestrando Bruno Popik por toda a ajuda desde o momento em que entrei no laboratório e pelo auxílio na correção do Trabalho de Conclusão de Curso. Agradeço à Lizeth Pedraza e ao Rodrigo Sierra por terem me ensinado a parte operacional de todos os experimentos em que me envolvi. Sou muito grata ao Josué Haubrich por todos os esclarecimentos de dúvidas que tive ao longo da Iniciação Científica, bem como pelas conversas e conselhos que muito me ajudaram. Agradeço à Mirelle Casagrande e Kamilla Torquato por todas as explicações e por terem sido tão atenciosas. Gostaria de agradecer à aluna de Iniciação Científica Fernanda Lotz por todo o seu carinho desde o meu primeiro dia no laboratório, muito obrigada por me ensinar, me ajudar com os experimentos, corrigir meu inglês e, principalmente, por ter sido tão amável comigo. Ademais, agradeço a todos os colegas do Laboratório da Neurobiologia da Memória e do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, orientado pelo prof. Dr. Jorge Quillfeldt, que me proporcionaram um ambiente propício ao aprendizado.

Por fim, mas não menos importante, gostaria fortemente de agradecer aos meus pais. Eles me deram todo o suporte financeiro, e diversas vezes emocional, para que eu pudesse chegar ao final da minha graduação. Como meus pais não atuam na área da saúde, muitas vezes eles não entendiam exatamente o que eu estava estudando ou no que eu estava trabalhando. Entretanto, sempre me apoiaram e me forneceram todos os subsídios necessários para que eu pudesse permanecer na faculdade. Para mim isso é, sem a menor dúvida, uma grande prova de amor.

Se não somos o nosso ideal, por que julgamos os outros tão impiedosamente?

Alessandra Luíza Pelegrini

RESUMO

A consolidação sistêmica é um processo que consiste na reorganização estrutural da memória em que informações previamente dependentes do hipocampo para evocação passam a ser dependentes de estruturas corticais. Um processo decorrente da consolidação sistêmica é a generalização, acarretando na perda de detalhes da memória original. A generalização excessiva é uma das principais características do Transtorno do Estresse Pós-Traumático e, portanto, um relevante parâmetro a ser analisado. A fluoxetina (FLX), um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, é um dos principais medicamentos no tratamento dessa desordem e apesar de compreendermos sua ação farmacológica, o mecanismo envolvido na melhora dos sintomas continua desconhecido. Portanto, nós investigamos os efeitos da administração crônica de FLX na consolidação sistêmica de memórias aversivas, bem como sua repercussão na plasticidade hipocampal a partir da análise de espinhos dendríticos, que são considerados estruturas chaves nos processos mnemônicos. Para isso, ratos *Wistar* machos foram treinados no Condicionamento Aversivo ao Contexto e, posteriormente, receberam tratamento crônico de FLX ou salina. Foi observado que o tratamento crônico de FLX impediu a generalização e manteve a dependência hipocampal da memória aversiva. Também foi visto diferenças na quantidade de cada tipo de espinho dendrítico analisado (*mushroom*, *stubby* e *thin*), indicando que o tratamento crônico de FLX apresenta um possível efeito na morfologia dos espinhos. Interessantemente, é possível observar um aumento na quantidade do tipo *mushroom*, que é considerado o tipo mais maduro dentre os espinhos dendríticos. Esses resultados indicam que o tratamento crônico de FLX aumenta a dinâmica temporal da consolidação sistêmica. Acreditamos que tratamentos farmacológicos que mudem a dinâmica da consolidação sistêmica podem ser efetivos na atenuação de memórias aversivas. Sendo assim, estudos que envolvam o tratamento crônico de FLX se tornam uma interessante estratégia farmacológica para um melhor entendimento dos processos celulares, moleculares e estruturais da estabilização do traço mnemônico.

Palavras-chave: consolidação sistêmica, fluoxetina, Condicionamento Aversivo ao Contexto, precisão, espinho dendrítico.

ABSTRACT

Systems consolidation is process where there is structural reorganization of memory in which information dependent on the hippocampus for retrieval becomes dependent on cortical structures. Simultaneously with systemic consolidation occurs the memory generalization, where there is a loss of details of the original memory. Overgeneralization is one of the most important characteristic of the Posttraumatic Stress Disorder and a relevant parameter to be analyzed. Fluoxetine (FLX), a selective serotonin reuptake inhibitor, is one of the main pharmacological PTSD treatment and although we know its pharmacological action, the mechanisms underlying its effect in anxiety disorders are still unclear. Accordingly, we investigated the effects of FLX chronic administration on fear memory systems consolidation, as well as their repercussion on hippocampal plasticity by dendritic spines analysis, which are considered fundamental structures in the mnemonic processes. To this end, male Wistar rats were trained in the Contextual Fear Conditioning and then, subjected to chronic FLX treatment or saline during. Chronic FLX treatment prevented fear memory generalization and maintained it dependent on the hippocampus. There were significant differences regarding the quantity of each type of dendritic spine analyzed (*mushroom*, *stubby* e *thin*), it indicates that chronic FLX treatment affects spine morphology. Interestingly, it was possible to observe an increased amount of mushroom type, which is considered the most mature type among the dendritic spines. Taken together, we found that chronic FLX treatment prolongs the temporal dynamics of the systemic consolidation. We believe that pharmacological treatments change dynamics of systemic consolidation may be effective in attenuating aversive memories. Thus, studies involving the chronic treatment of FLX become an interesting pharmacological strategy for a better understanding at the cellular, molecular and structural processes of the stabilization of the memory trace.

Keywords: systemic consolidation, fluoxetine, contextual fear conditioning, precision, dendritic spine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Memórias do Longo Prazo Declarativas e Não-Declarativas.....	14
Figura 2 - Exemplos de Memórias Declarativas.....	15
Figura 3 - Exemplos de Memórias Não-Declarativas.....	15
Figura 4 – Classificação da Memória e Exemplos de Testes Comportamentais.....	16
Figura 5 – Esquema Representativo das Fases da Memória.....	17
Figura 6 - Desenho Esquemático do Hipocampo de Ratos <i>Wistar</i> em Corte Coronal.....	18
Figura 7 - Representação Esquemática das Subdivisões da Amígdala Relacionada com Memórias Aversivas, em ratos <i>Wistar</i>	19
Figura 8 – Tipos de Consolidação e sua Relação Tempo-Dependente.....	20
Figura 9 – Projeções entre o Hipocampo, a Amígdala e o ACC nas Diferentes Fases da Memória.....	22
Figura 10 – Modelo Padrão da Consolidação Sistêmica.....	22
Figura 11 - Modelo da Consolidação Sistêmica.....	24
Figura 12 - Desenho Esquemático Mostrando a Diferença Morfológica entre os Principais Tipos de Espinho Dendrítico.....	25
Figura 13 – Esquema Mostrando a Organização Estrutural dos Espinhos.....	26
Figura 14 – Dinâmica da Actina com a Indução de LTP garantindo o Aumento da Cabeça e a Inserção de Receptores na Cabeça do Espinho Dendrítico.....	27
Figura 15 – Estrutura Química da Serotonina.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – córtex cingulado anterior (do inglês, *anterior cingulate cortex*)

AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

CA1 - Corno de Amon subregião 1

CA2 - Corno de Amon subregião 2

CA3 - Corno de Amon subregião 3

CAC – Condicionamento Aversivo ao Contexto

CPF – Córtex Pré-Frontal

FLX – Fluoxetina

GD – Giro Denteado

HD – hipocampo dorsal

NMDA - N-metil-D-aspartato

PSD - densidade pós-sináptica (do inglês, *postsynaptic density*)

SNC – Sistema Nervoso Central

TEPT – Transtorno do Estresse Pós-Traumático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA MEMÓRIA.....	12
1.2.1 Classificação da Memória Baseado em Sua Duração	12
1.2.2 Classificação da Memória Baseado em Seu Conteúdo	14
1.2.3 Classificação da Memória Baseado na Sua Natureza.....	16
1.2 FASES DA MEMÓRIA	17
1.2.1 Aquisição	18
1.2.2 Consolidação	20
1.3 ESPINHOS DENDRÍTICOS	24
1.3.1 Morfologia.....	25
1.3.2 Plasticidade e Espinhos Dendríticos.....	26
1.4 PRECISÃO E GENERALIZAÇÃO.....	27
1.5 FLUOXETINA E MEMÓRIAS AVERSIVAS	29
1.5.1 Tratamento de Fluoxetina e Alterações no SNC	30
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 ARTIGO CIENTIFICO.....	33
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
6 REFERÊNCIAS	54
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA HIPPOCAMPUS	61

1 INTRODUÇÃO

1.2 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA MEMÓRIA

A memória permite o armazenamento de informações oriundas do ambiente em que somos expostos, tendo uma fundamental importância para adaptação ao meio em que vivemos (TONEGAWA *et al.*, 2015). A formação de uma memória não é um processo instantâneo e seu estabelecimento pode ser classicamente dividido nos processos de aquisição, consolidação e evocação (POO *et al.*, 2016). A aquisição de uma informação pode desencadear certas alterações moleculares e estruturais que permitem a formação do traço da memória ou engrama. O desenvolvimento do engrama ocorre devido ao fortalecimento de conexões sinápticas em certos neurônios, possibilitando assim o armazenamento de informações (JOSSELYN *et al.*, 2015).

Segundo Izquierdo (2011), “o acervo das memórias de cada um nos converte em indivíduos”, portanto fica claro a dimensão e a importância do entendimento dos processos mnemônicos. Em virtude disso, há décadas buscamos compreender as bases neurais da memória, para entendermos onde e quais são os mecanismos estão envolvidos no armazenamento das informações (Josselyn S. *et al.*, 2017). Para facilitar o estudo da memória, podemos classificá-la de acordo com sua duração (curta ou longa duração), seu conteúdo (declarativas ou não-declarativas) e sua natureza (associativa ou não-associativa).

1.2.1 Classificação da Memória Baseado em Sua Duração

Há mais de um século nos perguntamos por que algumas informações perduram por toda a vida enquanto outras são passageiras (JAMES, 1890). Essa pergunta é intrigante uma vez que estamos constantemente recebendo estímulos do ambiente, mas nem todas as informações são armazenadas pelo mesmo período (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011). Sabemos que fatores emocionais durante a aquisição, tais como a liberação de hormônios relacionados com o estresse (JOELS *et al.*, 2011; SCHWABE *et al.*, 2012) e a ativação de certas estruturas encefálicas (como por exemplo, algumas regiões da amígdala) (ROOZENDAAL *et al.*, 2009) são importantes mecanismos que afetam a consolidação da memória. Por consequência, esses fatores emocionais podem modular a persistência da memória (McGAUGH, 2000; LaLUMIERE *et al.*, 2017) ou simplesmente levar ao esquecimento de forma mais ativa (SACHSER *et al.*, 2016). Sendo assim, podemos classificar as memórias de

acordo com sua duração, sendo elas a memória de trabalho, memória de curta duração (STM, do inglês *short term memory*) e memória de longa duração (LTM, do inglês *long term memory*).

As memórias que duram poucos segundos são denominadas memória de trabalho, memória imediata ou ainda memória operacional. É a partir dela que temos a capacidade de saber onde estávamos e o que estávamos fazendo há poucos segundos garantindo a continuidade de nossas ações. Sua função está associada com o gerenciamento da realidade e esse tipo de memória não deixa traço bioquímico nem é consolidada (DIAMOND, 2013). Um bom exemplo desse tipo de memória é quando escutamos o número de um telefone e em poucos segundos não recordamos a sequência numérica.

Já a STM e LTM alteram a dinâmica de receptores e proteínas responsáveis pela memória, deixando assim um traço bioquímico nos neurônios tornando-se mais duradouras que a memória de trabalho. Normalmente, a STM dura de uma a seis horas, enquanto a LTM pode perdurar por meses ou anos. Devido a essa diferença temporal, durante décadas buscou-se compreender se a LTM seria uma decorrência da STM ou se os dois fenômenos aconteciam paralelamente (NORRIS, 2017). Atualmente, existem vários trabalhos mostrando que esses processos também podem ocorrer de modo separado e independentemente um do outro. De fato, existem diferentes mecanismos moleculares e eletrofisiológicos entre esses dois tipos de memória, mesmo compartilhando as mesmas estruturas encefálicas (IZQUIERDO *et al.*, 1999; MEDINA *et al.*, 1999; VIANNA *et al.*, 2000).

Após a aquisição, a memória pode passar por processos que culminam na formação de memória de longa duração. Para que isso ocorra, duas etapas são importantes. A primeira consiste em alterações significativas entre os neurônios pré e pós-sinápticos garantindo o fortalecimento de conexões sinápticas e a segunda ocorre a partir do processo relacionado com a estabilização da memória (ROUTTENBERG, 2008). Corroborando com isso existe uma grande riqueza de estudos na literatura apontando que mecanismos de potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) e de depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*), estão diretamente relacionados com a formação da memória em nível sináptico (MORRIS *et al.*, 1986; MALENKA, 2004; LYNCH, 2004; NABAVI *et al.*, 2014; KANDEL *et al.*, 2014). Além disso, é na fase da consolidação sistêmica da memória que ocorre a estabilização do traço mnemônico, garantindo sua futura evocação (McGAUGH, 2000; DUDAI, 2004).

Memórias remotas podem perdurar por toda a nossa vida e podem ser adquiridas, por exemplo, a partir de eventos traumáticos que ocasionam o surgimento de memórias de medo. Esse tipo de memória possui um fator emocional e são muito resistentes à manipulações e

possíveis tratamentos (BERGSTROM, 2016; IZQUIERDO *et al.*, 2016). A memória de medo apresenta características marcantes, sendo rapidamente consolidada e pode permanecer intacta por toda a vida (GALE *et al.*, 2004). Esse tipo de memória tem a capacidade de moldar nosso comportamento perante aos estímulos advindos do ambiente, uma vez que é de suma importância para a nossa sobrevivência lembrar se um dado estímulo ou local apresenta algum possível perigo. Apesar de importantes para nossa adaptação e proteção, em certos casos as memórias de medo são mal adaptativas e estão envolvidas no desencadeamento de desordens de ansiedade e transtornos relacionados à traumas, como no Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT).

1.2.2 Classificação da Memória Baseado em Seu Conteúdo

As memórias de longa duração podem ser subdivididas em declarativas e não-declarativas (Fig. 1). As memórias declarativas, também denominada memória explícita, são aquelas relacionadas a fatos (memória semântica) ou eventos (memória episódica). Já as memórias não-declarativas, também denominadas memórias implícitas, são aquelas relacionadas principalmente com procedimentos e aprendizados associativos e não-associativos (SQUIRE, 2015).

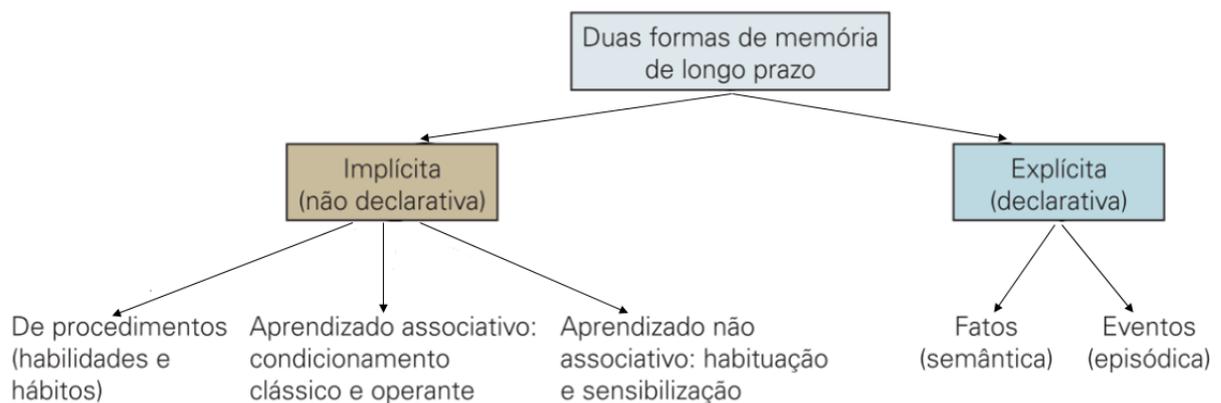


Figura 1 – Memórias do longo prazo declarativas e não-declarativas (Adaptado de KANDEL *et al.*, 2014)

As memórias semânticas estão relacionadas com conceitos ou fatos e não apresentam nenhuma relação com experiências vividas. Um exemplo seria informações sobre capitais ou países. Já as memórias episódicas estão relacionadas com eventos vividos pelos indivíduos, elas apresentam informações relacionadas com uma sequência temporal de acontecimentos, bem

como possíveis emoções envolvidas a essas situações. Um exemplo de memória episódica pode ser um casamento (Fig. 2) (SQUIRE; DEDE, 2015).



Figura 2 - Exemplos de memórias declarativas (Adaptado de BEAR *et al.*, 2008)

Já as memórias não-declarativas (também denominada memória implícita) referem-se as memórias que não podem ser evocadas conscientemente (SQUIRE, 2004). Dentre as possíveis divisões desse tipo de memória estão a memórias de procedimento, que é a formação de uma habilidade ou hábito como a capacidade de tocar algum instrumento, e as memórias advindas de um condicionamento clássico (Fig. 3).



Figura 3 - Exemplos de memórias não-declarativas (Adaptado de BEAR *et al.*, 2008)

1.2.3 Classificação da Memória Baseado na Sua Natureza

Uma outra classificação mnemônica poder ser feita a partir da natureza da memória, sendo ela associativa ou não-associativa. A memória associativa é originada de uma conexão entre um estímulo e uma resposta gerando um condicionamento (QUILLFELDT, 2006). Podemos estudar memórias associativas utilizando modelos animais em diversas metodologias, dentre elas, destaca-se o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) (Fig. 4).

Desta forma, no condicionamento clássico para o estudo da memória de medo é necessário a associação entre um estímulo condicionado e um estímulo incondicionado. O estímulo condicionado (CS, do inglês *conditioned stimulus*) que pode ser, por exemplo, uma luz, um tom ou um ambiente. Já o estímulo incondicionado (US, do inglês *unconditioned stimulus*) que pode ser, por exemplo, um alimento ou um choque (IZQUIERDO *et al.*, 2016). No teste pavloviano CAC, o ambiente no qual o animal se encontra (CS) se torna preditor de uma consequência aversiva, o choque nas patas do roedor (US).

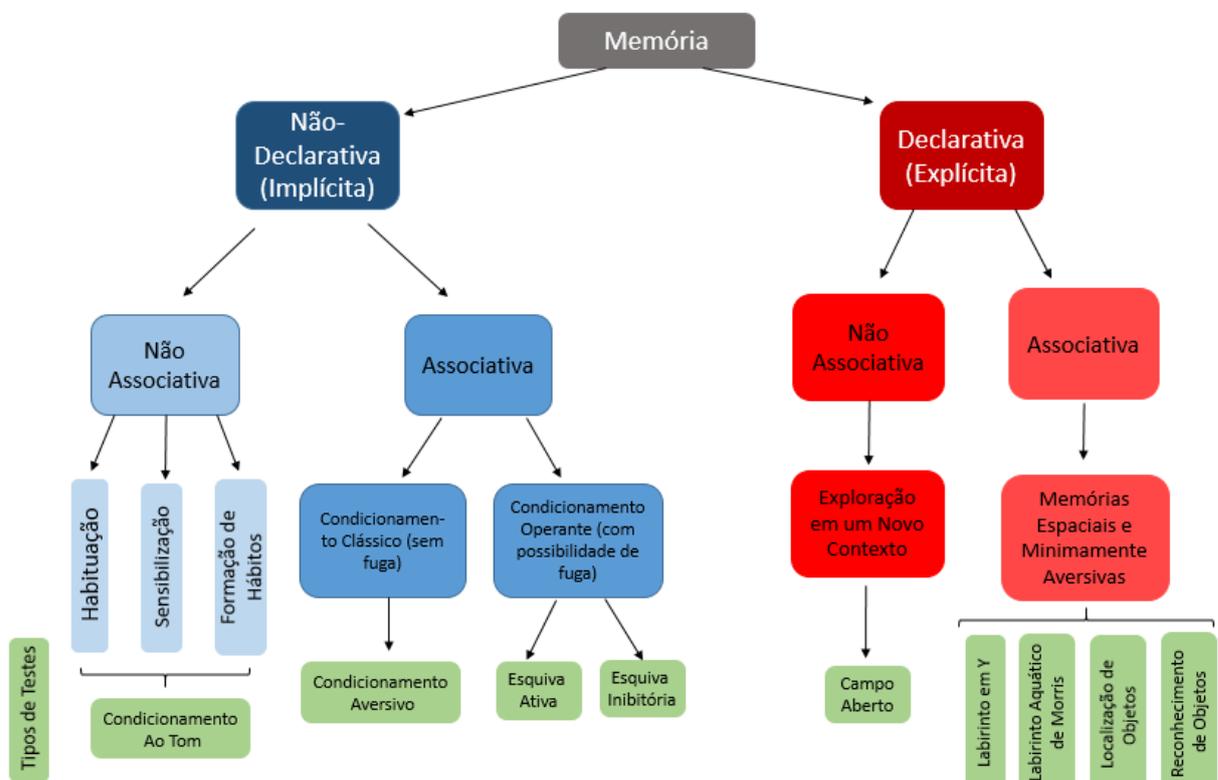


Figura 4 – Classificação da memória e exemplos de testes comportamentais (Adaptado de QUILLFELDT 2006)

Uma vez que essa tarefa comportamental não possibilita a fuga do animal, ocorre o desencadeamento de uma resposta comportamental que antecede o estímulo aversivo. Esse comportamento é a resposta de congelamento (em inglês esse comportamento é denominado *freezing*). O comportamento de congelamento é definido como a ausência total de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969). Normalmente, associado à imobilidade do animal também é possível observar a ausência de movimento das vibrissas e as orelhas se apresentam retraídas. No CAC, o animal associa um ambiente inicialmente neutro com um estímulo aversivo e a consequência é uma resposta comportamental de medo toda vez que ele é colocado nesse contexto. O tempo gasto com esse comportamento pode ser mensurado e considerado como uma manifestação da memória aversiva.

O condicionamento clássico é um teste comportamental muito interessante, uma vez que esse aprendizado se assemelha com eventos ocorridos com seres humanos. Um estímulo considerado neutro pode se transformar em ameaçador caso haja alguma combinação com estímulos aversivos (IZQUIERDO *et al.*, 2016). Um exemplo seria a vivência de uma situação violenta ou ameaçadora em um transporte coletivo, como um assalto. Em condições normais, o transporte coletivo não se apresenta como um local aversivo, entretanto sua associação com um evento traumático pode desencadear uma resposta de medo sempre que o indivíduo precisar utilizar esse meio de transporte.

1.2 FASES DA MEMÓRIA

A formação da memória não é um fenômeno instantâneo e pode ser classicamente dividida nas fases de aquisição, consolidação e evocação (Fig. 5). Após o aprendizado (aquisição), a informação é lentamente estabilizada e armazenada (consolidação) sendo disponível para futuramente ser lembrada (evocação).



Figura 5 – Esquema representativo das fases da memória (Adaptado de Quillfeldt, 2006)

1.2.1 Aquisição

A aquisição é a fase relacionada com o aprendizado e é nessa etapa que ocorre o processamento inicial das informações. Muitos estudos visam compreender como ocorre a associação entre o CS e o US, bem como os processos moleculares envolvidos na etapa de aprendizado de uma memória aversiva (ABEL; LATTAL, 2001). Em geral, duas das principais estruturas encefálicas envolvidas na aquisição da memória de medo são o hipocampo e a amígdala (IZQUIERDO *et al.*, 2016).

O hipocampo é responsável pela memória espacial e contextual. Essa estrutura está localizada na porção medial do lobo temporal e é formada por duas regiões interligadas chamadas de giro denteado e Corno de Amon (CA), sendo esse último subdividido em outras três partes CA1, CA2 e CA3 (TAUBE *et al.*, 1990) (Fig. 6). A principal aferência para o hipocampo origina-se no córtex entorrinal e segue até os neurônios granulares da camada molecular do giro denteado, a chamada via perforante (MOLTER; YAMAGUCHI, 2008). Os axônios desses neurônios granulares constituem as fibras musgosas que projetam-se para os neurônios piramidais da região de CA3 (CHEVALEYRE; SIEGELBAUM, 2010). Por sua vez, os axônios de CA3 conectam-se também com neurônios piramidais de CA1 e CA2, a chamada via colateral de Schaffer. Os axônios de CA1 projetam-se para o complexo subicular e então para as camadas profundas do córtex entorrinal (VAN HAEFEN *et al.*, 2003). O circuito córtex entorrinal – giro denteado – CA3 – CA1 é tradicionalmente denominado via tri-sináptica e utiliza o glutamato como principal neurotransmissor (WITTER *et al.*, 2014). Segundo Liu e colaboradores (2017), os neurônios piramidais da região CA1 são essenciais para o processo de aquisição de uma memória, uma vez que apresentam uma elevada plasticidade neuronal que permite a aquisição da memória contextual.

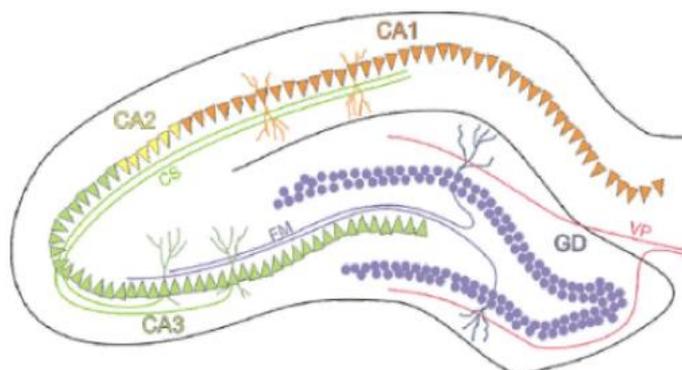


Figura 6 - Desenho esquemático do hipocampo de ratos *Wistar* em corte coronal. Representação dos neurônios granulares do giro denteado (GD), dos neurônios piramidais do Corno de Amon (CA), subdividido nas regiões CA1, CA2 e CA3. Representando a via trissináptica do hipocampo. Os axônios provenientes do córtex entorrinal constituem a via perfurante (VP). Os axônios dos neurônios granulares, denominados fibras musgosas (FM). Os axônios dos neurônios piramidais de CA3, que constituem as colaterais de Schaffer (CS) (Retirado de ARISI, 2007).

Outra estrutura chave para a aquisição de uma memória aversiva é a amígdala. Esta estrutura está localizada profundamente no lobo temporal e recebe informações sobre o ambiente a partir do tálamo e dos córtices sensoriais (McDONALD, 1998). A amígdala é composta por grupos heterogêneos de núcleos e subnúcleos: o complexo basolateral (BLA) - formado pelos grupos de células lateral (LA), basal (BA) e basomedial (BM) e o núcleo central da amígdala (CeA) – constituído pela subdivisão lateral (CeL) e medial (CeM) (Fig. 7) (SWANSON; PETROVICH, 1998; JANAK; TYE, 2015). O BLA consiste principalmente em neurônios glutamatérgicos e interneurônios inibitórios, mantendo conexões com regiões como o córtex pré-frontal orbital, córtex hipocampal e áreas de associação sensoriais (McDONALD, 1998). Os neurônios do núcleo CeA são principalmente GABAérgicos, com o núcleo CeL projetando para o núcleo CeM (JANAK; TYE, 2015).

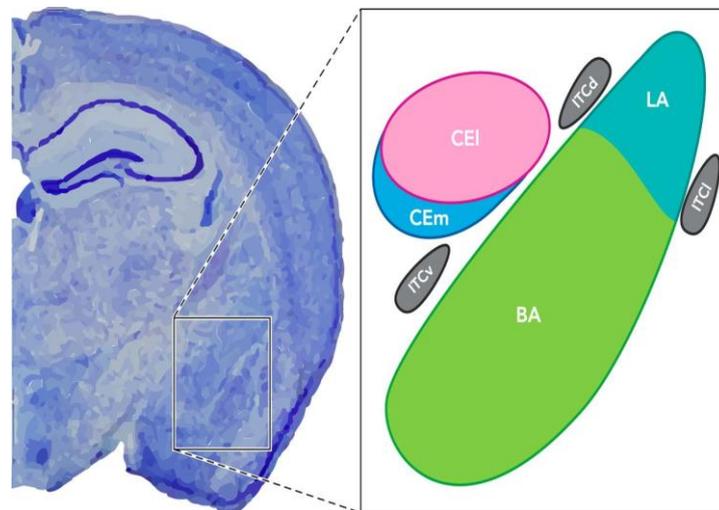


Figura 7 - Representação esquemática das subdivisões da amígdala relacionada com memórias aversivas, em ratos *Wistar*. O complexo basolateral (BLA), formado pelos núcleos basal (BA) e lateral (LA). O núcleo central da amígdala (CeA), composto pelos núcleos medial (CeM) e lateral (CeL). Os grupos de células intercalares incluem os grupos dorsal (ITCd), ventral (ITCv) e lateral (ITCl) (Retirado de KEIFER *et al.*, 2015).

1.2.2 Consolidação

É durante a consolidação que as informações adquiridas são progressivamente internalizadas e estabilizadas possibilitando o seu armazenamento (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). Em 1900, o conceito de consolidação da memória foi introduzido por Mueller e Pilzecker, mas apenas por volta de meio século depois essa hipótese ganhou atenção. Ao longo do tempo, outros estudos surgiram sobre o processo de consolidação da memória (McGAUGH, 1966; BONTEMPI *et al.*, 1999; McGAUGH, 1999; McGAUGH, 2000; DASH *et al.*, 2004; KITAMURA *et al.*, 2017).

A consolidação da memória é dependente de síntese de proteínas e da ativação dos neurônios glutamatérgicos (DUDAI, 2004). A consolidação envolve uma reorganização tanto em níveis sinápticos como sistêmicos que tradicionalmente é associada ao fator tempo (Fig. 8) (DUDAI *et al.*, 2015). Apesar de essa informação ser verdadeira, atualmente sabemos que muitos parâmetros podem interferir na dinâmica temporal do processo de consolidação das memórias, tais como a intensidade do treino, demonstrado por Pedraza e colaboradores (2016).

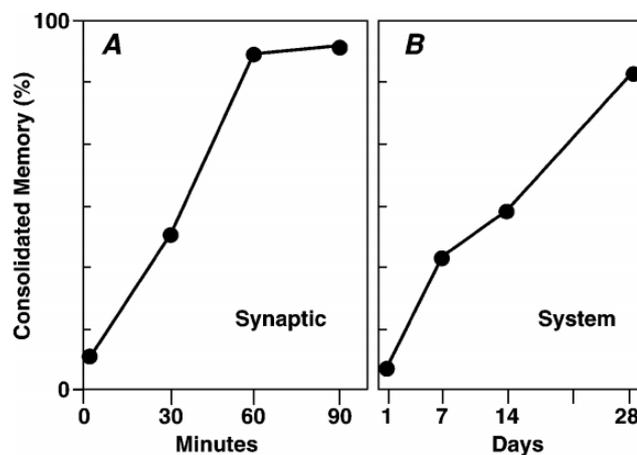


Figura 8 – Tipos de consolidação e sua relação tempo-dependente (Retirado de DUDAI, 2004)

1.2.2.1 Consolidação Sináptica

Após a aquisição, a memória passa por um processo de estabilização que envolve a consolidação sináptica (DUDAI, 2004). Durante esse período, o traço mnemônico está suscetível a modulações, como o seu fortalecimento ou enfraquecimento. Sendo assim, qualquer evento que prejudique o processo de estabilização afetará a sua persistência (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005).

Na consolidação sináptica, algumas memórias são estocadas de maneira mais eficiente do que outras. A base central da consolidação sináptica são as alterações na força sináptica em que alguns processos celulares estão envolvidos, tais como a modificações pós-traducional de proteínas sinápticas, ativação de fatores de transcrição, reorganização de receptores de membrana, elementos do citoesqueleto (DUDAI, 2004; DUDAI, 2012), bem como em modificações nos espinhos dendríticos (KASAI *et al.*, 2010).

1.2.2.2 Consolidação Sistêmica

Após os processos de aquisição e a consolidação sináptica, o traço da memória pode ser armazenado por meses ou mesmo por anos. Durante esse período, a memória não permanece estática no encéfalo, mas sim plausível de ser transformada e reorganizada (KITAMURA *et al.*, 2017). A consolidação sistêmica é um processo onde ocorre a reorganização estrutural das conexões entre hipocampo e neocórtex. Nesse processo, as informações inicialmente dependentes do hipocampo para evocação passam a ser dependentes do córtex, especialmente do córtex cingulado anterior (ACC, do inglês *anterior cingulate cortex*) no caso de memórias aversivas (DUDAI, 2004; DASH *et al.*, 2004).

O ACC está localizado entre estruturas corticais e límbicas e pode integrar processos cognitivos e emocionais (BUSH *et al.*, 2000). Já foi observado que o ACC está envolvido no processo de aquisição da memória de medo uma vez que é uma estrutura envolvida com a atenção (BISHOP, 2008), bem como está diretamente relacionado com a evocação da memória de medo contextual remota (KITAMURA *et al.*, 2017). Há conexões neuronais entre o ACC e a amígdala vistas em diversos animais (AGGLETON *et al.*, 1980; BUCHANAN *et al.*, 1994; GABBOTT *et al.*, 2005), bem como conexões entre o ACC e o hipocampo (HAGENA *et al.*, 2016) (Fig. 9).

Existem duas principais teorias que propõem explicações sobre a consolidação sistêmica, o Modelo *Standard* da Consolidação Sistêmica e a Teoria dos Múltiplos Traços. Ambas linhas de pensamento afirmam que há uma reorganização do circuito subjacente à memória que possibilita o armazenamento de informações, entretanto o papel do hipocampo se apresenta diferente entre as teorias (BERGSTROM, 2016).

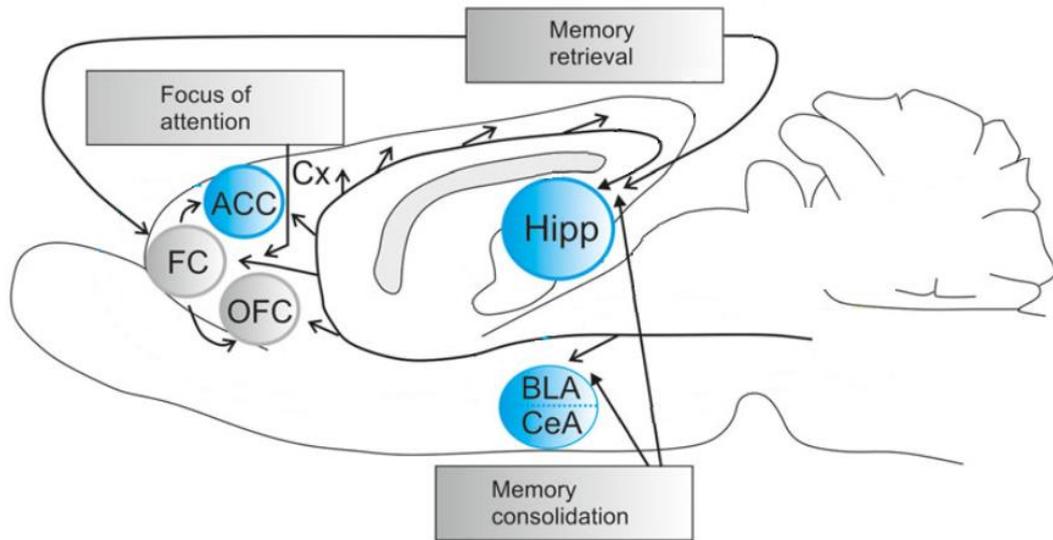


Figura 9 – Imagem representativa de um corte coronal de um encéfalo de rato. Projeções entre o Hipocampo, a Amígdala e o ACC nas Diferentes Fases da Memória. Destaques em azul para o hipocampo (Hipp), córtex cingulado anterior (ACC) e a amígdala sendo essa dividida em amígdala basolateral (BLA) e núcleo central da amígdal (CeA). Também é possível observar o córtex frontal (FC, do inglês *frontal cortex*), bem como o córtex órbito-frontal (OFC, do inglês *orbitofrontal cortex*) (Adaptado de HAGENA *et al.*, 2016).

De acordo com o Modelo *Standard* da Consolidação Sistêmica, tanto o hipocampo quanto o córtex são necessários havendo uma rede hipocampo-córtex. Com o passar do tempo, há uma reorganização dos sistemas, no qual as conexões hipocampo-córtex são progressivamente enfraquecidas enquanto as conexões córtex-córtex, fortalecidas (Fig. 10). Sendo assim, o hipocampo seria um local temporário de armazenamento das informações e o córtex, o destino final (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005).

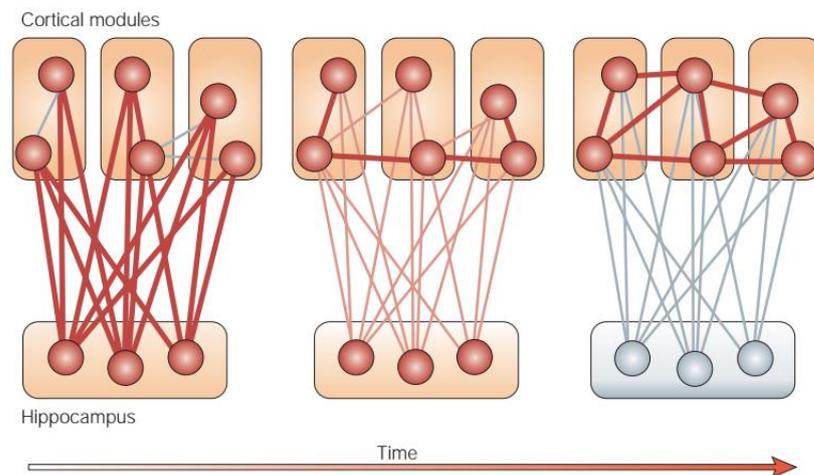


Figura 10 – Representação esquemática do modelo *standard* da consolidação sistêmica (Retirado de FRANKLAND; BONTEMPI, 2005)

Já a Teoria dos Múltiplos Traços prediz que durante o processo de consolidação, as memórias seriam armazenadas de forma mais genérica e esquemática em estruturas extra-hipocampais. No entanto, a expressão de informações detalhadas e contextualmente ricas recrutaria o hipocampo, independente da idade da memória (WINOCUR *et al.*, 2007). Segundo essa teoria, cada vez que uma memória é reativada são implantados novos traços hipocampais que ligam as representações neocorticais da memória como um todo, sendo o hipocampo necessário para recuperar formas remotas. O circuito hipocampo-cortical interage continuamente desde o início da formação da memória, mas diferentes partes do circuito são diretamente envolvidos com a evocação em diferentes momentos. Sendo assim, a consolidação sistêmica estaria mais correlacionada com as reativações e atualizações da memória do que com o simples passar do tempo (BERGSTROM, 2016). Segundo De Oliveira Alvares e colaboradores (2013), o hipocampo participa do armazenamento de uma memória rica em detalhes e reativações sucessivas retardam ou impedem a consolidação sistêmica da memória. Além disso, estudos em modelos animais sugerem que o processo de consolidação sistêmica permite a generalização da memória, caracterizada pela perda da precisão e dos detalhes presentes na memória original (JASNOW *et al.*, 2016).

Como já mencionado anteriormente, as principais estruturas encefálicas envolvidas para a consolidação de uma memória de medo, são o hipocampo, ACC e a amígdala (Fig. 11). Um estudo recente investigou o circuito envolvido com essas estruturas na consolidação de uma memória de medo utilizando o CAC (KITAMURA *et al.*, 2017). Na fase de aquisição, as informações relacionadas ao contexto estariam sendo mediadas pelo hipocampo e as informações referentes ao choque, pela amígdala. Ambas as estruturas enviariam *inputs* para o CPF. Tanto a amígdala quanto o hipocampo estariam envolvidos na evocação de uma memória recente, entretanto após o período da consolidação sistêmica, apenas a amígdala e o CPF seriam necessários para evocar esse traço de memória.

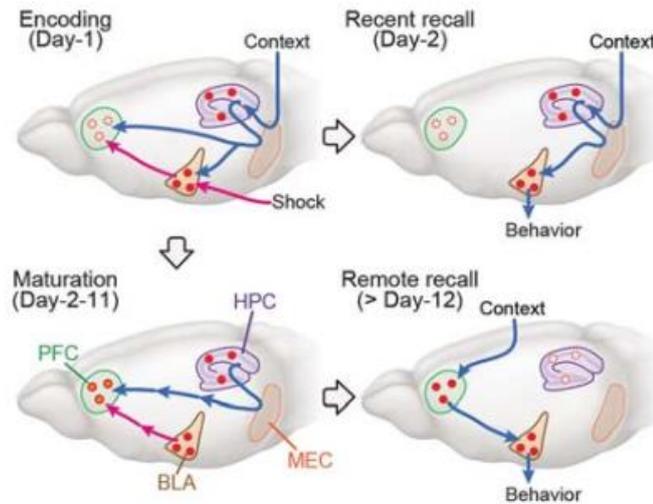


Figura 11 - Modelo da consolidação sistêmica (Retirado de KITAMURA *et al.*, 2017)

1.3 ESPINHOS DENDRÍTICOS

As finas protrusões presentes nos dendritos são denominadas espinhos dendríticos. Eles possuem uma surpreendente capacidade de alterar sua morfologia e inúmeros estudos destacam que a presença de espinhos dendríticos é fundamental para o aprendizado e a memória, bem como outros processos cognitivos (SALA; SEGAL, 2014; SEGAL, 2017).

Os espinhos dendríticos recebem os *inputs* de sinapses excitatórias e inibitórias, sendo a maioria excitatórias. Possuem a capacidade de modular a resposta pós-sináptica, podendo atuar como substrato para a memória (KASAI *et al.*, 2010; HERING; SHENG, 2001). Há diferentes tipos de espinhos dendríticos com morfofisiologias específicas, e é válido destacar a relação entre a morfologia e as características funcionais específicas de cada espinho (TONNESSEN; NAGERL, 2016). Atualmente, um número crescente de estudos tem investigado a dinâmica dos espinhos dendríticos, seu mecanismo molecular na sinalização e seu papel nas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (MAITI *et al.*, 2015).

Em 1873, Camillo Golgi descobriu que ao submergir o tecido nervoso em uma solução de cromato de prata, toda a extensão do neurônio se corava em preto. Em 1888, utilizando essa técnica, Cajal observou que os dendritos de células de Purkinje apresentavam finas projeções e, posteriormente, notou que essas estruturas poderiam ser vistas em outros tipos de neurônios, bem como em diferentes animais (RAMÓN y CAJAL, 1899). Entretanto, foi apenas em 1959, com a utilização de microscopia eletrônica, que foi possível produzir as primeiras imagens da

ultra-estrutura da sinapse, mostrando ambas porções pré- e pós-sinápticas, bem como do espinho dendrítico (GRAY, 1959).

Além da diversidade de formas e tamanhos, a densidade dos espinhos dendríticos pode variar dependendo da estrutura encefálica e da condição neurológica analisada (HERING; SHENG, 2001). Como alterações nessas estruturas já foram encontrados tanto em patologias quanto em processos cognitivos fisiológicos, como a memória, é plausível que nos perguntemos se a plasticidade estrutural e funcional apresentada pelos espinhos dendríticos ocasiona as alterações comportamentais ou é uma consequência delas (GIPSON; OLIVE, 2017). Sendo assim, é claramente evidente a importância de estudos que envolvam os espinhos dendríticos para uma melhor compreensão dos processos neurais.

1.3.1 Morfologia

Os espinhos dendríticos são compostos por uma cabeça (região mais apical e volumosa) e um pescoço (região que liga a cabeça do espinho ao dendrito), sendo que é a partir dessas dimensões que podemos classificá-los morfologicamente. As principais categorias morfológicas são denominadas *thin*, *stubby* e *mushroom* (BOURNE; HARRIS, 2008; TONNESSEN; NAGERL, 2016), onde o tipo *stubby* não apresentam pescoço e exibem um comprimento menor do que os tipos *thin* e *mushroom* (GIPSON; OLIVE, 2017) (Fig. 12). O precursor dos espinhos dendríticos é denominado *filopodium*, sendo que o tipo *mushroom* é considerado como o tipo mais maduro e estável dentre os espinhos dendríticos (ROCHEFORT; KONNERT, 2012).

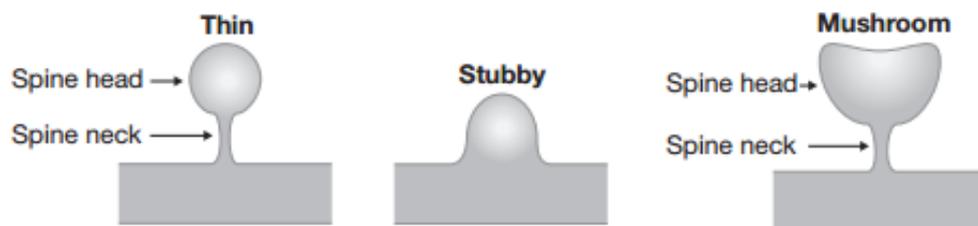


Figura 12 - Desenho esquemático mostrando a diferença morfológica entre os principais tipos de espinho dendrítico (Adaptado de ROCHEFORT; KONNERT, 2012)

Os espinhos dendríticos possuem as dimensões que variam de 0,5 a 3 μm de comprimento e sua cabeça ocupa o volume de 0,01 a 0,8 μm^3 (GIPSON; OLIVE, 2017). Como são estruturas muito pequenas, é necessário a utilização de técnicas precisas para classificarmos

cada tipo de espinho dendrítico e identificarmos suas respectivas alterações. Sendo assim, o avanço do entendimento sobre os espinhos dendríticos está relacionado ao desenvolvimento de novas e precisas técnicas experimentais (TONNESSEN; NAGERL, 2016). Dentre as metodologias empregadas há aquelas que utilizam marcadores fluorescentes, como o DiI. Esse procedimento é largamente utilizado e consiste na injeção do corante diretamente em fatias de tecido possibilitando uma boa visualização a partir da utilização de um microscópio confocal de varredura (CHENG *et al.*, 2014).

A atividade sináptica induz rápidas alterações na morfologia do espinho dendrítico e para que essas mudanças ocorram é necessária uma reorganização do citoesqueleto (Fig. 13). Muitos estudos mostram a importância dos filamentos de actina nessa dinâmica (HLUSHCHENKO *et al.*, 2016), incluindo seu papel na proliferação (JOHNSON; OUIMET, 2006) e na expansão da cabeça dos espinhos dendríticos (CHEN *et al.*, 2015).

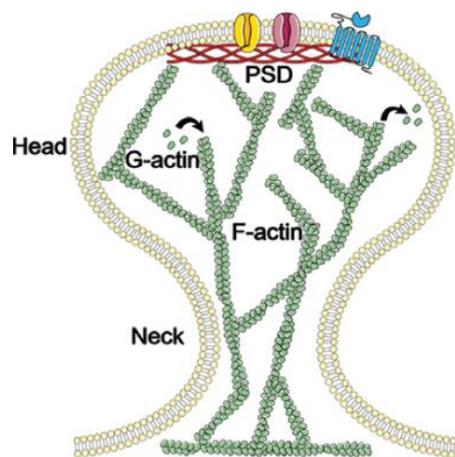


Figura 13 – Esquema mostrando a organização estrutural dos espinhos (Adaptado de GIPSON; OLIVE, 2017)

1.3.2 Plasticidade e Espinhos Dendríticos

A plasticidade pode ser definida como “o conjunto de processos fisiológicos, em nível celular e molecular, que explica a capacidade dos neurônios de mudar suas respostas a determinados estímulos” (IZQUIERDO 2011). Graças a sua dinâmica ímpar, os espinhos dendríticos são considerados os *hot spots* da plasticidade (MAITI *et al.*, 2015).

A diversidade morfológica do espinho dendrítico é uma característica marcante na plasticidade. Alterações no comprimento do pescoço e volume da cabeça são cruciais para a modulação da resposta pós-sináptica (TONNESSEN; NAGERL, 2016). Em razão disso, a

manutenção da LTP e LTD é praticamente sustentada pelos espinhos dendríticos no sistema nervoso de mamíferos (MAITI *et al.*, 2015). Há um grande consenso na literatura de que o tamanho da cabeça do espinho está positivamente relacionado com o tamanho da densidade pós-sináptica (PSD, do inglês *postsynaptic density*) e com a amplitude da corrente pós-sináptica excitatória (EPSC, do inglês *excitatory postsynaptic current*) (TONNESSEN; NAGERL, 2016; KOPEC; MALINOW, 2006). Rapidamente, após a indução de um protocolo de LTP, é possível observar um aumento da cabeça do espinho e uma diminuição do diâmetro do pescoço, sendo o contrário verdadeiro para a indução de um protocolo de LTD (BOSCH *et al.*, 2014).

Como mencionado, logo após a indução da LTP há a remodelação do espinho dendrítico ocasionando o aumento da cabeça do espinho e, conseqüentemente, da PSD. Essa alteração garante a inserção de um maior número de receptores na membrana como os receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) e NMDA (N-metil-D-aspartato), os quais são receptores chaves para a memória (Fig. 14).

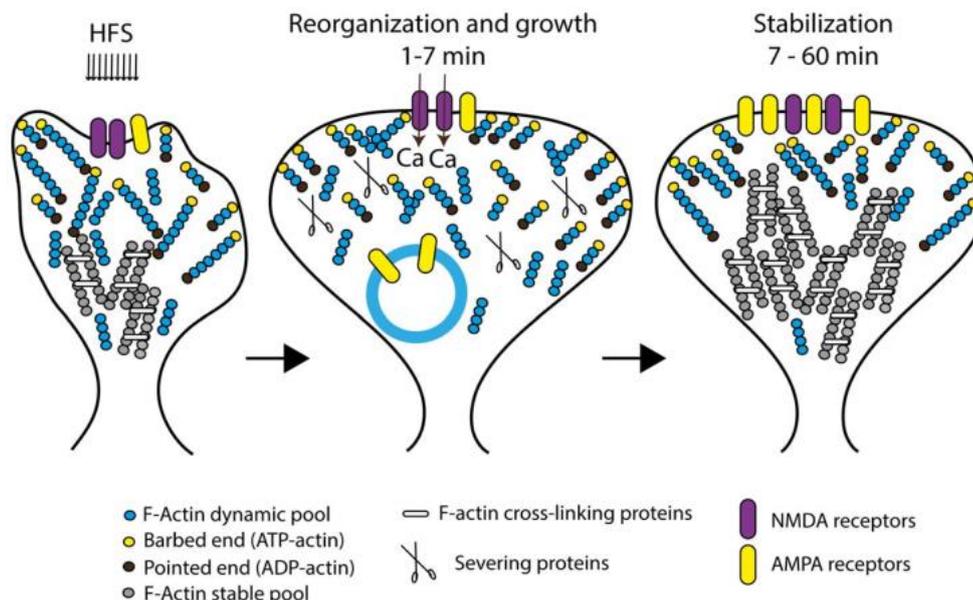


Figura 14 – Dinâmica da actina com a indução de LTP garantindo o aumento da cabeça e a inserção de receptores na cabeça do espinho dendrítico (Retirado de HLUSHCHENKO *et al.*, 2016)

1.4 PRECISÃO E GENERALIZAÇÃO

A generalização da memória é um evento fisiológico que ocorre em vários animais, incluindo os humanos, que consiste na perda de precisão devido à diminuição dos detalhes

presentes na memória original (JASNOW *et al.*, 2017). A generalização permite que os animais se adaptem a um ambiente de constante mudança, uma vez que muito dificilmente somos expostos a estímulos idênticos durante a vida, e permite uma rápida resposta a situações que se assemelham a experiências anteriormente vividas (LOPRESTO *et al.*, 2015).

A generalização da resposta de medo é um processo extremamente importante (DUNSMOOR; PAZ, 2015). Após o animal ser exposto a uma experiência aversiva, é fundamental que ele consiga reagir de forma rápida e adequada a outras situações que se pareçam com o evento aversivo já vivido. Sendo assim, a generalização de uma memória aversiva é uma adaptação protetora que visa garantir a sua sobrevivência (JASNOW *et al.*, 2017).

Entretanto, a generalização excessiva da memória de medo pode ser definida como a transferência do medo adquirido em eventos traumáticos para condições seguras, mas que se assemelham aquelas onde ocorreu o evento aversivo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Isso ocorre devido à evocação das memórias adquiridas dos eventos traumáticos a partir de estímulos não-nocivos e diferentes daqueles que geraram o evento aversivo. A generalização excessiva pode levar ao desencadeamento de patologias relacionadas com a ansiedade, tais como, Transtornos de Ansiedade Generalizada (LISSEK *et al.*, 2014) e o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT) (MAHAN; RESSLER, 2012). Geralmente, essas patologias expressam uma resposta de medo ou pânico em ambientes totalmente seguros e desprovidos de perigo.

O TEPT é caracterizado principalmente por quatro condições clínicas, sendo elas: (1) sofrer ou testemunhar um evento estressante; (2) ter recordações aflitivas, recorrentes e intrusivas do evento traumático (incluindo imagens, sonhos e alucinações); (3) esforços para evitar situações, lugares ou pessoas que são lembranças do evento traumático; e (4) apresentar sintomas de hiperestimulação, tais como irritabilidade, problemas de concentração e distúrbios do sono (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Esse transtorno possui uma alta prevalência, entretanto há variações de acordo com a amostra avaliada. Na América do Norte as taxas de prevalência variam de 6 a 9 % (KESSLER *et al.*, 2005), na Austrália a incidência varia de 1 a 2 % (CREAMER *et al.*, 2001), enquanto no Brasil existe uma carência de estudos sobre a incidência desta patologia na população em geral (XIMENES *et al.*, 2009). Apesar disso, a população brasileira é exposta a elevadas taxas de eventos traumáticos, o que favorece a prevalência do TEPT, de acordo com estudos realizados sobre lesões físicas (O'DONNELL *et al.*, 2008), desastres em geral (STEIN *et al.*, 2007) e abuso sexual (BRESLAU *et al.*, 1999). Para uma melhor compreensão do TEPT utiliza-se amplamente modelos animais,

uma vez que o circuito do medo condicionado nos roedores parece ter uma ampla homologia com a dos seres humanos (MILAD; QUIRK, 2012).

1.5 FLUOXETINA E MEMÓRIAS AVERSIVAS

A 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina) possui a fórmula molecular $C_{10}H_{12}N_2O$, é uma molécula sintetizada a partir do aminoácido triptofano. A serotonina age em plaquetas, em músculos lisos do sistema gastrointestinal, bem como atua como neurotransmissor e neuromodulador no SNC (BERUMEN *et al.*, 2010). Em 1937, Vialli e Erspamer identificaram a serotonina pela primeira vez em células enterocromafins e em 1948 ela foi nomeada e caracterizada (RAPPORT *et al.*, 1948) (Fig. 15). Há 7 classes de receptores de serotonina, 5-HT₁₋₇, sendo quase todos expressos no hipocampo (BERUMEN *et al.*, 2010). Já foi observado que várias patologias estão associadas às alterações no sistema serotoninérgico, como depressão, esquizofrenia e transtornos de ansiedade (FILIP; BADER, 2009).

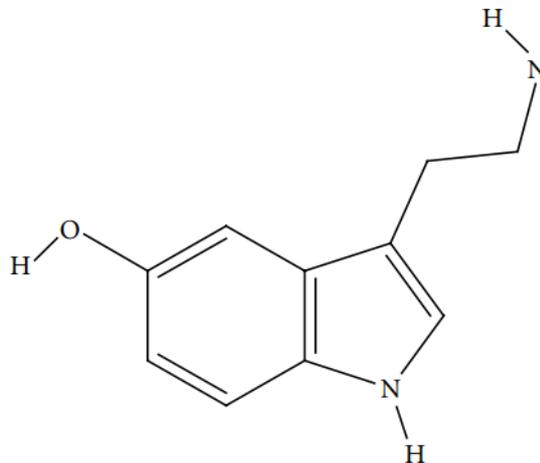


Figura 15 – Estrutura Química da Serotonina (Retirado de BERUMEN *et al.*, 2010)

A fluoxetina (FLX), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), é utilizada como antidepressivo, entretanto também pode ser indicada em outros transtornos como a bulimia nervosa e o transtorno obsessivo compulsivo (SCHATZBERG, 2000). O tratamento de inibidores da recaptação de serotonina tem se mostrado eficaz na atenuação de memórias aversivas, sendo a FLX uma das principais estratégias farmacológicas no tratamento do TEPT (XU *et al.*, 2011; HOSKINS *et al.*, 2015). Apesar de conhecermos sua ação farmacológica, os

mecanismos envolvidos na melhora dos sintomas de desordens de ansiedade e transtornos relacionados ao trauma ainda permanecem desconhecidos.

1.5.1 Tratamento com Fluoxetina e Alterações no SNC

O tratamento crônico com fluoxetina tem sido associado com aumento da neurogênese (ENCINAS *et al.*, 2006; SANCHS; CARON, 2015; SAHAY; HEN, 2007), a modulação da transmissão sináptica (MENDEZ *et al.*, 2012; RUBIO *et al.*, 2013), bem como alterações na plasticidade (KOBAYASHI *et al.*, 2012; CASTREN; HEN, 2013; STAGNI *et al.*, 2013). Foi observado que o tratamento crônico de fluoxetina, associado protocolos comportamentais de atenuação de memórias aversivas, foi eficaz na diminuição do comportamento de congelamento de camundongos (POPOVA *et al.*, 2014). Kessal e colaboradores (2005) observaram que o tratamento com fluoxetina foi capaz de minimizar as alterações sinápticas induzidas pelo estresse, isso se torna interessante devido à associação de fatores emocionais na consolidação da memória. Além disso, a administração crônica de fluoxetina causa alterações em receptores relacionados com a plasticidade (AMPUERO *et al.*, 2010).

Sendo assim, podemos observar a influência do tratamento crônico de fluoxetina em vários componentes relacionados com a consolidação da memória. Baseado na sua capacidade de melhora dos sintomas relacionados com desordens de ansiedade e memórias traumáticas, bem como a falta de compreensão do mecanismo subjacente a essas alterações, estudos que envolvam essa ferramenta farmacológica se tornam interessantes. Portanto, a utilização da fluoxetina pode ser uma possível estratégia para um melhor entendimento sobre os processos mnemônicos.

2 JUSTIFICATIVA

A consolidação sistêmica e a generalização da memória são processos fisiológicos e importantes para o armazenamento e estabilização do traço mnemônico (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; JASNOW *et al.*, 2017). Entretanto, a generalização excessiva pode levar ao desencadeamento de patologias relacionadas ao trauma, como o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (MAHAN; RESSLER, 2012). A fluoxetina, um inibidor da recaptção de serotonina, tem se mostrado eficaz na atenuação de memórias aversivas e se apresenta como uma das principais estratégias farmacológicas no tratamento do TEPT (XU *et al.*, 2011; HOSKINS *et al.*, 2015).

Os transtornos de ansiedade prejudicam fortemente o cotidiano dos pacientes e, apesar de muito utilizada, ainda não sabemos os mecanismos moleculares subjacentes da fluoxetina na melhora dos sintomas. Assim, propomos que o tratamento crônico com fluoxetina pode alterar os processos de generalização e consolidação sistêmica de memórias aversivas, bem como a morfologia de espinhos dendríticos no hipocampo dorsal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração crônica de fluoxetina, em ratos *Wistar* machos, no processo de consolidação sistêmica e generalização de uma memória aversiva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se o tratamento crônico pode prevenir a generalização da memória utilizando o teste comportamental CAC em ratos *Wistar*;
2. Avaliar se a administração crônica de fluoxetina aumenta a janela temporal de dependência hipocampal no CAC por meio da infusão hipocampal de muscimol em ratos *Wistar*;
3. Avaliar se a administração crônica de fluoxetina *per se* induz alguma modificação comportamental de ratos *Wistar* utilizando o teste comportamental Campo Aberto;
4. Verificar a influência do tratamento crônico com fluoxetina na plasticidade nos espinhos dendríticos da região CA1 do hipocampo dorsal utilizando a técnica de DiI.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Periódico: Hippocampus

Título: Administração Crônica de Fluoxetina Aumenta a Janela Temporal da Consolidação Sistêmica de Memórias Aversivas

Normas da Revista: disponível no Anexo A (página 61) e no link [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-1063/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-1063/homepage/ForAuthors.html)

ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FLUOXETINA ALTERA A DINÂMICA TEMPORAL
DA CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Walquíria Souza Nunes¹, Lizeth K. Pedraza¹, Rodrigo O. Sierra², Fernanda Nogueira Lotz
Alves², Jorge A. Quillfeldt² e Lucas de Oliveira Álvares^{1*}

¹ Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Porto Alegre, 91.501-970, Brasil;

² Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Porto Alegre, 91.501-970, Brasil;

*Autor Correspondente: Lucas de Oliveira Álvares; Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 210, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br

RESUMO

A consolidação sistêmica consiste na reorganização das estruturas necessárias para a evocação da memória. Em decorrência desse processo ocorre a generalização, que é a perda de precisão devido à diminuição dos detalhes presentes na memória original. A generalização excessiva é uma importante característica no Transtorno do Estresse Pós-Traumático e a fluoxetina (FLX), um inibidor da recaptação de serotonina, é um medicamento largamente utilizado no tratamento dessa desordem. Apesar de compreendermos a ação farmacológica desse medicamento, o mecanismo subjacente à melhora clínica ainda é pouco conhecido. Portanto, nós investigamos os efeitos da administração crônica de FLX na consolidação sistêmica e generalização de memórias aversivas, bem como sua possível repercussão na plasticidade, a partir da análise de espinhos dendríticos. Para isso, ratos *Wistar* machos foram treinados no Condicionamento Aversivo ao Contexto (8 choques de 0,7mA/1s) e, posteriormente, receberam tratamento crônico I.P. de FLX (10mg/kg) ou salina durante 24 dias. Foi observado que o tratamento crônico de FLX aumentou a janela temporal de consolidação sistêmica, uma vez que impediu a generalização e manteve a dependência hipocampal da memória aversiva. Também foi visto alterações em todos os tipos de espinhos dendríticos analisados, inclusive um aumento na quantidade do tipo *mushroom*. Esses resultados indicam que o tratamento crônico de FLX aumenta a dinâmica temporal da consolidação sistêmica e produz efeitos na plasticidade. Acreditamos que tratamentos farmacológicos que mudem a dinâmica da consolidação sistêmica podem ser efetivos na atenuação de memórias aversivas. Sendo assim, estudos que envolvam o tratamento crônico de FLX se tornam uma interessante estratégia farmacológica para uma melhor compreensão dos transtornos relacionados ao trauma, bem como a estabilização do traço mnemônico.

Palavras-chave: consolidação sistêmica, fluoxetina, Condicionamento Aversivo ao Contexto, precisão, espinho dendrítico.

1. Introdução

O condicionamento aversivo ao contexto é um teste comportamental largamente utilizado para o estudo de memórias de medo, em que a associação entre um estímulo condicionado (contexto) e um incondicionado (choque) permite a realização de aferências sobre a evocação da memória aversiva (Izquierdo *et al.*, 2016). O armazenamento de uma memória não é um processo instantâneo e pode ser classicamente dividido em fases sendo a consolidação sistêmica o processo onde há uma reorganização estrutural do traço da memória. O hipocampo é uma estrutura chave para a evocação de memórias aversivas contextuais, entretanto com o processo da consolidação sistêmica estruturas extra-hipocampais, como o córtex pré-frontal, desempenham essa função (Kitamura *et al.*, 2017).

A Teoria dos Múltiplos Traços visa explicar o fenômeno da consolidação sistêmica, onde as memórias seriam armazenadas de forma mais genérica e esquemática em estruturas extra-hipocampais, porém para expressar informações detalhadas e contextualmente ricas o hipocampo seria sempre necessário, independente da idade da memória (Winocur *et al.*, 2007). Segundo De Oliveira Alvares e colaboradores (2013), o hipocampo está relacionado com memórias ricas em detalhes e existem mecanismos que podem retardar ou impedir a consolidação sistêmica da memória.

Um processo fisiológico que pode ocorrer em decorrência da consolidação sistêmica é a generalização da memória, que consiste na perda de precisão devido à diminuição dos detalhes presentes na memória original (Jasnow *et al.*, 2017). Entretanto, a generalização excessiva da memória de medo pode desencadear inúmeras patologias dentre elas transtornos relacionados a traumas, como o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (Mahan & Ressler, 2012). O TEPT apresenta uma alta prevalência na população e podemos utilizar modelos animais para a sua compreensão e estudo, uma vez que as estruturas e vias relacionadas com a memória de medo nos roedores tem homologias funcionais com a dos seres humanos (Milad & Quirk, 2012). A principal estratégia farmacológica no tratamento do TEPT são os inibidores da recaptação de serotonina e dentre eles a fluoxetina se destaca como um dos medicamentos mais utilizados (Xu *et al.*, 2011; Hoskins *et al.*, 2015).

Atualmente, a ação farmacológica da fluoxetina já esta descrita na literatura, entretanto ainda permanecem desconhecidos os mecanismos subjacentes à melhora dos sintomas. Estudos mostram que o tratamento crônico com esse medicamento pode modular a plasticidade sináptica (Rubio *et al.*, 2013; Popova D. *et al.*, 2014). Também já foi observado efeitos nos espinhos dendríticos promovendo o aumento de sua densidade, bem como a indução da maturação

(Ampuero *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013) sendo essas estruturas consideradas chaves para a memória, bem como processos neurofisiológicos (Kasai *et al.*, 2010; Sala & Segal, 2014; Maiti *et al.*, 2015). Buscando um melhor entendimento dos achados clínicos esse trabalho se propõe a esclarecer o papel do tratamento crônico de fluoxetina na consolidação sistêmica e generalização de uma memória aversiva a nível comportamental, bem como mostrar os seus efeitos nas estruturas que sustentam essa memória, os espinhos dendríticos.

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 ou 5 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 32170.

2.2 Cirurgia Estereotáxica e Fixação de Cânulas

Para a tarefa comportamental relacionada com a dependência hipocampal, os ratos foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) a partir de uma injeção intraperitoneal (i.p.). Posteriormente, os animais foram colocados no aparelho estereotáxico (fabricação: David Kopf, modelo 1404) e a tiveram a superfície do crânio exposta após incisão. Em sequência, para a fixação das cânulas utilizou-se o atlas Paxinos e Watson (1998), com as coordenadas referentes a área CA1 do hipocampo dorsal: -4,0mm anteroposterior (AP), $\pm 3,0$ mm laterolateral (LL) e -1,6mm da dorsoventral (DV). Após sete dias para recuperação da cirurgia, os animais foram submetidos aos procedimentos comportamentais e após a conclusão da tarefa eles foram eutanasiados e seus encéfalos foram utilizados para verificação do posicionamento das cânulas.

2.3 Fármacos

Fluoxetina: inibidor seletivo da receptação de serotonina (fornecido pelo Pharma Nostra® com pureza de 99%) dissolvido em solução salina (0,9%) e administrado na dose de 10mg/kg (i.p.) diariamente durante 24 dias (Popova *et al.*, 2014).

Muscimol: agonista seletivo de receptores GABA_A (Sigma Aldrich) dissolvido com concentração de 1mg/mL e um volume de 0,5µL/lado foi infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal. O objetivo da utilização desse fármaco é a inativação temporária do hipocampo. Essa dose já foi utilizada anteriormente em nosso laboratório para os mesmos testes comportamentais (Pedraza *et al.*, 2016).

Veículo: o veículo utilizado em todo o trabalho foi uma solução salina (0,9%) sendo realizada a sua administração por via intraperitoneal (i.p.) para o grupo controle no tratamento crônico.

2.4 Infusões Intrahipocampais

As infusões intrahipocampais foram necessárias para o teste de dependência hipocampal. No momento da infusão, uma agulha *mizzy* foi colocada na cânula guia. Sua ponta foi projetada para alcançar 1,0 mm a mais do que a extremidade da cânula guia, sendo seu destino a camada de células piramidais de CA1 do hipocampo dorsal. Um volume de 0,5µL/lado de muscimol foi infundido bilateralmente a uma taxa lenta e a agulha foi removida 30 segundos após o final da infusão.

2.5 Procedimentos Comportamentais

Foram realizados três testes comportamentais: campo aberto, dependência hipocampal e precisão de memória.

2.5.1 Precisão da Memória Aversiva

2.5.1.1 Condicionamento Aversivo ao Contexto

A câmara de condicionamento (também denominada contexto treino) consiste em uma caixa de plexiglas iluminada, 20 cm x 25 cm x 22 cm. Seu assoalho é constituído de grade metálica que possibilita a passagem de uma corrente elétrica que fornece choques nas patas dos animais. Para o condicionamento os animais receberam 8, sendo 4 choques aos 3 minutos e mais 4 choques aos 3 minutos e 30 segundos, aos 4 minutos os animais foram retirados do aparato. A intensidade de choque foi de 0,7mA.

2.5.1.2 Contexto Novo

Esse contexto difere do contexto treino, pois apresenta assoalho liso e cheiro de baunilha, entretanto possui as mesmas dimensões. Foi mensurado o tempo total gasto no comportamento de congelamento nos dois ambientes (contexto novo e contexto treino) e o objetivo desse teste comportamental foi verificar se os animais eram capazes de distinguir entre um contexto aversivo de um contexto neutro (Pedraza *et al*, 2016).

2.5.2 Teste Dependência Hipocampal

2.5.2.1 Condicionamento Aversivo ao Contexto

Os animais foram condicionados exatamente com o mesmo protocolo que no teste anterior.

2.5.2.2 Sessão de Teste

15 minutos antes do teste, os animais receberam uma infusão intra-hipocampal de muscimol para a inativação do hipocampo. Os animais foram recolocados no contexto treino e foi mensurado o tempo total gasto no comportamento de congelamento durante 4 minutos. O objetivo desse teste é compreender se o hipocampo é uma estrutura importante para a evocação da memória de medo (Pedraza *et al*, 2016).

2.5.2.3 Sessão de Reteste

Após 4h da infusão intra-hipocampal de muscimol, os animais foram novamente colocados no contexto treino e testados durante 4 minutos. O objetivo dessa sessão é a análise do comportamento animal em numa condição livre de fármaco (Pedraza *et al.*, 2016).

2.5.3 Campo Aberto

O teste de Campo Aberto foi realizado um dia após o final do tratamento crônico dos animais. Cada animal foi colocado separadamente no centro do aparato e seus movimentos foram gravados por 5 minutos. O aparato consiste em um campo circular com 90 cm de diâmetro. O assoalho é dividido entre região central e periférica que apresentam subdivisões em quadrantes (Figura 3A). Foi analisado deslocamento do animal no aparato, sendo contabilizado o tempo total gasto na região central, bem como a quantidade de cruzamentos entre cada quadrante (Lunardi *et al.*, 2017).

2.6 Espinho Dendrítico

Os animais foram perfundidos transcardialmente com PBS de 0,1M e pH 7,4 e por paraformaldeído 4%. O encéfalo foi fatiado, com a utilização de um vibrátomo, em fatias de 200 μ m de espessura. As fatias contendo o hipocampo dorsal foram selecionadas e a região CA1 do HD foi corada com pequenas quantidades de uma solução saturada do corante lipofílico 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil indocarbocianina perclorato (DiI, InVitrogen) em óleo de peixe (Pozzo-Miller *et al.*, 1999). A coloração foi feita com a utilização de microinjecções a partir de uma pipeta com aplicação de pressão positiva.

A marcação dos dendritos foi visualizada com a utilização de um microscópio confocal de varredura por laser Fluoview FV-300 (microscópio invertido Olympus IX81) no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Cada espinho dendrítico foi quantificado manualmente utilizando o software ImageJ, sendo o comprimento total, o diâmetro da cabeça e do pescoço os padrões analisados (Chapleau *et al.*, 2009; Calfa *et al.*, 2012). Com a utilização do programa Neuron Studio Software (Rodriguez *et al.*, 2008), foi possível mensurar a densidade de espinhos e sua classificação baseando-se na quantidade de espinhos presentes em cada dendrito e na morfologia apresentada por cada espinho dendrítico (Giachero *et al.*, 2013).

3. Resultados

Tratamento Crônico de FLX Impede a Generalização da Memória Aversiva

Para avaliar a generalização da memória aversiva, foi utilizado o protocolo de condicionamento no CAC e após 25 dias foi realizado o teste. Nesse protocolo, foi analisada a quantidade de tempo gasto com o comportamento de congelamento em um contexto novo e no dia seguinte, no contexto de treino (Figura 1A). Assim, o tratamento crônico com fluoxetina inibiu a generalização da memória aversiva, uma vez que o grupo administrado com esse fármaco mantém a discriminação entre um contexto aversivo e um contexto neutro em comparação com o grupo controle (variável droga, $F_{(1,24)}=11,947$; $p=0,002$. Variável contexto, $F_{(1,24)}=12,140$; $p=0,001$) (Fig 1B).



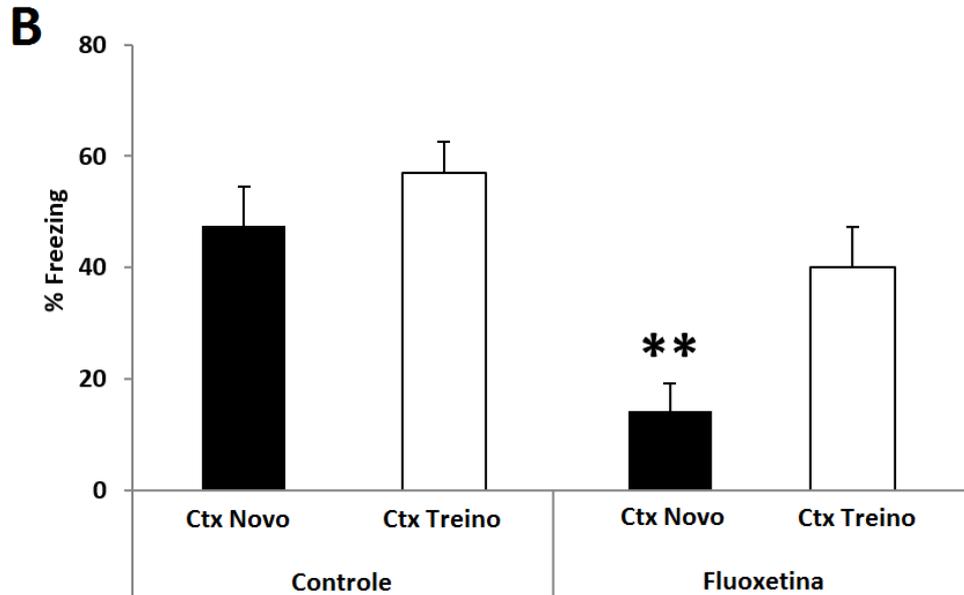


FIGURA 1 - Administração Crônica de Fluoxetina Previne a Generalização da Memória Aversiva. (A) Representação Esquemática do Desenho Experimental do Teste de Precisão da Memória. (B) % de freezing gastos nos contextos novo e treino pelos grupos controle e fluoxetina. ANOVA para medidas repetidas, post hoc Tukey. Dados representam à média \pm erro padrão da média. ** representa $p < 0,01$.

$n_{\text{controle}} = 13$; $n_{\text{fluoxetina}} = 13$.

Tratamento Crônico de FLX Estende a Janela de Dependência Hipocampal

Para avaliar a dependência hipocampal da memória aversiva, foi utilizado o protocolo de condicionamento no CAC e após 25 dias foi realizado o teste. Nesse protocolo foi analisado a quantidade de tempo gasto com o comportamento de congelamento quando o animal foi recolocado no contexto treino com e sem a inativação hipocampal (Figura 2A). Sendo assim, o tratamento crônico com fluoxetina prolongou o tempo em que a evocação da memória aversiva é dependente de hipocampo em comparação com o grupo controle (variável tempo, $F(1,17)=28,664$, $p < 0,001$) (Figura 2B).



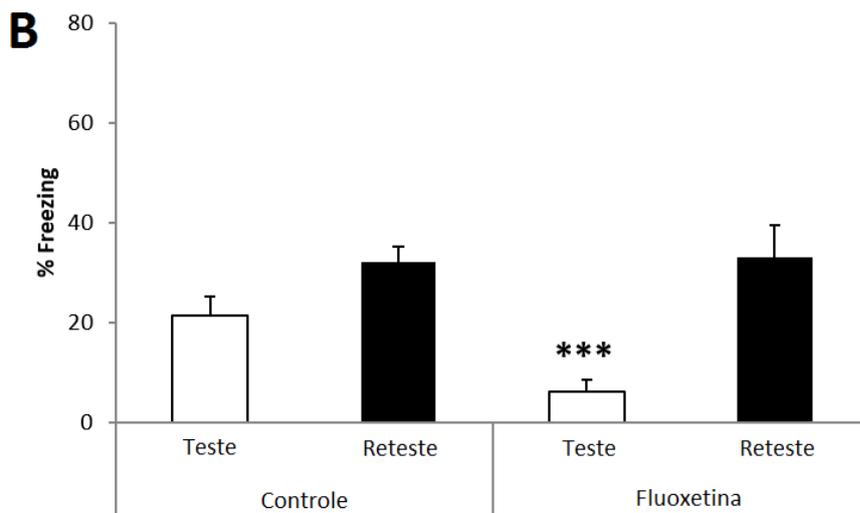


FIGURA 2 – Tratamento Crônico de Fluoxetina Aumenta a Janela Temporal de Dependência do Hipocampo. (A) Representação esquemática do desenho experimental do teste de dependência hipocampal (B) % de freezing gasto no contexto treino com e sem a inativação hipocampal pelos grupos controle e fluoxetina. ANOVA para medidas repetidas, post hoc Tukey. Dados representam à média \pm erro padrão da média. *** representa $p < 0,001$. $n_{\text{controle}} = 11$; $n_{\text{fluoxetina}} = 8$.

O Tratamento Crônico de Fluoxetina *per se* não Causa Efeitos Comportamentais

Para avaliar se o tratamento crônico de fluoxetina *per se* causa alguma alteração comportamental, foi realizado o teste comportamental campo aberto. Nesse protocolo, os animais eram condicionados como nos testes anteriores e recebiam o tratamento crônico por 24 dias. Depois de 24h era feito o teste comportamental que consiste na livre exploração do animal em uma arena redonda (Figura 3D). Assim, o tratamento crônico de fluoxetina não desencadeia comportamento do tipo ansiedade ($T_{(8)}=0,6023$; $p=0,5637$; Figura 3A e Figura 3B) nem alterações na locomoção ($T_{(8)}=0,07846$; $p=0,9394$; Figura 3C) em comparação com o grupo controle. Esses resultados indicam que o tratamento crônico de FLX *per se* não altera o comportamento dos animais.

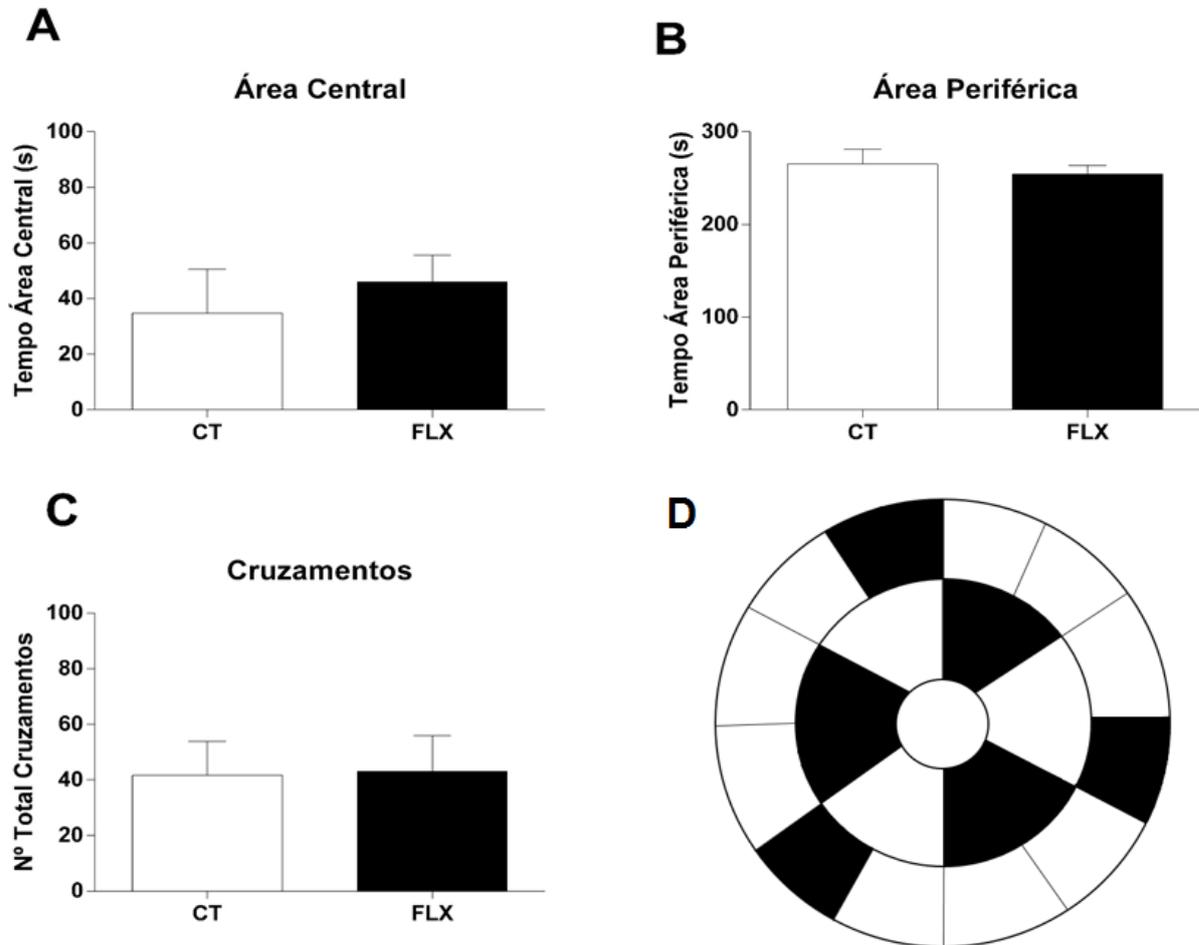
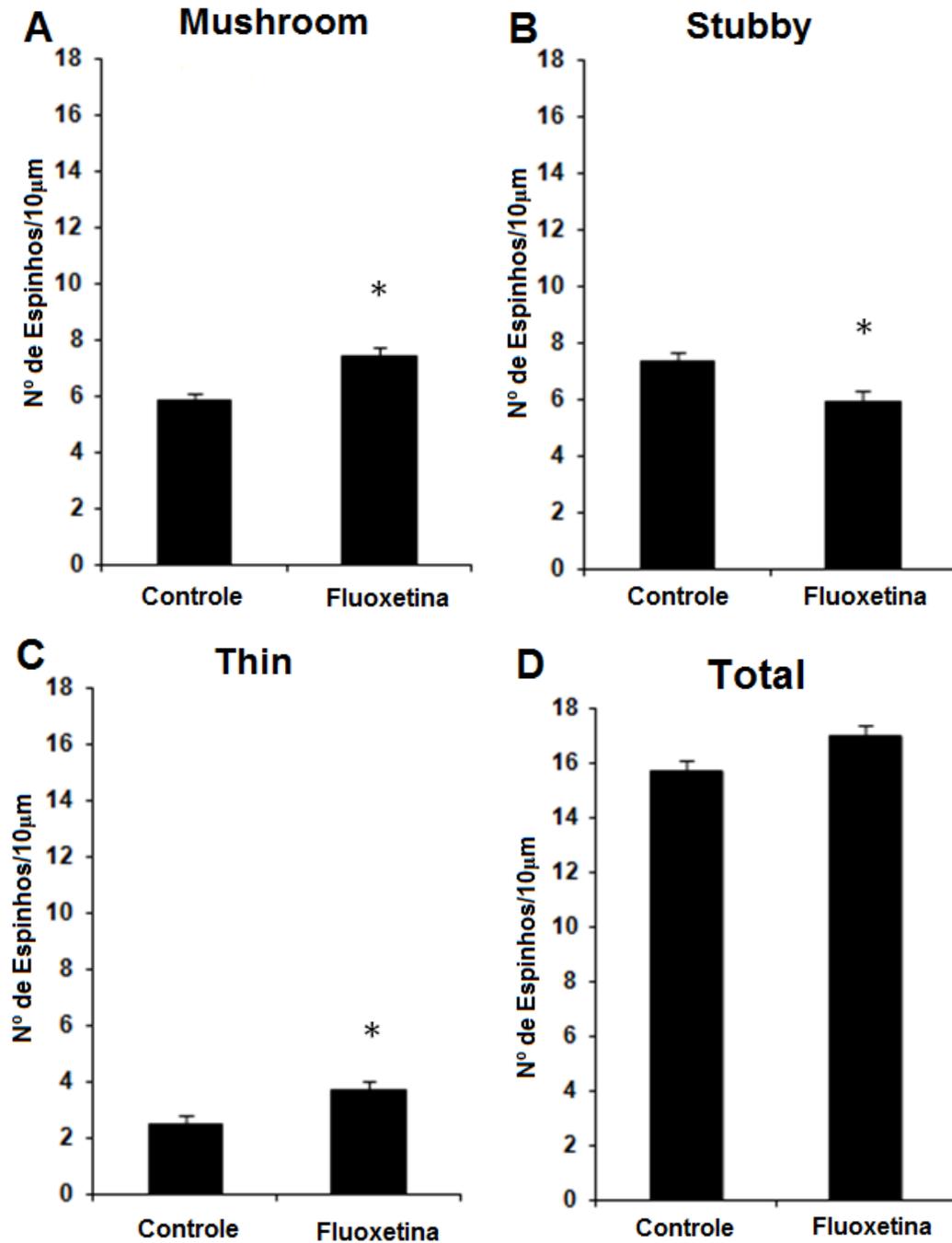


FIGURA 3 – Tratamento Crônico de Fluoxetina *per se* Não Causa Alterações Comportamentais nos Animais. Quantidade de tempo gasto (segundos) explorando a região central (A) e região periférica (B) do aparato pelos animais controle e fluoxetina. (C) Quantidade de cruzamentos entre as subdivisões do aparato realizados pelos animais controle e fluoxetina (D) Representação esquemática do assoalho do aparato do teste de campo aberto. Teste t não-pareado $n_{\text{controle}} = 5$; $n_{\text{fluoxetina}} = 5$.

O Tratamento Crônico de FLX causa Efeitos em Espinhos Dendríticos da Região CA1 do Hipocampo

Para avaliar se o tratamento crônico de fluoxetina causa alterações nos espinhos dendríticos, foi realizado a análise da densidade total, bem como dos tipos de espinhos *thin*, *stubby* e *mushroom* presentes na região CA1 do hipocampo dorsal. Para tanto, um dia após o teste de precisão da memória, os animais foram perfundidos realizado o respectivo protocolo. Foi observado que o tratamento crônico de fluoxetina causa um aumento da quantidade do espinho dendrítico do tipo *mushroom* (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 4A), diminuição da quantidade do tipo

stubby (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 4B), aumento da quantidade do tipo *thin* (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; Figura 4C) e não foi visto diferenças na densidade total dos espinhos dendríticos (Teste Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Figura 4D).



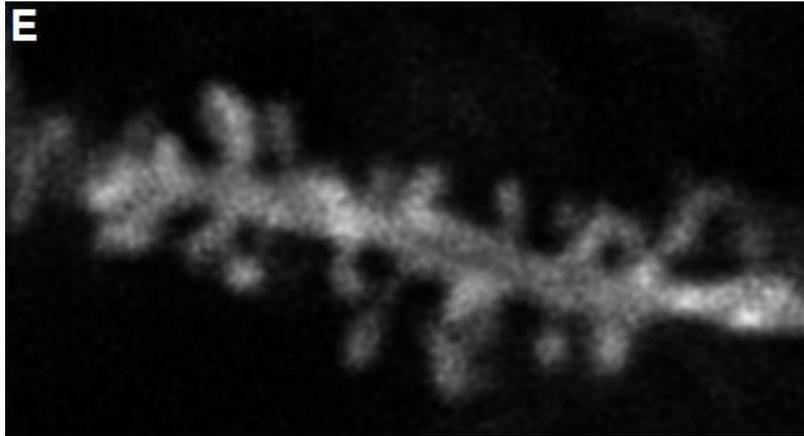


FIGURA 4 - Administração Crônica de Fluoxetina Causa Alteração em Espinhos Dendríticos. Foi analisado a quantidade dos espinhos dendríticos do tipo (A) *mushroom*, (B) *stubby* e (C) *thin*, bem como a (D) densidade total de espinhos dendríticos. (E) Exemplo representativo do segmento dendríticos dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo dorsal utilizados para análise quantitativa dos espinhos dendríticos *representa $p < 0,05$.

4. Discussão

Avaliamos a influência do tratamento crônico de fluoxetina na consolidação sistêmica e na generalização de uma memória aversiva, bem como o correlato que suportaria essa memória, os espinhos dendríticos. A generalização excessiva da memória de medo é uma das principais características associadas ao Transtorno do Estresse Pós-Traumático (Lopresto *et al.*, 2015) e os nossos resultados mostram que o tratamento crônico de fluoxetina foi capaz de prevenir esse processo (Figura 1). Estudos anteriores comprovam que a evocação de memórias contextuais ricas em detalhes é dependente do hipocampo (Wiltgen *et al.*, 2010), sendo esse achado corroborado pelos nossos resultados (Figura 2). Considerando que o tratamento crônico de fluoxetina *per se* não causa alterações comportamentais nos animais (Figura 3), acreditamos que a administração crônica de fluoxetina pode estender a janela temporal de consolidação sistêmica. Ademais, foi encontrado um aumento na quantidade de espinhos do tipo *mushroom* (Figura 4A), bem como alterações na quantidade de todos os tipos analisados, mostrando que o tratamento crônico de FLX afeta profundamente a dinâmica morfológica dos espinhos dendríticos sendo esses diretamente correlacionados com a memória (Varga *et al.*, 2011). Para esse resultado, foi analisado um total de 53 segmentos de dendritos, sendo 34 referentes ao grupo controle (por volta de 700 μm) e 19 do grupo fluoxetina (por volta de 380 μm). É fundamental ressaltar que as análises referentes aos espinhos dendríticos ainda estão em

andamento, a estimativa é que ainda falte o n referente a dois animais do grupo fluoxetina e um do grupo salina. Apensar disso, os resultados serão discutidos.

Corroborando com a teoria dos múltiplos traços (Winocur *et al.*, 2007), os resultados vistos pelos animais controle mostram que após 25 dias da aquisição da memória aversiva, a evocação dessa memória encontra-se generalizada e deixa de ser dependente do hipocampo, uma vez que os animais tratados com salina não discriminam entre os contextos neutro e aversivo, e a inativação hipocampal não afeta a evocação da memória de medo (Figura 1 e 2, respectivamente). Entretanto, o tratamento crônico com fluoxetina previne a generalização dessa memória aversiva, mantendo a capacidade de discriminação entre ambos os contextos, bem como estendendo o tempo de dependência hipocampal para evocação dessa memória o que sugere um aumento da janela temporal da consolidação sistêmica (Figura 1 e 2).

Muitos artigos na literatura mostram que o tratamento crônico de fluoxetina favorece a neurogênese (Encinas *et al.*, 2006; Sanchs & Caron, 2015). Entretanto, McAvoy e colaboradores (2015) mostraram que camundongos fêmeos de meia idade tratados de maneira crônica com fluoxetina apresentam uma prevenção da generalização de uma memória aversiva, adquirida a partir do condicionamento aversivo ao contexto, mas essa diferença não é acompanhada de neurogênese e sim de um aumento na densidade de espinhos dendríticos do giro denteado. Esse estudo mostra uma possível associação entre o aumento de espinhos dendríticos e a manutenção da precisão da memória, sendo que em nossos resultados preliminares podemos ver um claro aumento da quantidade do tipo *mushroom* e uma tendência de aumento na densidade dos espinhos na região hipocampal CA1.

Apesar de ainda não mostrado claramente na literatura, acreditamos que haja uma relação positiva entre a quantidade de espinhos *mushroom*, bem como uma possível associação entre o aumento da densidade total de espinhos no hipocampo, e a precisão da memória. Essa hipótese é baseada nos dados que mostram que as modificações na PSD acompanham a dinâmica relacionada com o tamanho da cabeça do espinho dendrítico (Kopeck & Malinow, 2006) e que uma maior PSD poderia suportar uma maior quantidade de receptores glutamatérgicos, principalmente AMPA e NMDA, sendo esses essenciais para a memória (Kasai *et al.*, 2010). Ademais, já foi observado uma relação entre espinhos dendríticos e o processo de consolidação sistêmica, onde há um aumento da densidade de espinhos na região CA1 em uma memória contextual recente e um aumento da densidade de espinhos dendríticos no CPF em uma memória contextual remota (Restivo *et al.*, 2009). Esse resultado aponta que os espinhos dendríticos podem ser a estrutura que conduz a consolidação sistêmica e esse resultado corrobora com os nossos achados, onde vemos que o tratamento crônico de FLX

mantém a precisão e dependência hipocampal, características de uma memória recente, e há uma tendência de aumento dos espinhos dendríticos no hipocampo (análise em CA1).

Há poucos estudos abordando sobre o tratamento crônico de FLX e espinhos dendríticos, entretanto há indícios de que o tratamento com esse fármaco induza o aumento da densidade de espinhos em várias regiões do hipocampo (McAvoy *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013; Golub *et al.*, 2017). Sendo assim, acreditamos que o tratamento crônico de FLX pode aumentar a densidade de espinhos dendríticos no hipocampo, esse aumento pode prolongar o processo de consolidação sistêmica o que impediria a generalização da memória aversiva e estenderia sua dependência do hipocampo para a evocação dessa memória. Acreditamos que esse possa ser o mecanismo subjacente à melhora clínica vista nos pacientes com TEPT. Sendo assim, estudos que envolvam o tratamento crônico de FLX se tornam uma interessante estratégia farmacológica para um melhor entendimento dos transtornos relacionados ao trauma e dos processos celulares, moleculares e estruturais da estabilização do traço de memória.

Agradecimentos

Todos os autores declaram que não há qualquer interesse financeiro pessoal ou qualquer conflito de interesse. Os autores agradecem Zelma Regina V. de Almeida por toda sua assistência técnica e carinho.

5. Referências

Ampuero E., Rubio F, Falcon F, Sandoval M, Diaz- Veliz G, Gonzalez R, Earle N, Dangnino-Subiabre A, Aboitiz F, Orrego F., Wyneken N, 2010. Chronic Fluoxetine Treatment Induces Structural Plasticity and Selective Changes in Glutamate Receptor Subunits in the Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience* 169: 98–108

Bessa J, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira J, Palha J, Almeida O, Sousa N. 2009. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular Psychiatry* 14:764–773.

Blanchard RJ, Blanchard DC. (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Compar Physiol Psychol* 68:129–113.

Calfa G, Chapleau CA, Campbell S, Inoue T, Morse SJ, Lubin FD, Pozzo-Miller L. (2012) HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 22: 1493–1500.

Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC, Albertson AJ, Larimore JL, Kudo S, Armstrong DL, Percy AK, Pozzo-Miller L. 2009 Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* 35: 219–233.

Dash P., Hebert A., Runyan J. 2004. A Unified Theory for Systems and Cellular Memory Consolidation. *Brain Research Reviews* 45:30–37.

De Oliveira Alvares L., Crestani AP., Cassini L., Haubrich J., Santana F., Quillfeldt JA., 2013. Reactivation Enables Memory Updating, Precision-Keeping and Strengthening: Exploring the Possible Biological Roles of Reconsolidation. *Neuroscience*, 1-7.

Deschaux O. e Spennato G., 2011. Chronic treatment with fluoxetine prevents the return of extinguished auditory-cued conditioned fear. *Psychopharmacology*, 215:231–237.

Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol.* 55:51–86

Dunsmoor J. e Paz R. 2015 Fear generalization and anxiety: behavioral and neural mechanisms. *Biological Psychiatry*.

Encinas J., Vaahtokari A., Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci.* 103(21):8233-8.

Frankland P. e Bontempi B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nature Review Neuroscience.* 6:119-130

Frankland P., Ding H., Takahashi E., Suzuki A., Kida S., Silva A. 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning and memory.* 13(4):451-7.

Giachero M, Calfa G, Molina V. 2013. Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. *Learning & Memory* 20:611–616.

Golub M, Hackett E, Hogrefe C, Leranthe C, Elsworth J, Roth R. 2017. Cognitive performance of juvenile monkeys after chronic fluoxetine treatment. *Developmental Cognitive Neuroscience* 26: 52–61

Hoskins M, Pearce J, Bethell A, Dankova L, Barbui C, Tol W, Ommeren M, Jong J, Seedat S, Chen H, Bisson H. 2015. Pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder: systematic review and metaanalysis. *The British Journal of Psychiatry*, 206:93-100.

Izquierdo I, Furini C, Myskiw J. 2016. Fear Memory. *Physiol Rev* 96:695–750.

Jasnow A., Lynch III J., Gilman T., Riccio D. 2017. Perspectives on Fear Generalization and Its Implications for Emotional Disorders. *Journal of Neuroscience Research* 95:821-835

Karpova N., Pickenhagen A., Lindholm J., Tiraboschi E., Kuleskaya N., Ágústsdóttir A., Antila H., Popova D., Akamine Y., Sullivan R., Hen R., Drew L., Castrén E., 2011. Fear Erasure in Mice Requires Synergy Between Antidepressant Drugs and Extinction Training. *Science*, 334:1731-1734.

Kasai H., Fukuda M., Watanabe S., Hayashi-Takagi A., Noguchi J., 2010. *Trends in Neurosciences* 33:121-129.

Kessal K., Deschaux O., Chessel A., Xu L., Moreau JL, Garcia R., 2005. Fluoxetine reverses stress-induced fimbria-prefrontal long-term potentiation facilitation. *NeuroReport*, 17:319-322.

Kessels H., Malinow R. (2009) Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61:340–350.

Kitamura T., Ogawa S., Roy D., Okuyama T., Morrissey M., Smith L., Redondo R., Tonegawa S. 2017. Engrams and Circuits Crucial for Systems Consolidation of a Memory. *Science*, 356:73-78.

Kopec C. e Malinow R., 2006. Matters of Size. *Science*, 314:1554-1555.

Lissek S, Kaczkurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. 2014 Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biol Psychiatry*. 75:909-915.

Lopresto D, Schipper P, Homber J. 2015. Neural Circuits and Mechanisms Involved in Fear Generalization: Implications for the Pathophysiology and Treatment of Posttraumatic Stress Disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.

Lunardi P, Sachser R, Sierra R, Pedraza L, Medina C, Fuente V, Romano A, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. 2017. Effects of Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. *Mol Neurobiol*

Mahan AL e Ressler KJ. 2012 Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends Neurosci.* 35:24-35.

Maiti P, Manna J, Ilavazhagan G, Rossignol J, Dunbar G. 2015. Molecular Regulation of Dendritic Spine Dynamics and Their Potential Impact on Synaptic Plasticity and Neurological Diseases. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 59: 208–237

McAvoy K, Russo C, Kim S, Rankin G, Sahay A. 2015. Fluoxetine induces input-specific hippocampal dendritic spine remodeling along the septotemporal axis in adulthood and middle age. *Hippocampus.* 25:1429-46.

Méndez P, Pazienti A, Szabó G, Bacci A. 2012. Direct alteration of a specific inhibitory circuit of the hippocampus by antidepressants. *J Neurosci.*; 32 (47): 16616-28.

Milad M & Quirk G, 2012. Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annu Rev Psychol.* 63: 129–151

Otto M, McHugh R, Katak K. 2010. Combined Pharmacotherapy and Cognitive-Behavioral Therapy for Anxiety Disorders: Medication Effects, Glucocorticoids, and Attenuated Treatment Outcomes. *Clin Psychol-Sci Pr.* 17:91–103

Paxinos G, Watson C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* San Diego: Academic Press.

Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, de Oliveira AL. (2016) The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus* 33: 1-10.

Popova D., Ágústsdóttir A, Lindholm J, Mazulis U, Akamine Y, Castrén E, Karpova N. 2014. Combination of fluoxetine and extinction treatments forms a unique synaptic protein profile that correlates with long-term fear reduction in adult mice. *European Neuropsychopharmacology,* 24(7):1162-74.

Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. (1999). Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca^{2+} transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J neurophysiol* 81: 1404–1411.

Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. 2009. The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 29:8206–8214.

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL. (2008). Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PloS One* 3: e1997

Rubio F., Ampuero E., Sandoval R., Toledo J., Pancetti F., Wyneken U. 2013. Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. *Front Cell Neurosci.* 7:66.

Sahay A, Hen R. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience.* 10(9):1110-5

Sala C. e Segal M., 2014. Dendritic Spines: the Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiol Rev* 94:141–188

Sanchs B e Caron M. 2015. Chronic Fluoxetine Increase Extra-Hippocampal Neurogenesis in Adult Mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 1-12.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.

Varga Z, Jia H, Sakmann B, Konnerth A. 2011. Dendritic coding of multiple sensory inputs in single cortical neurons in vivo. *PNAS* 108:15420-15425

Wang J., David D., Monckton J., Battaglia F., Hen R. 2008. Chronic Fluoxetine Stimulates Maturation and Synaptic Plasticity of Adult-Born Hippocampal Granule Cells. *The Journal of Neuroscience*, 28:1374–1384.

Wang G, Cheng Y, Gong M, Liang B, Zhang M, Chen Y, Zhang C, Yuan X, Xu J. 2013. Systematic correlation between spine plasticity and the anxiety/depression-like phenotype induced by corticosterone in mice. *NeuroReport*, 24:682–687.

Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ. 2010 The Hippocampus Plays a Selective Role in the Retrieval of Detailed Contextual Memories. *Curr Biol*. 20:1336-1344

Wiltgen BJ e Silva AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem.*, 14:313-317.

Winocur G., Moscovitch M., Sekeres M. 2007 Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neuroscience*. 5:555-557.

Xu J, Chan M, Yang Y, 2011. Fluoxetine as a treatment for post-traumatic stress disorder. *Neurosciences*; Vol. 16 (3): 257-262

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho nós buscamos avaliar o efeito do tratamento crônico de FLX na consolidação sistêmica e generalização de uma memória aversiva, bem como sua repercussão na plasticidade. Foi observado que esse tratamento aumenta a janela de temporal de dependência do hipocampo e mantém a precisão da memória de medo após 25 dias do condicionamento. Além disso, foi visto que o tratamento crônico de FLX afeta morfológicamente os espinhos dendríticos da região CA1 e há uma tendência para o aumento de densidade. Sabemos que um aumento na quantidade de espinhos nessa região está associado a memórias contextuais recentes. Esses resultados sugerem que o tratamento crônico de FLX tem efeito na consolidação sistêmica, promovendo o aumento da janela temporal em que esse processo ocorre. Ademais, como há um aumento no espinho do tipo *mushroom*, que é considerado o tipo mais maduro dentre os espinhos dendríticos, podemos sugerir que o tratamento crônico de FLX pode desencadear mecanismos relacionados com a maturação dos espinhos.

Esse Trabalho de Conclusão de Curso é apenas uma parte do projeto que tem como título “Efeito da Administração Crônica de Fluoxetina na Dependência Hipocampal e Precisão da Memória: Relação entre Consolidação Sistêmica e Atenuação de Memórias Aversivas por Meio da Reconsolidação e Extinção”. Esse projeto envolve testes comportamentais de reconsolidação e extinção, bem como a utilização de fêmeas com o objetivo de conferir se os resultados encontrados nos machos se apresentam da mesma maneira em ratos do sexo feminino.

Além dos testes comportamentais citados acima, uma perspectiva é a padronização da técnica de Análise de Espinhos Dendríticos em nosso laboratório. Toda a metodologia realizada a partir do tecido biológico perfundido até a obtenção das imagens pelo equipamento de Microscopia Confocal foi realizada em parceria com o Laboratório de Neuropsicofarmacologia situado na Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC. Buscamos incorporar essa técnica em nosso laboratório e terminarmos o n para o respectivo experimento. Ademais, o hipocampo e o CPF de alguns animais foram removidos para futuras análises de subunidades de receptores AMPA a partir da técnica de *Western Blot*.

6 REFERÊNCIAS

- Abel T. e Lattal K., 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11:180–187.
- Aggleton J., Burton M., Passingham R., 1980. Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Brain Research*, 190:347–368.
- Ampuero E., Rubio F, Falcon F, Sandoval M, Diaz- Veliz G, Gonzalez R, Earle N, Dangnino-Subiabre A, Aboitiz F, Orrego F., Wyneken N, 2010. Chronic Fluoxetine Treatment Induces Structural Plasticity and Selective Changes in Glutamate Receptor Subunits in the Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience* 169: 98–108.
- Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., Fanselow, M.S., 2001. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8-17.
- Association, A.P., 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th*
- Bear M, Connors B, Paradiso M. 2008. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3º Edição.* Porto Alegre: Artmed.
- Bergstrom H., 2016. The Neurocircuitry of Remote Cued Fear Memory. *Neuroscience and Biobehaviour Reviews*
- Berumen L, Rodriguez A, Miledi R, Garcia-Alcocer G. 2012. Serotonin Receptors in Hippocampus. *The Scientific World Journal*, 2012:823493
- Bishop S., 2008. Neural mechanisms underlying selective attention to threat, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129:141–152
- Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Compar Physiol Psychol* 68:129–113.
- Bourne JN e Harris KM. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47–67
- Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. 2014. S Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82:444-4459
- Buchanan, R., Thompson H., Maxwell B., Powell D., 1994. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. *Experimental Brain Research*, 100:469–483.
- Bush G., Luu P., Posner M., 2000. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, 4:215-222.
- Castrén E, Hen R. 2013. Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci.* 36:259-67.

Chen J, Kellner Y, Zagrebelsky M, Grunwald M, Korte M, Walla P. 2015. Two-Photon Correlation Spectroscopy in Single Dendritic Spines Reveals Fast Actin Filament Reorganization during Activity Dependent Growth. *PLoS One* 10:1-13.

Cheng C., Trzcinski O., Doering L., 2014. Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye “DiI”. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8:1-8.

Chevalyere V. e Siegelbaum S., 2010. Strong CA2 Pyramidal Neuron Synapses Define a Powerful Disynaptic Cortico-Hippocampal Loop. *Neuron*. 66:560–572

Dash P., Hebert A., Runyan J. 2004. A Unified Theory for Systems and Cellular Memory Consolidation. *Brain Research Reviews* 45:30–37.

De Oliveira Alvares L., Crestani AP., Cassini L., Haubrich J., Santana F., Quillfeldt JA., 2013. Reactivation Enables Memory Updating, Precision-Keeping and Strengthening: Exploring the Possible Biological Roles of Reconsolidation. *Neuroscience*, 1-7.

Diamond A. 2013. Executive Functions. *Annual Review of Psychology*, 64: 135–168.

Dunsmoor J. e Paz R. 2015. Fear generalization and anxiety: behavioral and neural mechanisms. *Biological Psychiatry*

Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*. 55:51–86

Dudai Y. 2012. The Restless Engram: Consolidations Never End. *Annu. Rev. Neurosci*. 35:227–47.

Dudai Y., Karni A., Born J., 2015. The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron* 88:20-32.

Encinas J, Vaahtokari A, Enikolopov G. 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci*. 103(21):8233-8.

Frankland P. e Bontempi B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nature Review Neuroscience*. 6:119-130.

Filip M e Bader M. 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports*, 61:761-777.

Gabbott T., Warner P., Jays L., Salway P., Busby S., 2005. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology*, 492:145–177.

Gale G., Anagnostaras S., Godsil B., Mitchell S., Nozawa T., Sage J., Wiltgen B., Fanselow M., 2004. Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. *The Journal of Neuroscience*, 24:3810 –3815.

Gipson CD e Olive MF, 2017. Structural and Functional Plasticity of Dendritic Spines – Root or Result of Behavior? *Genes, Brain and Behavior*, 16:101–117.

Gray EG, 1959. Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex. *Nature*, 183:1592–3.

Hagena H., Hansen N., Manahan-Vaughan D., 2016. β -Adrenergic Control of Hippocampal Function: Subservicing the Choreography of Synaptic Information Storage and Memory. *Cerebral Cortex*, 26:1349–1364

Hebb, D. O. 1949. *The organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. New York: Wiley

Hering H e Sheng M, 2001. Dendritic Spines: Structure, Dynamics and Regulation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2:880-888

Hlushchenko I, Koskinen M, Hotulainen P. 2016. Dendritic Spine Actin Dynamics in Neuronal Maturation and Synaptic Plasticity. *Cytoskeleton*, 73:435–441.

Hoskins M, Pearce J, Bethell A, Dankova L, Barbui C, Tol W, Ommeren M, Jong J, Seedat S, Chen H, Bisson H. 2015. Pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder: systematic review and meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry*, 206:93-100.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros M. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*. 103(1):1-11.

Izquierdo I. 2011. *Memória*. Artmed, Porto Alegre.

Izquierdo I, Furini C, Myskiw J. 2016. Fear Memory. *Physiol Rev* 96:695–750.

James, W. *Principles of psychology*. New York: Henry Holt and Company; 1890.

Janak P. E Tye K., 2015. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*. 517:284–292.

Jasnow A, Lynch J, Gilman T, Riccio D. 2017 Perspectives on Fear Generalization and Its Implications for Emotional Disorders. *Journal of Neuroscience Research* 95:821-835.

Joels M., Fernandez G., Roozendaal B., Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends in Cognitive Sciences*, 15:280-288.

Johnson O e Ouimet C. 2006. A regulatory role for actin in dendritic spine proliferation. *Brain Research*, 1113:1–9.

Josselyn S., Köhler S., Frankland P. 2015. Finding the engram. *Nature Reviews, Neurosciece*. 16:521-534.

Josselyn S., Köhler S., Frankland P. 2017. Heroes of the Engram. *J. Neurosci.*, 37:4647–4657.

Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth A. 2014. *Princípios da Neurociência*. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed.

- Kasai H., Fukuda M., Watanabe S., Hayashi-Takagi A., Noguchi J., 2010. Trends in Neurosciences 33:121-129.
- Kessal K., Deschaux O., Chessel A., Xu L., Moreau JL, Garcia R., 2005. Fluoxetine reverses stress-induced fimbria-prefrontal long-term potentiation facilitation. NeuroReport, 17:319-322.
- Kitamura T., Ogawa S., Roy D., Okuyama T., Morrissey M., Smith L., Redondo R., Tonegawa S. 2017. Engrams and Circuits Crucial for Systems Consolidation of a Memory. Science, 356:73-78.
- Keifer O., Hurt R., Ressler K., Marvar P., 2015. The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning. Physiology Reviews 30:389–401.
- Kobayashi K, Haneda E, Higuchi M, Suhara T, Suzuki H. 2012. Chronic fluoxetine selectively upregulates dopamine D₁-like receptors in the hippocampus. Neuropsychopharmacology. 37:1500-8
- Kopec C. e Malinow R., 2006. Matters of Size. Science, 314:1554-1555.
- LaLumiere R., McGaugh J., McIntyre C. 2017. Emotional Modulation of Learning and Memory: Pharmacological Implications. Pharmacol Rev. 69:236-255
- Lissek S, Kaczkurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. 2014 Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. Biol Psychiatry. 75:909-915.
- Liu Y, Wang Y, Shen W, Wang Z. 2017. Enhancement of synchronized activity between hippocampal CA1 neurons during initial storage of associative fear memory. The Journal of Physiology.
- Lopresto D, Schipper P, Homber J. 2015. Neural Circuits and Mechanisms Involved in Fear Generalization: Implications for the Pathophysiology and Treatment of Posttraumatic Stress Disorder. Neuroscience & Biobehavioral Reviews.
- Lynch M., 2004. Long-Term Potentiation and Memory. Physiol Rev 84:87–136
- Mahan AL e Ressler KJ. 2012 Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. Trends Neurosci. 35:24-35.
- Maiti P, Manna J, Ilavazhagan G, Rossignol J, Dunbar G. 2015. Molecular Regulation of Dendritic Spine Dynamics and Their Potential Impact on Synaptic Plasticity and Neurological Diseases. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 59: 208–237
- Malenka C., Bear M. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron. 44:5–21.
- McDonald A., 1998. Cortical Pathways to the Mammalian Amygdala. Progress in Neurobiology, 55:257-332.
- McGaugh JL, 1966. Time-Dependent Processes in Memory Storage. Science, 153:1351-1358

- McGaugh JL, 1999. The perseveration-consolidation hypothesis: Mueller and Pilzecker, 1900. *Brain Research Bulletin*, 50: 445–446.
- McGaugh JL, 2000. Memory-a century of consolidation. *Science*, 287:248-251
- Medina J, Schröder N, Izquierdo I. 1999. Two different properties of short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research* 103: 119–121
- Méndez P, Pazienti A, Szabó G, Bacci A. 2012. Direct alteration of a specific inhibitory circuit of the hippocampus by antidepressants. *J Neurosci.*; 32 (47): 16616-28.
- Molter C. e Yamaguchi Y, 2008. Impact of temporal coding of presynaptic entorhinal cortex grid cells on the formation of hippocampal place fields. *Neural Networks* 21:303–310
- Mueller, G. E.; Pilzecker, A. 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. *Zeitschrift fuer Psychologie* 1:1–288.
- Nabavi S., Fox R., Proulx C., Lin J., Tsien R., Malinow R., 2014. Engineering a memory with LTD and LTP *Nature*, 511:348–35.
- Norris D., 2017. Short-Term Memory and Long-Term Memory are Still Different. *Psychological Bulletin*. 1-18
- Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, de Oliveira AL. 2016. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus* 33: 1-10.
- Popova D., Ágústsdóttir A, Lindholm J, Mazulis U, Akamine Y, Castrén E, Karpova N. 2014. Combination of fluoxetine and extinction treatments forms a unique synaptic protein profile that correlates with long-term fear reduction in adult mice. *European Neuropsychopharmacology*, 24(7):1162-74
- Poo M., Pignatelli M., Ryan T., Tonegawa S., Bonhoeffer T., Martin K., Rudenko A., Tsai L., Tsien R., Fishell G., Mullins C., Gonçalves T, Shtrahman M., Johnston S., Gage F., Dan Y., Long J., Buzsáki G., Stevens C., 2016. What is memory? The present state of the engram. *BMC Biology* 1-18
- Quillfeldt JA, 2006. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. Capítulo 20. *Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research*
- Ramón y Cajal, S. 1899. *La Textura del Sistema Nerviosa del Hombre y los Vertebrados*. Moya, Madrid
- Rapport M, Green A, Page I, 1948. Serum vasoconstrictor (serotonin). Isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 176:1243–1251
- Rocheffort N. & Konnerth A, 2012. Dendritic Spines: from Structure to *in vivo* Function. *EMBO reports* 13:699–708.

Roozendaal B., McEwen B., Chattarji S. 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci.* v.6:423-33.

Roozendaal B., McGaugh J., 2011. Memory Modulation. *Behaviour Neuroscience*, 125:797–824.

Routtenberg A., 2008. The substrate for long-lasting memory: if not protein synthesis, then what? *Neurobiol Learn Mem.*89:225–233.

Rubio F, Ampuero E, Sandoval R, Toledo J, Pancetti F, Wyneken U. 2013. Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. *Front Cell Neurosci.* 9:7: 66.

Sachser R., Santana F., Crestani AP., Lunardi P., Pedraza LK, Quillfeldt JA., Hardt O., de Oliveira Alvares L., 2016. Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage dependent Ca²⁺ channels, and calcineurin. *Scientific Reports* 6:1-9

Sahay A, Hen R. 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience.* 10(9):1110-5

Schatzberg A. F. 2000. New indications for antidepressants. *J. Clin. Psychiatry* 61:9–17.

Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 20:11-21.

Sala C. e Segal M., 2014. Dendritic Spines: the Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiol Rev* 94:141–188

Sanchs B e Caron M. 2015. Chronic Fluoxetine Increase Extra-Hippocampal Neurogenesis in Adult Mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 1-12.

Schwabe L., Joëls M., Roozendaal B., Wolf O., Oitzl M., 2012 Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36:1740–1749

Segal M, 2017. Dendritic Spines: Morphological Building Blocks of Memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138:3-9

Squire L. 2004. Memory Systems of the Brain: a Brief History and Current Perspective. *Neurobiol Learn Mem.*, 82:171-177.

Squire L., Zola-Morgan A. 1991. Memory, Brain and Behavior. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:1-14.

Stagni F, Magistretti J, Guidi S, Ciani E, Mangano C, Calzà L, Bartesaghi R. 2013. Pharmacotherapy with fluoxetine restores functional connectivity from the dentate gyrus to field CA3 in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *PLoS One.* 19:e61689.

Swanson L. e Petrovich G., 1998. What is the amygdala? *TINS* 21:323-331.

- Taube JS, Muller R., Ranck J., 1990. Head-Direction Cells Recorded from the Postsubiculum in Freely Moving Rats. I. Description and Quantitative Analysis. *The Journal of Neuroscience*, 2:420-435
- Tonegawa S., Pignatelli M, Roy D, Ryan T. 2015. Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology* 35:101–109.
- Tonnessen J e Nagerl U, 2016. Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals. *Frontiers in Psychiatry*. 7:1-10
- Van Haefen T., Baks-te-Bulte L., Goede P., Wouterlood F., Witter M., 2003. Morphological and Numerical Analysis of Synaptic Interactions Between Neurons in Deep and Superficial Layers of the Entorhinal Cortex of the Rat. *Hippocampus*, 13:943–952.
- Vianna M., Izquierdo L., Barros D., Walzi R., Medina R., Izquierdo I., 2000, Short- and Long-term memory: Differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An. Acad. Bras. Ci.* 3:353-364.
- Wiltgen BJ e Silva AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem.*, 14:313-317.
- Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ. 2010 The Hippocampus Plays a Selective Role in the Retrieval of Detailed Contextual Memories. *Curr Biol*. 20:1336-1344
- Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M. 2007 Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neuroscience*. 5:555-557.
- Witter MP., Canto C., Couey J., Koganezawa N., O'Reilly K., 2014. Architecture of spatial circuits in the hippocampal region. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369:20120515
- Xu J, Chan M, Yang Y, 2011. Fluoxetine as a treatment for post-traumatic stress disorder. *Neurosciences*; Vol. 16 (3): 257-262
- Zola-Morgan, S.M., Squire, L.R., 1990. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science* 250, 288-290.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA HIPPOCAMPUS

Author Guidelines

TEXT

Submit your text in DOC or RTF format. Do not embed figures or tables in this document; these should be submitted as separate files.

TABLES

Tables should be created with a word processor and saved in either DOC or RTF format. Do not embed tables in your text.

FIGURES

To ensure the highest print quality, your figures must be submitted in TIF format according to the following minimum resolutions:

- 1200 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)
- 300 dpi for halftones (black and white photographs)
- 600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

Vector-based figures (e.g., figures created in Adobe Illustrator) should be submitted in EPS format.

Authors are encouraged to visit <http://cpc.cadmus.com/da/> for more information regarding supported artwork formats.

COLOR FIGURES

In addition to the above resolution guidelines, color figures must be submitted in a CMYK colorspace. Do not submit color figures as RGB.

UNACCEPTABLE FIGURE FORMATS

Do not submit figures in any of the following formats: JPG, GIF, PSD, CRD, PCT, PPT, PDF, XLS, DOC, BMP, 123 (or other Lotus formats).

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at ts.mcsupport@thomson.com.

General Information

Because of space constraints in publication of the journal, original research papers must be limited to 10 printed pages, based on an expectation of approximately 50,000 characters and 4-6 one-quarter to half page figures. During review, the editors may require shortening of text or limiting of figures if the composite exceeds 10 printed pages. The cost of reproduction of all color illustrations, however, must be borne by the author

Forms of Manuscripts

Papers reporting original research will be the major substance of the journal, but occasional short Commentaries will also be published. The Commentaries will be of three types: *Historical Reviews* of individual careers or areas of research; *Updating Reviews* that briefly summarize the state of knowledge in a particular subject area; and *Speculative Reviews*, in which new perspectives or hypotheses are outlined. The *Speculative Reviews* may

take the form of Point-Counterpoint presentations by two or more authors with differing viewpoints on a topic area. The publication of a *Commentary* in *Hippocampus* will normally follow an invitation to the author(s) from the Editor. However, anyone interested in contributing a Commentary or suggesting a topic for one is invited to contact the Editor. The Editor also wishes to encourage neurobiologists to contribute to the journal by writing short letters, which will be considered for publication in a separate *Letters to the Editor* section. This section will provide a medium for communication and discussion, not only of points that arise from papers published in *Hippocampus*, but also of topics of general interest to the readership of the journal. The Editor reserves the right to invite replies or comments to such letters at his discretion.

Rapid Communications

Papers submitted as Rapid Communications will receive an expedited review and priority for publication once accepted. Rapid Communications should occupy no more than three journal pages including references (generally no more than 30) and figures. A typical journal page contains approximately 1,200 words. Thus, articles containing one page of illustrative material should normally be confined to approximately 2,000 words excluding references.

Rapid Communications should begin with an Abstract or Introductory Paragraph of less than 200 words summarizing the background, goals of the research, and conclusions. The body of the text should include an expanded background and rationale for the research and a brief overview of methods that reference papers providing detailed descriptions of methods. The bulk of the text should be devoted to the results and a brief discussion of the significance and implications of the research. No section headings (e.g., Materials and Methods, Results) should be used in this format. If, on the rare occasion, a more extensive description of methods is essential for understanding the results of the research, this text should be included at the end of the paper and titled, Detailed Methods. References should be cited and formatted as in standard Research Papers published in *Hippocampus*.

Review and Production Process

In general, submitted manuscripts will be confidentially refereed by at least two members of the Editorial Board. If the reviewers disagree on the acceptability of the manuscript, a third evaluation will be sought. In those cases in which the content of a manuscript is outside the field of expertise of members of the Editorial Board, it will be forwarded to qualified reviewers. To facilitate the review process, authors are encouraged to suggest the names of reviewers in addition to members of the Editorial Board whose expertise qualifies them to referee the paper. The actual selection of the reviewers, however, will be determined by the Editor, acting on the advice of the Section Editor and the Editorial Board. Based on the findings of the reviewers, a decision will be made by the Editor, and the author will be notified as soon as possible. In the case that revision of the manuscript is required, it should be noted that manuscripts not resubmitted within 3 months may be treated as new submissions.

Submission of a paper to *Hippocampus* will be taken to imply that it represents original research not previously published, except as an abstract, and that it is not being considered for publication elsewhere in similar form. At the time of submission, each manuscript should be accompanied by a statement from the submitting author that all coauthors agree to having their names listed as authors and that colleagues whose unpublished work is referred to, or who are acknowledged, agree to that.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Electronic proofs will be sent to the first author or the author designated for proofreading. All corrections should be clearly marked on the proofs, which should be returned to the publisher's office within 3 days. Costs for alterations in the proofs other than corrections of printer's errors may be charged to the authors. There will be no proofs for the Letters section. Reprints: Reprints may be purchased at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=hipo>.

Publication Charges

Currently, no page charges are levied against authors or their institutions for the publication of articles or the posting of associated supplementary material. With regard to color figures, online color is free. Printed color (no limit) is billed at a flat rate of \$850 per figure.

Preparation of the Manuscript

The manuscripts should be typed double-spaced throughout with a 1" (2.5 cm) margin on all sides. All pages should be numbered consecutively, beginning with the title page. Manuscripts should be written using standard American spelling. The spelling of nontechnical terms should preferably follow that indicated in *Webster's Third International Dictionary*. The numbers one through nine should be spelled out; Arabic numerals should be used for numbers greater than nine and units of time and measure. All numbers should be spelled out when they appear as the first word of a sentence. Abbreviations should never be used at the beginning of a sentence.

Research papers should include a Title Page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Acknowledgments, and Figure Legends. Tables and figures should be submitted as separate files. Footnotes should not be used. If absolutely essential, they should be incorporated in the text, in parentheses.

Please consider the following guidelines in the Resource Identification Initiative. *Hippocampus* is participating in the [Resource Identification Initiative](#), which aims to promote research resource identification, discovery, and reuse. This initiative, led by the Neuroscience Information Framework and the Oregon Health & Science University Library, provides unique identifiers for antibodies, model organisms, cell lines, and tools such as software and databases. These IDs, called Research Resource Identifiers (RRIDs), are machine-readable and can therefore be used to search for all papers in which a particular resource was used and to increase access to critical data to help researchers identify suitable reagents and tools.

As part of this pilot project, we ask authors to use RRIDs to cite the resources used in your research where applicable in the text, exactly as you would a regular citation or Genbank Accession number. For antibodies, we ask that you please include in your citation the vendor, catalogue number, and RRID in the text upon first mention in the methods section. For software tools and databases, please provide the name of the resource followed by the resource website if available, and the RRID. For model organisms, the RRID alone is sufficient.

We also ask that you please include the RRIDs in the list of keywords associated with your manuscript.

To Obtain Research Resource Identifiers (RRIDs):

1. Use the [Resource Identification Portal](#), created by the Resource Identification Initiative Working Group.
2. Search for your research resource (please see the section titled “Search Features and Tips” for more information)
3. Click on the “Cite This” button to obtain the citation and insert the citation into your manuscript text.

If you have a resource that is not found within the Portal, we encourage you to register the resource with the appropriate resource authority. Information on how to do this is provided in the “Resource Citation Guidelines” section of the Portal.

If you experience any difficulties obtaining identifiers, please contact rii-help@scicrunch.org for assistance.

Example Citations:

Antibodies: "Wnt3 was localized using a rabbit polyclonal antibody C64F2 against Wnt3 (Cell Signaling Technology, Cat# 2721S, RRID: AB_2215411)"

Model Organisms: "Experiments were conducted in *c. elegans* strain SP304 (RRID:CGC_SP304)"

Cell lines: "Experiments were conducted in PC12 CLS cells (CLS Cat# 500311/p701_PC-12, RRID:CVCL_0481)"

Tools, Software, and Databases: "Image analysis was conducted with CellProfiler Image Analysis Software, V2.0 (<http://www.cellprofiler.org>, RRID:nif-0000-00280)"

Title Page. The Title Page should include the complete title of the paper, together with the name(s) of the author(s) and institutional affiliations (to department level); a running (abbreviated) title, not exceeding 60 characters and spaces; the number of text pages, figures, and tables; and the name, full address, telephone number, and E-mail address of the author to whom correspondence, including proofs, should be sent, and all grant information in the following format: Grant sponsor: _____; Grant number: _____. A list of five key words that do not occur in the title should be included for abstracting purposes. The title should represent the contents of the paper and should not include technical jargon, chemical formulas, or arbitrary abbreviations.

Abstract. The Abstract should be clearly written in 300 words or less and should succinctly state the objectives of the study, experimental design, major observations and conclusions, and their major significance. The abstract should be intelligible to neuroscientists in general and should thus be free of specialized jargon and abbreviations. References should generally not be cited in the abstract, but if they are, the complete citation should be given (e.g., Conti F et al., *J Comp Neurol* 1994; 343:554–565).

Introduction. The Introduction section should provide sufficient background information to make clear the rationale and objectives of the reported studies. Extensive literature reviews are generally not necessary.

Materials and Methods. The Materials and Methods section should be concise but should adequately describe experimental procedures to allow for replication of the reported experiments. Wherever possible, references should be made to published protocols. Excessively detailed descriptions of widely used techniques or details of procedures that will not be of general interest to the reader should be avoided. Submission of a paper to *Hippocampus* implies that all animal experimentation reported in the paper has been conducted in accordance with the guidelines laid down by the NIH (*NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) in the USA or by the European Communities Council. When human subjects are used, adequate documentation should be included in the manuscript that the experiments were undertaken with the understanding and consent of each subject. It is assumed that with the publication of a paper in *Hippocampus* the authors will make available, whenever possible, reagents, such as antibodies, that were used in the research and are not commercially available.

Results and Discussion. In the Results section, findings should be described without discussion of their significance. Authors are encouraged to use subheadings to clarify the organization of this section. In the Discussion, authors should provide an interpretation and validation of their findings, conclusions, and their significance in relation to previously published work. Repetition of the results or extensive review of the literature should be avoided.

References

It is the responsibility of the author(s) that each reference in the text appears in the References section and that each reference listed in this section is correct and cited in the text. References should be cited in the text by author's name followed by year of publication, thus: Ben-Ari (1981) or (Ben-Ari, 1981); Squire and Zola (1983) or (Squire and Zola, 1983). In the case that there are more than two co-authors: Lopes da Silva et al. (1989) or (Lopes da Silva et al., 1989). A typical citation should follow the form: Data reported by Ben-Ari (1981) have recently been confirmed by others (Lopes da Silva et al., 1989). When more than one reference is cited, the references should be listed in chronological order. A paper that is in preparation or submitted to a journal but not yet accepted for publication should not be included in the References section; reference to a paper of this type should be cited as "unpublished observations", and the initials and surname(s) must be listed in the text for the author(s) whose unpublished experiments are cited.

In the References section, papers should be listed in alphabetical order according to the name of the first author. In the case of several references with the same first author but more than one co-author, the references should be listed in chronological order. When references are made to more than one paper by the same first author published in the same year, the postfix a, b, c, etc., should be used both in the text and in the References section; for papers published in different years, the references should be listed in chronological order. The name of the author(s) should be followed by the full title of the paper, and the complete source of the reference (abbreviations of journals

should follow those used in Index Medicus), including the year of publication, volume number, and the first and last pages. The form used in the References section should follow APA reference style according to the following examples:

Journal article:

Goldstein, H. (1979). Improving police: A problem-oriented approach. *Crime & Delinquency*, 3, 236–258

Book:

Goldstein, H. (1990). Problem-oriented policing. New York, NY: McGraw-Hill. Miles, M. B., & Huberman, A.

M. (1994). *Qualitative data analysis* (2nd ed.). Thousand Oaks, CA: Sage.

Edited Book:

Gilbert, D. G., McClernon, J. F., Rabinovich, N. E., Sugai, C., Plath, L. C., Asgaard, G., ... Botros, N. (1983). Situational crime prevention: Its theoretical basis and practical scope. In M. Tonry, & N. Morris (Eds.), *Crime and justice: An annual review of research* (Vol. 4, pp. 225–256). Chicago, IL: University of Chicago Press.

Paper Presentation:

Weiss, A., & McGarrell, E. F. (1996, November). *The impact of increased traffic enforcement on crime*. Paper presented to the Annual Meeting of the American Society of Criminology, Chicago, IL.

Symposium:

Muellbauer, J. (2007, September). Housing, credit, and consumer expenditure. In S. C. Ludvigson (Chair), *Housing and consumer behavior*. Symposium conducted at the meeting of the Federal Reserve Bank of Kansas City, Jackson Hole, WY.

Conference paper abstract retrieved online:

Liu, S. (2005, May). *Defending against business crises with the help of intelligent agent based early warning solutions*. Paper presented at the Seventh International Conference on Enterprise Information Systems, Miami, FL. Abstract retrieved from http://www.iceis.org/iceis2005/abstracts_2005.htm

Proceedings published regularly online:

Katz, I., Gabayan, K., & Aghajan, H. (2007). A multi-touch surface using multiple cameras. In J. Blanc-Talon, W. Philips, D. Popescu, & P. Scheunders (Eds.), *Lecture Notes in Computer Science: Vol. 4678. Advanced Concepts for Intelligent Vision Systems* (pp. 97–108). Berlin, Germany: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-3-540-74607-2

Thesis/Dissertation:

Schnittker, J. (2004). *Education and the changing shape of the income gradient in health* (Unpublished doctoral dissertation or master's thesis). Name of institution, location.

Report:

Muthen, L. K., & Muthen, B. O. (2004). *Child care and child development* (Report No. xxx). Los Angeles, CA: Publisher.

Patent:

Smith, I. M. (2011). *U. S. Patent No. 235,445*.

Place: Publisher Magazine:

Mathews, J., Berrett, D., & Brillman, D. (2005, May 16). Other winning equations. *Newsweek*, 145(20), 58–59.

Preparation of Illustrations. Illustrations submitted for publication should be the exact size that they will appear in print. The size of illustrations should not exceed the dimensions of the journal itself (7" x 9 3/8", or 17.8 cm x 23.8 cm). All figures, both line drawings and halftones, should be appropriately lettered and labeled. Lettering should remain at least 1/4" (6 mm) from the edges of figures to allow for trimming. The cost for printing color art is \$850 per figure. The cost will be higher if the color art is submitted other than as specified above. Figures considered to be of insufficient quality for publication will be returned to the author(s) for correction. All figures

must be referred to in the text and must be numbered and cited consecutively (Fig. 1, Fig. 2, etc.). Each figure should be accompanied by an explanatory legend that makes the illustration understandable without need for reference to the text.

Guidelines for cover submissions If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow these general guidelines.

Preparation of Tables. Each table should be typed, double-spaced, as a separate doc or rtf file. The table should include an informative title and a legend that makes the table comprehensible without resorting to the text. Each column in the table should have a heading, and the columns should be formatted to be easily distinguishable by the compositor. If the table is highly complex, it should be submitted as a graphic in tiff or eps format so as to avoid introduction of errors during typesetting that would be difficult to detect in the proofreading stage. In this case, tables should be prepared using the same considerations one would apply to a line drawing illustration. All tables must be referred to in the text and must be numbered and cited consecutively (Table 1, Table 2, etc.).

Units, Symbols, and Abbreviations . For symbols of physical units, the SI system (Système International d'Unités) should be used. Abbreviations should not be used excessively in the text, and in all cases the word or words to be abbreviated should be written in full on the first occurrence, followed by the abbreviation in parentheses. The same abbreviations should be used in both the text and figures. If many abbreviations are used, including those used repeatedly in the tables or figures, they should be listed on a separate sheet, entitled Abbreviations.

Posters deposited in public access collections will not be considered as prior publication for the purposes of our acceptance at *Hippocampus*. However, the editors reserve the right to ask for the poster to insure that the information contained in the paper goes beyond or is different from that contained in the poster in some way and is not a duplicate publication.

Data Set Access.

Authors are encouraged to make available the data sets relevant to the study and add reference to how the repository can be accessed.

Referrals to the Open Access Journal, *Brain and Behavior*

Hippocampus works together with Wiley's Open Access journal, *Brain and Behavior*, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. The editor of *Hippocampus* may offer the authors the option to have their manuscript directly transferred to *Brain and Behavior*. The transfer will occur on-line and guarantee the anonymity of the peer-review process. It will not require reformatting or rewriting the manuscript at this stage. *Brain and Behavior* will render an editorial decision within a short time after the transfer. The Editor of *Brain and Behavior* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. Accepted papers can be published rapidly, typically within 15 days of acceptance. *Brain and Behavior* is an Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to <http://www.brain-behavior.com/info>.

Peer Review Scorecard Pilot

Hippocampus is participating in Wiley's pilot of transferable peer review in which reviewers complete a standard scorecard in addition to their usual review. Authors of original research articles rejected with completed scorecards will be invited to transfer the manuscript, reviews, and scorecard to any of the other participating journals in the pilot. Authors will have the opportunity to revise their manuscript according to the review comments prior to

transfer if they wish to do so. A list of participating journals and more information about the pilot can be found [here](#). We believe that this system of preserving original peer review for the next journal's use will decrease repetitious review, save authors, reviewers and editors valuable time and significantly increase the speed to publication for many papers.