

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)

Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Laboratório de Neurobiologia da Memória (LNM)

**ATENUAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS POR MEIO DA
RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
CAFEÍNA, FLUOXETINA E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA EM CIRCUITO
FECHADO**

LIZETH KATHERINE PEDRAZA CORREA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre/RS

2019

DEDICATÓRIA

Para meu esposo,
Rodrigo Sierra.

Em memória
Ao meu Pai,
Alonso Pedraza.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu esposo, **Rodrigo Alejandro Sierra**, uma pessoa maravilhosa, meu mais lindo amor, melhor amigo, colega e mestre. você sempre esteve ao meu lado nos momentos importantes na minha vida pessoal e profissional, sendo minha principal fonte de inspiração. Quero que saibas que admiro muito o cientista e o ser humano tão valioso que você é e por isso agradeço imensamente todos os dias por todas as experiências que passamos juntos para chegarmos até aqui – e espero que continuemos para sempre unidos nesta nossa jornada neurocientífica.

Agradeço ao meu pai, **Alonso Pedraza**, você agora somente vive na minha memória, mas o amor e admiração que eu sinto por você é tão infinito que todo dia lembro das tuas palavras, sabedoria e amor, e com isso basta para eu ficar motivada e feliz para alcançar meus objetivos. Quero que saiba, onde estejas, que tudo o que eu consegui e que ainda vou conseguir na minha vida é dedicado a você.

Agradeço à minha mãe, **Mélida Correa Giraldo**, a pessoa que me deu a vida e a mulher que eu mais amo no universo. Me proporciona o amor e a força que preciso no meu dia a dia para eu continuar conquistando meus sonhos. Te amo, você é a musa do meu viver.

Agradeço ao Doutor **Lucas de Oliveira Alvares**, orientador do meu mestrado e do meu doutorado. Um homem muito inteligente, grande amigo e maravilhoso ser humano. Muito obrigada por tudo o que você me ensinou, pelo belo caminho que a gente percorreu até hoje. Sou muito orgulhosa e afortunada de ter você como orientador. A gente sempre vai continuar junto, longe ou perto a ciência e a amizade vai nos levar pelo mesmo caminho. Te admiro muito, meu grande mestre.

Agradeço ao **Laboratório de Neurobiologia da Memória**, meus colegas, aqueles que já saíram e os que ainda estão. conviver com vocês ao longo desses anos foi uma experiência

muito valiosa e enriquecedora. Sou muito grata por ter conhecido e compartilhado parte da minha vida acadêmica com cada um de vocês.

Agradeço ao **PPG neurociências da Universidade Federal do Rio grande do Sul (UFRGS)** por me permitir fazer o meu doutorado. Sinto muito orgulho por ter estudado aqui no Brasil com vocês, que propiciaram um ambiente enriquecedor para meu crescimento acadêmico e profissional.

Agradeço à doutora **Gisele Manfro** pela avaliação e relatoria da Tese, e os membros da comissão examinadora, o doutor **Rafael Roesler** e à doutora **Grace Schennato Pereira**.

Agradeço ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** a instituição que me deu a bolsa que financiou o meu doutorado e as minhas pesquisas no Brasil.

Agradeço ao Doutor **Berényi Antal**, e ao seu laboratório “Berényi lab” da University of Szeged, que me deu a oportunidade de continuar minha vida científica na Hungria, pesquisando sobre os correlatos eletrofisiológicos da memória.

Muito obrigada. Sem vocês e muitas outras pessoas que fizeram grandes aportes na minha formação, nada disso seria possível!

Epígrafe

*Nothing in life is to be feared,
it is only to be understood.
Now is the time to understand more,
so that we may fear less.*

Marie Curie

Resumo

A atenuação de memórias aversivas é um dos grandes desafios da psiquiatria translacional e da prática clínica. Atualmente duas estratégias comportamentais têm sido estudadas, a extinção e a reconsolidação da memória. A primeira é baseada em repetidas exposições aos estímulos traumáticos num ambiente seguro. A reconsolidação por outro lado se mostra promissora, no entanto ainda não conseguiu permear no tratamento clínico e continua em debate sua implicação prática em humanos. Neste trabalho, testamos os efeitos da cafeína e da fluoxetina na reconsolidação e extinção de memórias aversivas contextuais em ratos. A cafeína conseguiu reduzir o medo condicionado em memórias fracas, fortes e muito intensas, assim como memórias remotas. No caso da fluoxetina, animais tratados cronicamente conseguiram discriminar melhor entre o contexto de treino e um contexto neutro, além de facilitar a extinção. O mecanismo pelo qual a fluoxetina afeta a generalização e a extinção parece ser através do contínuo engatilhamento do hipocampo durante a evocação e tal efeito depende de uma remodelação dos espinhos dendríticos no hipocampo, principalmente aqueles espinhos maduros, tipo cogumelo. Em populações não tratadas e categorizadas como discriminadores e generalizadores, foi encontrada uma correlação negativa entre a maior taxa de discriminação e menores níveis de congelamento no teste da extinção, mostrando que possivelmente o efeito induzido pela fluoxetina na extinção pode ser explicado pela manutenção da discriminação. O resultado se mostrou também associado com dependência hipocampal durante a evocação da memória. Em conjunto, nossos resultados mostraram que substâncias amplamente consumidas como a cafeína e a fluoxetina podem atenuar memórias aversivas por mecanismos diferentes. Além do debate acerca de novas perspectivas clínicas, discutimos nossos resultados com base na teoria da consolidação sistêmica da memória.

Abstract

Fear memory attenuation represents a major challenge in translational psychiatric and clinical practice. Currently, two behavioral strategies have been used to enhance fear memory reduction, extinction and memory reconsolidation. The first one is supported by several evidence, from a theoretical perspective to practical levels. In fact, exposed-based therapies are the classical approach for fear-related disorders. On the other hand, memory reconsolidation seems to be promissory, however, it has not been able to permeate clinical treatments and currently is under intense debate about their practical applications in humans. In this work, we evaluate the effects of caffeine and fluoxetine during reconsolidation and extinction of contextual fear memories in rats. Our results showed that caffeine is able to enhance fear memory attenuation using periodical memory reactivation in contrast to the generalized protocol based on a single memory reactivation. Caffeine was able to attenuate fear memory in weak, strong and very strong training protocol as well as remote memories. Fluoxetine was able to maintain memory precision and enhance extinction, the mechanism through which fluoxetine affects generalization and extinction seems to be through the postponement of systems consolidation, thereby maintaining hippocampal involvement during retrieval. Such an effect relies on a remodeling of dendritic spines in the hippocampus, as well as the number of mature, mushroom-type spines promoted by fluoxetine treatment. In a large number of non-treated animals categorized as discriminator and generalizer, we found a negative correlation between the discrimination index and freezing levels after extinction. This result suggests that effects of fluoxetine during extinction can be partially related to the ability of fluoxetine to maintain memory discrimination. In addition, fluoxetine promotes the hippocampal involvement during memory retrieval. Taking together, our results showed that caffeine and fluoxetine are able to reduce fear memory by different mechanism. Our results are discussed in light of systems consolidation hypothesis and new frameworks are proposed toward the establishment of precise psychiatry and clinical psychology.

Lista de Abreviaturas

5-HT Serotonina

5-HT1A Receptor serotoninérgico do tipo 1A

5-HT2A Receptor serotoninérgico do tipo 2A

5-HT2C Receptor serotoninérgico do tipo 2C

A1 Receptor adenosinérgico do tipo 1

A2A Receptor adenosinérgico do tipo 2A

AL Amígdala lateral

AMPA Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AP5 Antagonista dos receptores NMDA de glutamato Ácido 2-Amino 5-fosfonopentanoico

BDNF Fator neurotrófico derivado do cérebro

D1 Receptor dopaminérgico do tipo 1

D2 Receptor dopaminérgico do tipo 2

DHEA Dehidroepiandrosterona

BLA Amígdala basolateral

CA1 Corno de Amon 1, região hipocampal

CA3 Corno de Amon 3, região hipocampal

CAC Condicionamento aversivo ao contexto

CCA Córtex Cingulado Anterior

CCPA 2-CloroN6-ciclopentiladenosina

CeA Amígdala central

CP-AMPA Receptores glutamatérgicos do tipo AMPA permeáveis ao cálcio

CPX 8-Ciclopentil-1,3-dimetilxantina

CI-AMPA Receptores glutamatérgicos do tipo AMPA impermeáveis ao cálcio

CID-11 Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde

CNQX Antagonista dos receptores glutamatérgicos AMPA/Cainato

CREB Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc

CS+ Estímulo condicionado

CS- Estímulo incondicionado

DCS D-Cicloserina

DLD Depressão de longa duração

DSM Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EEG Electroencefalografia

EM Algoritmo de Maximização da Expectativa” (*expectation-maximization*)

FDA *US Food and Drug Administration*

fMRI ressonância magnética funcional

GABA Acido γ -aminobutírico

GABA-A Receptor GABAérgico do tipo A

GABA-B Receptor GABAérgico do tipo B

Gs Subunidade estimulatória da proteína G

GluN2A Subunidade do receptor NMDA do tipo 2^a

IL_Cx Córtex infralímbico

IMAO Inibidores da monoaminoxidase

ISRS Inibidores Seletivos da Receptores de Serotonina

iPlasticity Antidepressivos que induzem plasticidade semelhante ao encéfalo jovem
(*Antidepressants induce juvenile-like plasticity*)

MAPK Proteínas cinases ativados por mitógenos

MMP Metaloproteinases

NA Noradrenalina

NAc Núcleo accumbens

NMDA Receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato

NST Núcleo da estria terminal

NR2B Receptores NMDA contendo a subunidade NR2B

PrI-Cx Córtex pré-límbico

REM Sono de movimento rápido dos olhos

TEPT Transtorno de estresse pós-traumático

TOC Transtorno obsessivo-compulsivo

PLD Potenciação de longa duração

PKA Proteína cinase A

VHip Hipocampo ventral

Lista de Figuras (introdução, resultados preliminares e discussão geral)

Figura 1. Classificação dos Transtornos de Ansiedade.

Figura 2. Principais modelos animais utilizados no estudo do TEPT.

Figura 3. Sequência de eventos envolvendo o condicionamento clássico Pavloviano.

Figura 4: Modelo de electoma para avaliar fenótipos vulneráveis e resilientes ao estresse.

Figura 5: Implante de eletrodos intracranianos.

Figura 6: Implante de *copper mesh*.

Figura 7: Representação do implante final após cirurgia.

Figura 8: Animal após o implante em livre movimento

Figura 9: Output do sistema de registro e processamento em tempo real.

Figura 10: Resumo dos resultados após padronização da generalização no condicionamento aversivo ao som.

Figura 11: Índice de discriminação entre CS+ e CS-.

Figura 12: Correlação negativa entre a mudança em sono não REM entre habituação e treino comparada com o congelamento ao estímulo CS+ e CS-.

Figura 13: Protocolo de sessão única de extinção (CS+ x 20).

Figura 14: Sistema de estimulação em circuito aberto e fechado.

Figura 15: Critério de remissão.

Figura 16: Protocolo de renovação.

Figura 17: Estimulação do FPM gera condicionamento de preferência de local.

Figura 18: Estimulação em circuito fechado entre ripple hipocampal e FPM.

Figura 19: Modelo iPlasticity (antidepressants induce juvenile-like plasticity).

Figura 20: Algoritmo de Maximização da Expectativa.

Lista de Tabelas (introdução e discussão geral)

Tabela 1: Critérios diagnósticos do DSM-5 e principais mudanças em relação ao DSM-IV-TR.

Tabela 2. Estratégias visando melhorar processos de labilização e reconsolidação da memória.

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Epígrafe	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
1. Introdução	4
1.1 Transtorno de Estresse Pós-traumático: Sistemas de classificação e orientação transdiagnóstica.....	4
1.2 Poderia o transtorno de estresse pós-traumático ser classificado como um transtorno da memória?	8
1.3 Interferindo em traços mnemônicos: reconsolidação como alvo na expressão de memórias aversivas.....	12
1.4 Atualizar ou extinguir? Duas aproximações comportamentais no controle da expressão de memórias aversivas.....	16
1.5 Validade de modelos animais no estudo de transtornos associado ao trauma. O caso do condicionamento Pavloviano.....	19
1.6 Controle farmacológico da expressão de memórias aversivas: Evidências de modelos animais e ensaios clínicos.....	25
1.6.1 Inibidores seletivos da recaptção de serotonina e controle da expressão do medo: O caso da fluoxetina.....	28
1.6.2 Podem substâncias naturais afetar as respostas de medo e ansiedade? O caso da cafeína.....	31
1.7 A generalização da memória como um marcador de transtornos associados ao trauma: Relação com a consolidação sistêmica da memória	35
1.8 Perspectiva sistêmica do condicionamento aversivo: Padrões oscilatórios....	40

1.9 Muito Além da farmacologia: Presente e futuro da psiquiatria de precisão.....	42
2. Objetivos (“Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats” publicado na revista Scientific Reports)	49
2.1 Objetivo Geral.....	49
2.2 Objetivos Especificos.....	49
“Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down systems consolidation” pulicado na revista Translational Psychiatry.....	51
2.3 Objetivo Geral.....	51
2.3.1 Objetivos Especificos.....	51
3. Manuscritos.....	52
3.1 Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats.....	52
3.2 Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down systems consolidation.....	53
3.3 Resultados preliminares: Caracterização eletrofisiológica da generalização da memória em animais em livre movimento e intervenção em cirutio fechado para o melhoramento da extinção.....	54
4. Conclusões gerais.....	73
4.1 Reativação única vs. Reativação periódica.....	73
4.2 A cafeína e seus efeitos na memória.....	77
4.3 O contracondicionamento e os estados endógenos induzidos farmacologicamente.....	78
4.4 Cafeína como substância terapêutica a partir dos seus efeitos ansiolíticos e reforçadores.....	80
4.5 Existe uma relação entre a cafeína e a fluoxetina na atenuação de memórias aversivas?.....	82
4.6 Fluoxetina como modulador da generalização e dependência hipocampal e seus efeitos na subsequente extinção da memória.....	83
4.7 Por que a fluoxetina funcionou e não o citalopram?	85

4.8 O efeito de descontinuidade do tratamento.....	87
4.9 Seria a consolidação sistêmica da memória um alvo terapêutico?	88
4.10 Caminhando para uma psiquiatria de precisão.....	92
4.20 Intervenções sob demanda em pesquisa básica e clínica.....	96
5. Limitações e perspectivas futuras.....	100
5.1 Experimentos com Cafeína.....	100
5.2 Experimentos com fluoxetina.....	101
6. Conclusões Finais.....	102
7. Referências.....	103
8. Anexos.....	169

1. Introdução

A pesquisa em modelos animais é sem dúvida uma das principais ferramentas da ciência básica. No entanto é importante reconhecer que mesmo com o avanço na exploração e manipulação do sistema nervoso central assim como o desenvolvimento de novos fármacos, a implementação terapêutica destas descobertas enfrenta uma crise translacional (Howe et al., 2018; Hariri e Holmes, 2015). Na neuropsiquiatria, o problema parece ser mais evidente, pois de fato somente 9% dos fármacos que passam por ensaios clínicos estarão disponíveis comercialmente (Hay et al., 2014). Dito problema de aplicabilidade pode ser interpretado de duas formas: a primeira, mais otimista, usa como explicação um sistema de pesquisas organizado, com responsabilidade científica e de saúde pública, que limita o acesso a novos tratamentos até atingir graus de qualidade e segurança elevados. A segunda, e infelizmente mais sobressaliente, mostra que a crise de translação pode estar arraigada na produção do próprio conhecimento, isto é, incapacidades na reprodução dos dados, análises estatísticas não apropriadas e modelos com validade limitada (Howe et al., 2018).

O panorama acima mencionado vai em paralelo com o conhecimento ainda escasso dos mecanismos pelos quais alguns fármacos disponíveis comercialmente exercem seu efeito terapêutico. Um exemplo clássico surge dos fármacos antidepressivos e em particular da fluoxetina. Um potente efeito antidepressivo com baixos efeitos colaterais, alta seletividade e uma quantidade significativa de ensaios clínicos levaram a fluoxetina a ser testada e aprovada pela FDA só um ano depois do seu uso inicial na Bélgica em 1986 (Perez-Caballero et al., 2014). O mecanismo de ação da fluoxetina confirmava parcialmente a teoria monoaminérgica da depressão que a partir de 1965 dominou nosso universo científico. Os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (5-HT) ofereceriam uma alternativa aos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoaminooxidase (MAO) conhecidos pelos seus efeitos colaterais significativos e baixa adesão (Schildkraut, 1965).

O panorama hoje tem mudado bastante e poucos continuam defendendo a teoria monoaminérgica como principal mecanismo da depressão (Wong e Licinio, 2001; Berton e Nestler, 2006). Mais do que um fenômeno de maior ou menor concentração de

neurotransmissores, a fisiopatologia da depressão (e os efeitos terapêuticos dos antidepressivos) parece residir na plasticidade macro e microestrutural de circuitos encefálicos específicos (Castrén, 2013). Um experimento que mostrou esse novo cenário foi realizado por Maya Vetencourt et al (2008), onde a inibição de estimulação sensorial visual diminuiu drasticamente a responsividade de grupos neuronais no córtex visual. No entanto um tratamento crônico com fluoxetina facilitou a atividade neuronal a estímulos percebidos pelo olho aberto. Adicionalmente, o mesmo tratamento promoveu a recuperação funcional quando a estimulação do olho fechado foi permitida. É importante mencionar que essa dinâmica na plasticidade sensorial do córtex visual tem sido identificada só em períodos pós-natais, abrindo a possibilidade que o tratamento crônico com fluoxetina recupere uma janela de plasticidade perdida naturalmente durante a idade adulta.

Além de fármacos utilizados há décadas para diferentes transtornos psiquiátricos, outros compostos mostraram-se eficazes e parecem ser muito promissores para melhorá-los. Dois exemplos particulares são: as substâncias psicodélicas, em particular aquelas que possuem como princípio ativo a dimetiltryptamina (Belouin e Henningfield, 2018) e as metilxantinas, encontradas no chá verde e no café, que têm se mostrado efetivas na diminuição de ansiedade e depressão em modelos animais (para uma revisão ver Nabavi et al., 2017), assim como no aprimoramento cognitivo em condições normais e patológicas (Dragicevic et al., 2012; Klaassen et al., 2013). A dimetiltryptamina ainda está abrindo caminho entre a burocracia dos sistemas de saúde, ações legais e uma resistência científica que só começou a ser superada em meados de 1990 (mesmo com uma evidência sólida do possível efeito terapêutico dos psicodélicos, que tem sido coletada entre 1950 e 1970) (Abraham et al., 1996; Bogenschutz e Ross, 2018). Já as metilxantinas transcorrem historicamente entre evidências muito heterogêneas, o que tem levantado dúvidas acerca de sua utilidade na prática clínica (Schuster e Mitchell, 2019). A evidência da cafeína no aprimoramento do rendimento físico parece mais estável que seus efeitos na cognição (Nehlig, 2010), no entanto, Borota e colaboradores (2014) mostraram que uma única dose de cafeína (200mg) após um período de estudo facilita a consolidação de novas informações e promove melhor retenção 24h depois da aquisição. Importante, este efeito se mostrou dose-dependente seguindo uma curva em “U” e não parece influenciar a evocação da memória *per se* (efeito da administração pré-teste).

Em modelos animais a administração aguda de cafeína parece prejudicar a aquisição, consolidação e evocação de memórias emocionais, como aquelas formadas durante o condicionamento clássico Pavloviano (Dubroqua et al., 2015; Corodimas et al., 2000). Tomando em consideração o valor histórico do condicionamento na modelagem de comportamentos do tipo ansioso (Tovote et al., 2015; Mahan e Ressler, 2012; Ross et al., 2017; Gross e Canteras, 2012; LeDoux e Pine, 2016) e os mecanismos celulares e moleculares que têm sido desvendados usando dito modelo para descrever processos mnemônicos. Tão logo, é plausível nos questionarmos se compostos como a cafeína, (amplamente usados e de fácil acesso), poderiam ser utilizados como coadjuvantes no tratamentos de distintos tipos de psicopatologias. Além disso, seus possíveis efeitos na ansiedade e no sistema de reforço poderiam ser a chave para esse efeito.

Nesta tese, exploramos um composto clássico no tratamento de transtornos de ansiedade e depressão, a fluoxetina, e um composto natural de consumo regular na população mundial, a cafeína, como ferramentas farmacológicas para a atenuação de memórias aversivas em roedores. Comportamentalmente, foram analisados alguns fenômenos como a generalização da memória, a extinção e a reconsolidação de informações aversivas. Esses conceitos serão esclarecidos nas seguintes seções assim como a lógica que sustenta os experimentos aqui propostos. Adicionalmente discutiremos algumas técnicas recentes que, aliadas a tratamentos farmacológicos e comportamentais, poderiam impulsionar a pesquisa em uma nova área denominada de “psiquiatria de precisão” (Gandal et al., 2016). Esse conceito tenta usar a tecnologia e novas ferramentas de análise de dados para aportar um marco padronizado de tratamentos em saúde mental, que vai além da atual tentativa e erro da psicofarmacologia e psicoterapia usual.

A ciência é uma estrutura autossustentada que depende da verificação e adaptação constante de hipóteses (Bunge, 1960). Mesmo com a dificuldade translacional atual, a reestruturação do conhecimento básico e seus métodos deve transcorrer ao mesmo tempo que aumenta a sua produção, visando que desse fluxo crescente de informações apenas uma pequena parte consiga ser transformada em tratamentos mais eficazes. O esclarecimento sobre os problemas atuais da pesquisa básica em animais pode ser um ponto de partida mais realista para a interpretação dos resultados que aqui serão apresentados e ao mesmo tempo uma motivação para o desenvolvimento de melhores metodologias científicas visando a qualidade na construção de conhecimento.

1.1 Transtorno de Estresse Pós-traumático (TEPT): sistemas de classificação e orientação transdiagnóstica

A última edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V, sigla em inglês) publicada em 2013, traz mudanças significativas a respeito da classificação e conceitualização dos transtornos mentais, e o caso dos transtornos de ansiedade é um dos mais evidentes. O TEPT foi removido da categoria de transtornos de ansiedade e realocado em uma categoria independente como “Transtornos Relacionados ao Estresse e Trauma” (American Psychiatric Association, 2013). A classificação no DSM depende de anos de planejamento (no caso do DSM-V, 12 anos aproximadamente) que depende da compilação de evidências científicas e clínicas, além de uma revisão rigorosa dos critérios diagnósticos a partir de debates entre especialistas e nosologistas. Após essas etapas, é necessária a aprovação da Associação Americana de Psiquiatria para a publicação da nova classificação a ser utilizada como referência na prática psicológica e psiquiátrica. A aceitação generalizada do DSM-5 como manual dos transtornos mentais é questionada por vários grupos e iniciativas que discutem tópicos como a validade da classificação (Kupfer et al., 2013a; Kupfer et al., 2013b; Kupfer e Regier, 2010; 2011). Um exemplo é o projeto “Critérios de Domínio de Pesquisa” (tradução livre de *Research Domain Criteria* - RDoC) onde é proposta uma conceitualização dos transtornos mentais totalmente focada em resultados de pesquisa, que vão desde a genômica até a análise comportamental e o auto-relato (Paris e Kirmayer, 2016; Casey et al., 2013; Cuthbert e Insel, 2013). É importante salientar que o RDoc não pretende ser um sistema em paralelo ao DSM ou da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-11, sigla em inglês) mas sim um promotor e integrador do conhecimento científico no campo neuropsiquiátrico. O surgimento de um projeto como o RDoC, que promove um maior conhecimento sobre a base biológica dos transtornos mentais, só tem a dizer das fragilidades ou dificuldades na validação das categorias diagnósticas segundo o DSM. Poderia ser essa carência responsabilidade daqueles responsáveis de construir a base científica do DSM? A resposta não parece ser definitiva. Sem dúvida o avanço tecnológico atual promete revolucionar a pesquisa em psiquiatria. Atualmente o surgimento de técnicas de inteligência artificial, como o aprendizado automático ou de máquina e seu subtipo, o aprendizado profundo, têm

permitido o estudo de grandes bases de dados e relações entre variáveis que podem ser imperceptíveis para a análise humana (Hassabis et al., 2017; Bzdok e Meyer-Lindenberg, 2018; Vu et al., 2018). Essas análises quando aplicadas a técnicas de registro intracortical ou de imageamento encefálico permitem a decodificação de sinais neurais que representam movimentos, pensamentos e emoções (para um exemplo recente, ver Sani et al., 2018). No entanto esses importantes passos ao futuro da “psiquiatria de precisão” (termo que hoje pode ser encontrado na literatura para descrever métodos que permitam o diagnóstico objetivo/biológico de doenças mentais), estão na sua infância científica (algumas preocupações sobre essa metodologia são discutidas em Gómez-Carrillo, 2018 comentário ao artigo de Stein et al., 2018). Da mesma forma, o aporte de biomarcadores provenientes de disciplinas como a genética e a eletrofisiologia, emergentes nas últimas duas décadas, têm tido pouco impacto na conceitualização dos transtornos psiquiátricos, principalmente pela pouca confiabilidade e replicabilidade destes resultados. Isto posto, na prática clínica, o seguimento, a interpretação e o estudo da psicopatologia continuam sendo alimentados do auto-relato como principal ferramenta.

A recente versão do DSM parece ainda não ser bem assimilada pela comunidade científica. Na neurociência básica e aplicada, a ideia do TEPT e do Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) como parte do espectro da “ansiedade patológica” tem sido importante historicamente. Agora, porém, o TOC está classificado na sessão “Transtornos Associados a Obsessão e Compulsão (Marras et al., 2016). Apesar disso, uma revisão recente publicada na revista Nature Reviews sobre transtornos de ansiedade ainda coloca o TEPT e o TOC na mesma categoria de outras doenças como a ansiedade generalizada e o transtorno de pânico (ver Figura 1). A justificativa se sustenta nas similaridades neurobiológicas compartilhadas pelas respostas que envolvem reações de ansiedade antecipatória ou medo independente do diagnóstico do paciente (Craske et al., 2017).

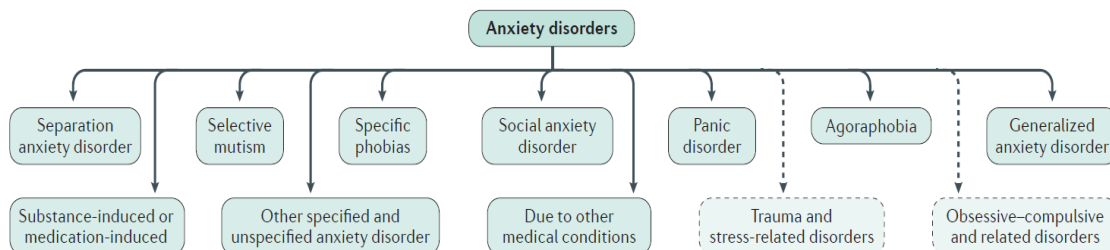


Figura 1: Classificação dos Transtornos de Ansiedade. A categoria dos transtornos de ansiedade tem sido utilizada para classificar diferentes patologias como a ansiedade por separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social, transtorno de pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada e o transtorno de estresse pós-traumático. A classificação geral de transtornos de ansiedade tem se mantido na literatura científica, principalmente, pelas semelhanças que existem entre os diferentes espectros de respostas de ansiedade patológica. No entanto, com o novo sistema de classificação do DSM-V, os Transtornos Associados a Obsessão e Compulsão e os Transtornos Relacionados ao Estresse e Trauma foram alocados em categorias separadas, com algumas modificações nos critérios diagnósticos que podem diferenciá-los de outros transtornos de ansiedade. Figura retirada de Craske e colaboradores (2017).

No que se refere ao TEPT (o transtorno que mais será mencionado ao longo dessa tese), o DSM-V, além de isolá-lo em uma categoria própria, eliminou o componente subjetivo na definição de trauma. Isso significa que um evento traumático é somente aquilo que ameaça de forma direta e comprovada a vida do indivíduo. No entanto, a percepção de um evento como traumático, por exemplo a perda de emprego, não é mais considerada trauma, mesmo quando o paciente relata seu problema nesses termos (Pai et al., 2017). Estima-se que essa mudança irá transformar radicalmente a incidência de TEPT, considerando que a versão DSM-IV-TR incluía na categoria de trauma situações como o trauma vicário, onde a reação aversiva poderia ser adquirida por observar a exposição de outro indivíduo a evento aversivo (American Psychiatric Association, 2000). Adicionalmente, na lista de critérios diagnósticos (ver Tabela 1) foram incluídos 3 sintomas adicionais, a saber: 1) estado emocional negativo persistente; 2) cognição distorcida sobre a causa ou consequências do trauma que leva à culpa de si ou dos outros; e 3) comportamentos imprudentes ou autodestrutivos. Interessantemente, o último item - comportamentos autodestrutivos - foi incluído mesmo na existência de evidência sobre sua pouca prevalência no TEPT (Gradus et al., 2014). Finalmente, algumas especificações como sintomas recorrentes de despersonalização e desrealização foram incluídas, além de remoção da categoria de “trauma agudo” para ser substituída por “expressão tardia”, onde os critérios diagnósticos fecham de forma definitiva até 6 meses após o evento (American Psychiatric Association, 2013).

Criterion	number of required symptoms	main characteristic	differences between DSM-4 and 5
A	required	exposure to traumatic event	broadened with indirect: traumatic event to a close acquaintance; repeated or extreme exposure to aversive details of the traumatic event
B	1	intrusive recollection: intrusive thoughts, nightmares, flashbacks, emotional distress after traumatic reminders	new name: re-experiencing the traumatic event
C	1	avoidant/numbing of all trauma related stimuli (thoughts, feelings, conversations, people, places, or activities)	new name: avoidance
D	2	NO	<i>negative alteration in mood and cognition</i> : inability to precisely recall the traumatic event, dissociative amnesia, persistent negative emotional state, anhedonia, reduced interest in activities
E	2	hyper-arousal: irritability, aggression, risky or destructive behavior, hypervigilance, exaggerated startle reaction, difficulties in concentrating and sleep disturbances	new name: arousal
F	required	last for more than 1 month	remained
G	required	seriously affecting social and occupational functioning and inducing distress	remained
H	required	not caused by the medication, substance use, or other illness	remained

Tabela 1: Critérios diagnósticos no DSM-5 e mudanças a respeito do DSM-IV-TR.

O chamado Transtorno de Estresse-Pós-traumático deve ser agora tratado como Transtornos Relacionados ao Estresse e Trauma, considerando o novo sistema do DSM-V. Entre as principais mudanças com relação ao DSM-IV-TR podemos observar que o evento traumático deve ser experimentado diretamente pelo indivíduo, tirando a possibilidade de aquisição do trauma através da aprendizagem vicária. O DSM-5 também reconhece os componentes de hipermnésia e amnésia decorrentes da exposição ao trauma, assim como reúne no termo “re-experimentação traumática” todas aquelas manifestações de evocação do evento por meio de, por exemplo, pensamentos intrusivos, insônia e flashbacks/pesadelos. Tabela retirada de Török e colaboradores 2019.

Provavelmente a reestruturação significativa das mudanças do DSM-5 na prática clínica são menos evidentes na pesquisa básica. De fato, seja em modelos animais ou não, o correlato neurobiológico comportamental parece, até certo ponto, independente do

diagnóstico (Fenster et al., 2018). Sem dúvida uma das áreas que poderia ser mais afetada são os estudos epidemiológicos e pesquisas clínicas que restringem a participação a um grupo diagnóstico específico. O novo sistema de classificação poderia implicar a remoção ou diminuição de pacientes até agora considerados aptos para estudo (Uher et al., 2014). Neste ponto o RDoC possui ainda mais valor, permitindo um marco de referência transdiagnóstica para o estudo das doenças mentais. O termo “transdiagnóstico” em tratamento e pesquisa, que tenta ir além da categoria, já tem uma história considerável na psicologia clínica (Sloan et al., 2017) e é o motor que guia as novas tecnologias no estudo da neuropsiquiatria (Widge et al., 2017). A chamada “crise translacional” mencionada acima se soma aos problemas evidentes aqui mencionados (Levin Gal Richter et al., 2018; Deslauriers et al., 2018).

Nas seções seguintes serão analisados os componentes mnemônicos do TEPT e os modelos animais que têm permitido estudar comportamentos de medo e ansiedade que se aproximam às reações presentes neste transtorno. Alguns destes modelos serão explicados desde a sua validade aparente (também denominada “validade de face”), de construto e preditiva. Especial ênfase será dada ao condicionamento aversivo ao contexto (CAC), tarefa usada ao longo do desenvolvimento desta tese e que se fundamenta em uma simples, porém, robusta e evolutivamente conservada resposta aversiva aprendida (Schafe et al., 2001; Fenster et al., 2018; Izquierdo et al., 2016; Maren e Quirk, 2004; Gross e Canteras, 2012).

1.2 Poderia o transtorno de estresse pós-traumático ser classificado como um transtorno da memória?

Poderia a memória ser o alvo terapêutico do TEPT? Poderia a eliminação seletiva de uma memória traumática ser suficiente para melhorar a sintomatologia completa do transtorno? No caso afirmativo destas perguntas anteriores, poderia o TEPT ser resumido a um déficit de memória? Uma característica fundamental do transtorno são as alterações qualitativas em termos de hipermnésia para eventos emocionais, fato que contrasta com a aparente amnésia de informação episódica do evento (por exemplo, as informações contexto-dependentes) (Desmedt et al., 2015; Kaouane et al., 2012). Isso significa que um evento percebido como traumático é processado comportamental e

neurobiologicamente diferente que eventos aversivos cotidianos (Brewin et al., 1996; 2003). A eliminação seletiva de traços de memória é uma realidade conceitual e técnica em modelos animais. Por exemplo, Han e colaboradores (2009) mostraram que o condicionamento aversivo pavloviano aumenta significativamente o número de células CREB+ na amígdala lateral (AL). A remoção seletiva dessas células, por meio de uma técnica farmacogenética que usa a toxina da difteria para induzir a morte celular, levou a uma diminuição significativa do medo condicionado. Esse resultado foi ausente quando a eliminação celular aconteceu em grupos aleatórios de neurônios. Em outro estudo, Nabavi et al., (2014) induziram um condicionamento aversivo por meio da associação da estimulação optogenética de células do córtex auditivo que inervam a amígdala lateral com um choque nas patas do animal. Posteriormente, a indução de depressão de longa duração (LTD, do termo em inglês “long term depression”) no córtex auditivo foi suficiente para inibir a expressão da memória enquanto o oposto, a indução de potenciação de longa duração (LTP, do termo em inglês “long term potentiation”) reestabelecendo a evocação da memória de medo. Neste caso, mesmo que a indução de LTD não gere uma perda persistente da memória, pode-se observar que é possível controlar seletivamente o acesso a informações aversivas. Além da atenuação da resposta de medo através da manipulação direta do traço da memória de medo, outra maneira de inibir a expressão da mesma é através da criação de uma memória de extinção (Izquierdo et al., 2016). Um potencial substrato celular da memória de extinção é o fortalecimento de interneurônios GABAérgicos expressando parvalbumina (PV) na amígdala basolateral (BLA, do inglês). Isso significa que aumenta as sinapses perissomáticas positivas para PV que estão localizadas ao redor de neurônios associados com a memória de medo, contribuindo para a supressão seletiva dos neurônios do engrama responsável pela memória aversiva, diminuindo assim, a expressão da mesma, induzindo oscilações nas frequências de 6-12Hz, que se correlacionam com o controle da expressão de medo (Davis et al., 2017). Além disso, dita frequência permanece em competição com frequências de 3-6Hz, que aumentando seu poder espectral acima das frequências de 6-12Hz levam à recuperação da resposta de medo (Myers e Davis, 2002; Singewald e Holmes, 2018; Luchkina e Bolshakov, 2018; Davis et al., 2017). A extinção apresenta limitações, como o retorno da memória de medo com o simples passar do tempo (Herry et al., 2010; Goode e Maren, 2018) ou a apresentação de algum dos estímulos presentes no momento do aprendizado (Myers e Davis, 2007; Tovote et al., 2015; Bouton, 2002). Clem e Huganir (2010) mostraram que após o condicionamento aversivo ao som, existe

um aumento na membrana dos níveis de fosforilação da subunidade 1 dos receptores AMPA 48h após o treino. Dito aumento desaparece passados 7 dias. Durante essa janela que apresenta um aumento na expressão de subunidades AMPA, a extinção se mostra facilitada assim como a possibilidade de indução de LTD nas aferências entre tálamo e amígdala, levando assim a uma diminuição permanente da resposta aversiva.

Recentemente, Yang e colaboradores (2016), transplantando células GABAérgicas embrionárias na amígdala lateral e basal conseguiram que a extinção eliminasse a recuperação aversiva quando aplicada 2 semanas após o transplante. Adicionalmente, os autores mostraram que essa estratégia reduz as redes perineurais, facilitando a potenciação e inibição de microcircuitos locais. Esses resultados sugerem que a modificação do tônus inibitório da amígdala pode ser efetivo para induzir a remoção de memórias aversivas por meio de intervenções comportamentais.

Resultados como os aqui descritos parecem promissores sobre a seletividade atingida para modificar populações de neurônios associados com respostas de medo. No entanto, quanto desse conhecimento básico poderia ou está sendo aplicado a humanos? Sem dúvida, estratégias invasivas são uma solução em condições refratárias (uma revisão recente sobre estimulação elétrica profunda pode ser encontrada em Lavano e colaboradores (2018)), porém, os tratamentos padrão para o TEPT são farmacológicos e comportamentais (por exemplo, terapia cognitivo-comportamental (Zinbarg et al., 1992; Mataix-Cols et al., 2017)). Nos últimos anos, uma possibilidade para a eliminação permanente de respostas aversivas tem surgido por meio do conceito de “reconsolidação”.

Para abordar a reconsolidação primeiro é necessário elucidar o que é “consolidação”. O conceito e a teoria da consolidação provêm dos primeiros experimentos de Müller e Pilzecker em 1900. Esses pesquisadores alemães descreveram uma janela temporal após o aprendizado de novas informações, suscetível a modificações, onde uma nova informação apresentada em um curto período de tempo após o aprendizado inicial poderia interferir com a “consolidação” da referida informação. No entanto, quanto mais longe do aprendizado, o estímulo interferente perde a capacidade de alterar a memória. Esse descobrimento guiaria o futuro das pesquisas na área de neurobiologia da memória, suscitando estudos acerca dos mecanismos temporais envolvidos na aquisição e manutenção de novas informações, os quais perduram até hoje (McGaugh, 2000).

O período de suscetibilidade das informações após o aprendizado seria verificada subsequentemente pelo psicólogo Donald Lewis e seu grupo de trabalho em 1968. Dessa vez, o estímulo interferente não foi aplicado depois do treino, mas sim imediatamente após a evocação. Se a janela para modificar a memória transcorre só depois do aprendizado, seria esperado que manipulações subsequentes não tivessem efeito algum. Usando o condicionamento aversivo em ratos, Lewis observou que um choque eletroconvulsivo após a evocação da memória (processo que depois seria melhor conhecido como “reativação”) degradava a memória original (Misanin. et al., 1968). O resultado implicava que a memória era mais dinâmica do inicialmente previsto. De fato, a possibilidade de modificação se estendia a mais que algumas horas depois do aprendizado. Anos mais tarde, novos experimentos permitiriam propor a hipótese da “Memória Ativa” e “Memória Inativa”, onde a evocação da memória poderia torná-la suscetível de ser modificada permanentemente (Lewis, 1979). O termo “reconsolidação” seria implementado para explicar esse estado instável da memória após a sua reativação precisando novamente de mecanismos de estabilização/reestabilização que permitissem a sua persistência (Nader et al., 2000a;b; Nader e Hardt, 2009). O termo reconsolidação tem sido matéria de controvérsia na comunidade científica (ver por exemplo Gisquet-Verrier et al., 2015; Gisquet-Verrier e Riccion, 2019), principalmente porque o “re” poderia implicar que a reconsolidação é um espelho da consolidação, porém, evidências recentes têm mostrado que ambos os processos possuem mecanismos moleculares diferentes assim como comportamentais (janelas de interferência diferente (Merlo et al., 2015).

O impacto científico da reconsolidação ressurgiu no ano 2000, com a publicação de Nader e colaboradores (2000 a; b), mostrando que a inibição da síntese de proteínas na amígdala de ratos após a reativação da memória poderia suprimir permanentemente informações aversivas. No entanto, esse seria só o começo de uma quantidade crescente de estudos básicos, aplicados e clínicos sobre a efetividade de intervenções baseadas na reconsolidação da memória para tratar sintomas do TEPT. Essa perspectiva posicionou o TEPT e, em geral, as psicopatologias onde memórias maladaptativas são um dos principais sintomas, como potenciais transtornos mnemônicos onde a manipulação do traço de memória poderia ser efetiva para controlar o quadro clínico completo (ver Kroes et al., 2016). Resultados coletados ao longo do tempo têm mostrado que o panorama é

bem mais complexo, e a eficácia clínica da reconsolidação é tema de um intenso e promissor debate.

1.3 Interferindo em traços mnemônicos: reconsolidação como alvo na expressão de memórias aversivas

De forma geral os procedimentos comportamentais de reconsolidação seguem um padrão: os animais são expostos a uma tarefa de aprendizado, seja ela, por exemplo, apetitiva (Reichelt e Lee, 2013) ou aversiva (Nader, 2000). Os animais são reexpostos a dicas contextuais (Crestani et al., 2015), discretas (Soeter e Kindt, 2015) ou mesmo aos estímulos incondicionados apresentados no momento do aprendizado (Huang et al., 2017) durante curtos períodos de tempo (no entanto a intensidade do treino pode mudar essa variável temporal, de acordo com Pedraza et al., 2016; Casagrande et al., 2018; Poulos et al., 2016), onde a memória do evento é desestabilizada. O processo de desestabilização é entendido como uma série de eventos moleculares e celulares em neurônios que participaram inicialmente do aprendizado (Nader e Hardt, 2009). Para uma revisão acerca dos mecanismos de desestabilização da memória, ver (Haubrich e Nader, 2018; Sachser et al., 2017). Sobre o fenômeno da desestabilização da memória, estão implicados dentre outros eventos moleculares e celulares, a degradação proteica dependente de ubiquitina/proteossoma (Lee et al., 2012), a mobilização de receptores AMPA permeáveis ao cálcio (CP-AMPA, em inglês) (Hong et al., 2013), a endocitose de AMPA (Rao-Ruiz et al., 2011; Hong et al., 2013), e a ativação de receptores NMDA contendo a subunidade GluN2B (Ben Mamou 2006; Milton et al., 2013; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015). Portanto, estes e outros mecanismos neurais são essenciais para a desestabilização do traço de memória. Uma vez desestabilizada, a memória pode ser modificada através da reconsolidação (Haubrich et al., 2015). Muitos estudos tem lançado mão de fármacos que inibem a reconsolidação da memória como estratégia para atenuar memórias patológicas (como os traumas característicos do TEPT aqui discutidos). Entretanto, a grande maior parte desses estudos utiliza substâncias tóxicas que não podem ser utilizados em humanos. Portanto, um grande desafio para a implementação de técnicas baseadas na inibição da reconsolidação é encontrar compostos que sejam efetivos com o mínimo de efeitos adversos. Nessa tese, testamos a eficácia de compostos já amplamente usados em humanos com o objetivo de enfraquecer memórias traumáticas. Por conta

disso, na revisão de compostos utilizados para esse fim descrito abaixo, priorizamos trabalhos com as mesmas características.

Um exemplo de grande sucesso da pesquisa translacional do TEPT e de outros transtornos da ansiedade como fobias específicas é o caso da possibilidade de atenuação de memórias aversivas por meio da reconsolidação através do uso, durante a reativação da memória, do β -bloqueador propranolol (de amplo uso na prática clínica). O propranolol é um bloqueador β -adrenérgico, que tem se mostrado efetivo na atenuação de memórias aversivas em roedores (Debiec e Ledoux, 2004). Uma hipótese bem aceita é que o propranolol poderia exercer seus efeitos por meio de um mecanismo secundário de inibição de síntese de proteínas envolvidas na fosforilação de CREB em regiões importantes para o processamento emocional como a amígdala (Kindt, 2014; Thonberg et al., 2002). Os primeiros estudos em humanos mostraram que o propranolol reduz a resposta aversiva (avaliada por meio de sobressalto e condutância da pele) quando administrado 1-2h antes da reativação da memória (Kindt et al., 2009). De forma interessante, o conteúdo episódico do evento, isto é, a capacidade de evocação consciente dos eventos envolvidos na experiência, não são afetados, deixando claro que os efeitos do propranolol são seletivos aos sintomas físicos associados às respostas condicionadas características do TEPT; no entanto, Soeter e Kindt (2015), além de demonstrar este efeito supradescrito, também demonstram que há um declínio/esquecimento da memória “consciente” (episódica) 1 ano após a administração de propranolol em pacientes aracnofóbicos. Esses resultados têm levado a sugerir que o propranolol pode modificar seletivamente o conteúdo (ou a valência emocional) do traço da memória (Soeter e Kindt, 2012). Ao mesmo tempo, isto evidencia que a memória pode ser divisível em componentes (episódicos vs emocionais) a serem manipulados seletivamente, proposta que já tem sido discutida na literatura (Kamboj e Curran, 2006). Os estudos com propranolol têm sido replicados consideravelmente (ver Brunet et al., 2008; 2018; Schwabe et al., 2012; 2013; Sevenster et al., 2013; Soeter e Kindt, 2015); aqui é importante enfatizar que existem trabalhos que falharam na replicação destes dados em roedores (Muravieva e Alberini, 2010) e humanos (Tollenaar et al., 2009a; 2009b).

Estudos com neuroimagem permitiram mostrar que o efeito do propranolol pode estar associado com a diminuição da atividade do tálamo e da amígdala concomitante com um aumento da atividade do córtex cingulado anterior direito durante a exposição a estímulos

aversivos (Mahabir et al., 2015). O estudo anterior foi realizado com pacientes diagnosticados com TEPT e os resultados com escalas padronizadas para avaliação do trauma também demonstrou uma melhora significativa na sintomatologia geral.

Os efeitos do propranolol também geram discussões éticas e legais sobre a possibilidade de “apagar” memórias e seus efeitos potenciais na sociedade (ver Henry et al., 2007). Recentemente, considerando a manipulação seletiva do conteúdo emocional pelo propranolol (Soeter e Kindt, 2012), novos desenhos experimentais têm oferecido explicações alternativas. Por exemplo, Cogan e colaboradores (2018) mostraram que o propranolol pode reduzir os aspectos emocionais / motivacionais das memórias, sem realmente apagá-las. No estudo, roedores foram expostos a uma tarefa operante onde a pressão de uma alavanca gerava a liberação de um reforço de alta ou baixa magnitude. A administração de propranolol após uma sessão de reativação prejudicou a evocação nos animais treinados com reforços de alta magnitude, possivelmente devido os efeitos adrenérgicos envolvidos em estímulos fracos *vs* fortes (emocionalmente marcantes). Os autores sugerem que o propranolol atenua a valência emocional dos estímulos incondicionados, no entanto, não elimina a associação entre estímulos condicionados e incondicionados. Outros autores sugerem que dito efeito na valência emocional pode ser usado como ferramenta adicional durante protocolos de extinção (Giustino e Maren, 2018). Essa proposta surge de estudos mostrando que a efetividade do propranolol pode estar associada com os níveis elevados de noradrenalina (NA) que seguem a aquisição de respostas aversivas (Geraciotti et al., 2001; Southwick et al., 1997). O aumento de NA tem sido associado com a indução de hipofrontalidade em regiões como o córtex pré-linguístico e infralímbico, que regulam a expressão do medo através de conexões recíprocas com a amígdala (Milad e Quirk, 2012; Sotres-Bayon e Quirk, 2010). A exposição ao condicionamento aversivo de fato prejudica a resposta de neurônios individuais do córtex pré-frontal medial que podem ser restauradas com a administração de propranolol e facilitar a subsequente extinção (Fitzgerald et al., 2015). No entanto, o propranolol se mostrou menos efetivo em roedores e humanos quando existem longos períodos de tempo entre a aquisição da resposta aversiva e a intervenção visando normalizar o medo (Chang et al., 2010; Kim et al., 2010; Maren, 2014), períodos onde os níveis de NA tendem a diminuir (Giustino e Maren, 2018).

Outro exemplo promissor de ferramentas farmacológicas na inibição da reconsolidação são os inibidores de metaloproteinases (do inglês, MMP). As MMPs são componentes

importantes da matriz extracelular, que, por meio de redes perineurais, controlam a eficácia e a estrutura sináptica (Stawarski et al., 2014). A LTP se mostra dependente das MMPs, em particular, a MMP-9, que é crítica para a consolidação de memórias apetitivas e aversivas (Nagy et al., 2007; Knapska et al., 2013). Recentemente, Bach e colaboradores (2018) mostraram que a doxiciclina, antibiótico de uso humano e inibidor das MMPs, quando administrada após a aquisição de um condicionamento aversivo, diminui cerca de 60% da resposta de medo (ex: freezing/congelamento). Levando em consideração o mecanismo de ação das MMPs e seus efeitos sobre a consolidação, parece um composto promissor para modificar a memória após a reativação, embora ainda não tenha sido testado na reconsolidação da memória. Proteínas que estabilizam a matriz extracelular, assim como a ancoragem de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na membrana pós-sináptica, têm se mostrado importantes no processos de desestabilização e reconsolidação da memória (Brown et al., 2009; Popik et al., 2018; Lunardi et al., 2018).

O panorama acima revisado mostra que, de fato, o componente mnemônico do TEPT é um alvo terapêutico importante. No entanto, ainda é difícil determinar se o controle seletivo da memória neste transtorno poderia ser suficiente para diminuir outros sintomas decorrentes do trauma, como as alterações no sono (Miller et al., 2017) e outras comorbidades com outros transtornos que geralmente dificultam o tratamento, pois sabemos que o TEPT tipicamente evolui com distímia/depressão ou outras alterações psicopatológicas que afetam a vida do indivíduo (Flanagan et al., 2016). A reconsolidação é um processo que permite o enfraquecimento de memórias não desejadas aproveitando-se da labilidade induzida pela reativação.. Entretanto, alguns pontos devem ser esclarecidos sob esta perspectiva: qual é o efeito a longo prazo de manter o componente episódico da memória aversiva mesmo quando o conteúdo emocional for modificado? Poderia o conteúdo episódico disparar respostas como a recuperação espontânea ou a renovação da resposta aversiva? O propranolol é mais efetivo, a longo prazo, aliado a protocolos de extinção do que reconsolidação? Qual é o efeito da reconsolidação em sintomas adicionais do TEPT como as alterações no padrão de sono? Sem dúvida as respostas a essas perguntas, através de mais ensaios em populações clínicas, permitiram um melhor veredito sobre a utilidade prática da reconsolidação nos tratamentos de transtornos associados ao medo.

1.4 Atualizar ou extinguir? Duas aproximações comportamentais no controle da expressão de memórias aversivas

Diferenças comportamentais (Lee et al., 2006;), moleculares (Monfils et al., 2009) e farmacológicas (Cassini et al., 2017; Suzuki et al., 2004) entre a reconsolidação e a extinção têm sido áreas de constante pesquisa (para uma revisão ver (Kida, 2018; Monfils e Holmes, 2018)). No entanto, quando a pergunta é a efetividade como ferramenta terapêutica, temos por um lado aqueles que defendem que a reconsolidação de fato pode ser mais efetiva no controle de respostas emocionais associadas com medo e ansiedade em relação à extinção (Elseby et al., 2017b; 2018), enquanto outros acreditam que a evidência é ainda muito escassa em humanos (Treanor et al., 2017). Essa dicotomia, mesmo com o grande número de pesquisas sobre reconsolidação, inclina a balança para outras estratégias comportamentais bem estabelecidas, em modelos animais e humanos, como é o caso da extinção e do contracondicionamento. Classicamente, a extinção tem sido associada com o controle inibitório de estruturas prefrontais em áreas como a amígdala basolateral e o hipocampo (Hoobin et al., 2003; Myers e Davis, 2007; Quirk e Mueller, 2008). Esse controle se mostra associado com a ativação de circuitos GABAérgicos locais que podem diminuir a atividade de tais estruturas, correlacionado com a baixa expressão de medo (Harris e Westbrook, 1998). Essa hipótese tem sido desafiada recentemente por estudos que mostram que os neurônios que participam do engrama necessário para a formação da memória permanecem ativos também durante a extinção (Khalaf et al., 2018). De fato, a diminuição da atividade de neurônios implicados no aprendizado, durante a extinção, prejudica a redução do medo (Khalaf et al., 2018). De forma geral, esse resultado sugere que inibir circuitos que permitem a expressão do medo provavelmente seria uma desvantagem no controle emocional das mesmas, um conceito que tem sido importante em tratamentos cognitivo-comportamentais da ansiedade, onde uma melhora clínica depende da simulação controlada de estados como o pânico e o medo em sessões terapêuticas (Schweizer et al., 2018). Por outro lado, isso leva ao questionamento se a baixa eficácia dos ansiolíticos (como os benzodiazepínicos) poderia estar influenciada pela inibição constante de circuitos que de fato permitiriam a expressão da ansiedade (Guina et al., 2015).

Além disso, a extinção de memórias aversivas parece ser interpretada como um reforço *per se*. Felsenberg e colaboradores (2018) demonstraram em moscas-da-fruta (*Drosophila*)

que a extinção precisa de circuitos dopaminérgicos que são ativados em resposta à omissão do estímulo aversivo. O resultado resgata ideias de 1960, teorizando que a omissão de um castigo previamente associado com um estímulo não é neutro e sim um reforço, onde coexistem sistemas aversivos e apetitivos que tem ações antagonistas um sobre o outro (Miller e Konorski, 1969; Josselyn e Frankland, 2018). Esses achados se complementam com os resultados de Gerlicher e colaboradores (2018), mostrando que a consolidação da memória de extinção depende da reativação espontânea pós-extinção de circuitos dopaminérgicos no córtex pré-frontal ventromedial. Esses circuitos se identificaram como os mesmos que foram ativados perante a omissão não esperada do castigo na extinção. Em conjunto, os resultados sugerem que a ausência do evento aversivo pode ser um evento reforçador importante para a redução de medo. Fica para o futuro estabelecer como esses circuitos dopaminérgicos interagem com as células que participam do engrama na formação da memória com especial ênfase na dinâmica do citoesqueleto destes neurônios, que permanece largamente desconhecida.

Por outro lado, a interação de reforçadores ou estímulos antagônicos com estratégias comportamentais visando a atenuação de memórias aversivas não é algo novo. O psiquiatra Joseph Wolpe (1968) ficou mundialmente conhecido pelo seu trabalho demonstrando sobre aquilo que entendemos como dessensibilização sistemática (ou desestabilização sistêmica por inibição recíproca, fundamentada no pareamento de estímulos aversivos com estímulos não aversivos procurando melhorar processos de extinção) (Wolpe, 1968). Por outro lado, o contracondicionamento, que pode ser considerado uma extensão da técnica de Wolpe, estabelece que uma alternativa é mudar as associações entre estímulos, pareando o estímulo condicionado com um novo estímulo, que pode ser apetitivo ou uma nova resposta comportamental antagônica (Davinson, 1968). Ambas as estratégias têm como fundamento que estímulos de diferentes valências podem competir entre si onde existe um efeito de primazia, isto é, não é possível que ambas informações sejam expressadas ao mesmo tempo, conseguindo assim, que respostas mais adaptativas ganhem controle do comportamento ao longo de tempo (Delprato e Jackson, 1973). Esse processo de contracondicionamento exige muita atenção e compreendê-lo será de fundamental na interpretação de alguns dos resultados da presente tese.

O contracondicionamento pode interagir com a extinção (Raes e De Raedt 2012) e a reconsolidação (Goltseker et al., 2017). No primeiro caso se pretende melhorar o processo inibitório, enquanto no segundo o objetivo é atualizar o traço de memória com informação apetitiva. Mesmo que efetivas e amplamente estudadas em humanos, assim como usadas na prática psicoterapêutica, a recuperação espontânea, a renovação ou a reinstalação da resposta de medo são possíveis cenários futuros, após um aparente sucesso da terapia de extinção (Vervliet et al., 2013). É nesse ponto onde a reconsolidação tem se posicionado como uma opção para atenuar memórias aversivas permanentemente (Schiller et al., 2013). A discussão sobre a eficácia da reconsolidação tem sido discutida aqui previamente (ver item 1.3), mas é importante salientar onde e como a reconsolidação e a extinção poderiam ser estratégias complementares.

Estudos sugerem que a desestabilização da memória induzida pela reativação poderia abrir uma janela importante para realizar a extinção. Monfils e colaboradores (2009) mostraram que um protocolo de extinção após uma reativação curta da memória poderia inibir a subsequente renovação de respostas de medo. Os autores discutem que a reativação poderia induzir um estado no qual a informação inibitória proveniente da extinção pode reescrever o conteúdo do traço. Neste caso, o medo foi atenuado quando a extinção era aplicada 10 min após a reativação da memória, mas não 6 h depois (demonstrando claramente, mais uma vez, que há uma janela temporal induzida pela desestabilização que permite modificarmos memórias maladaptativas). Resultados similares usando o mesmo protocolo têm mostrado que dita atualização é também possível em humanos sob condições experimentais, e a atenuação de respostas aversivas foi permanente até 1 ano depois da intervenção (Schiller et al., 2010). Como esperado, embora esta perspectiva seja bem aceita na literatura neurocientífica, alguns grupos de pesquisa falharam em replicar esses resultados (Chan et al., 2010; Costanzi et al., 2011).

Muitos dos resultados opostos assim como a eficácia da reconsolidação tem sido explicado com as chamadas condições limitantes (do inglês, *boundary conditions*) da reconsolidação, para uma revisão, ver Haubrich e Nader (2018). Um exemplo pode ser encontrado no artigo de Auber e colaboradores (2013), onde os resultados negativos tentando replicar os experimentos de Monfils e colaboradores (2009) são abordados desde as condições experimentais que podem tornar a memória resistente à labilização induzida pela reativação. Variáveis como se a memória é recente ou remota (Frankland et al.,

2006), a intensidade do treino usado durante o aprendizado (Wang et al., 2009), o tipo de estímulo usado durante a reativação (condicionado vs incondicionado) (Huang et al., 2017), a idade do animal (Bustos et al., 2009) e se a memória é aversiva ou apetitiva (Fattore et al., 2017) parecem ser fundamentais para que a reconsolidação ocorra.

Nesse sentido é possível que a reconsolidação seja um fenômeno geral encontrado em um grande número de animais (Crystal and Glanzman, 2013). No entanto as condições que geram o fenômeno da reconsolidação são heterogêneas. Isso pode ser facilmente verificado na literatura onde é possível encontrar diferentes tempos de reativação para induzir a desestabilização desde só 30s de exposição ao estímulo até 15min. Esse balanço entre fatores é também importante em experimentos em humanos onde se deve acrescentar que existe pouca evidência tangível sobre a memória ser de fato desestabilizada e reconsolidada (Fernández et al., 2017). Algumas importantes questões neste meio ainda permanecem em aberto, requerendo esforços científicos adicionais.

Assim, podemos de fato concluir que o caráter promissor da reconsolidação é inegável, no entanto a sua praticidade ainda está longe de ser uma realidade clínica. Esse panorama permite à extinção manter seu status como ferramenta comportamental “padrão-ouro” na atenuação de memórias aversivas, mesmo com a possibilidade de recuperação da resposta de medo. Porém, é importante ressaltar que assim como existe um grande campo de pesquisa acerca da reconsolidação, o mesmo acontece com a extinção, sobre a qual diferentes metodologias farmacológicas e comportamentais visam seu melhoramento (Fitzgerald et al., 2014). Nesta tese, os dois fenômenos serão avaliados, assim como sua interação com compostos farmacológicos clássicos (fluoxetina) e naturais (cafeína) que podem ser usados na atenuação de respostas de medo.

1.5 Validade de modelos animais no estudo de transtornos associado ao trauma. O caso do condicionamento Pavloviano

A palavra “modelo” faz referência a uma recriação, geralmente incompleta ou limitada, de um fenômeno de estudo (Tyrrer e Steinberg, 1987). No caso da ciência, a redução de variáveis que interagem com um fenômeno é desejada com o intuito de controlar e estudar as relações causais entre eventos. Nesse sentido vale a pena se perguntar quão próximos

estão os modelos animais de situações reais de trauma e o limite da extrapolação desses resultados a humanos. Primeiro, é importante mencionar os padrões de validade dos modelos. No caso de modelos visando o estudo de transtornos psiquiátricos, três elementos são importantes: a validade de construto, a validade preditiva e a validade aparente (Stewart e Kalueff, 2015).

A validade de construto faz referência às bases causais e explicativas ou teóricas da psicopatologia. Dessa forma, um bom modelo deve ficar próximo dos fatores atualmente conhecidos que podem desencadear o desenvolvimento de psicopatologias (Siegmund e Wotjak, 2006). Esses fatores podem ser genéticos, neuroanatômicos, moleculares entre outros. Sem dificuldade, é possível perceber que muitos modelos podem ter uma validade de construto baixa, que de fato tem sua origem no próprio desconhecimento dos fatores causais das doenças mentais (Cryan e Mombereau, 2004)). Tomando isso em consideração que atualmente não existe uma metodologia padronizada de diagnóstico objetivo com marcadores definidos (como no caso de outras especialidades médicas que baseiam o diagnóstico em testes fisiológicos); com marcadores definidos, o trabalho de gerar modelos com adequada validade de construto já é uma tarefa difícil. Alguns avanços nessa área serão abordados na seção discutindo o tópico “psiquiatria de precisão”.

Por outro lado, a validade preditiva parece ter melhores resultados. A validade preditiva informa se o modelo responde de forma similar aos tratamentos utilizados na clínica. Dessa forma é esperado que um modelo com validade preditiva consiga responder aos tratamentos. Existe consenso que os modelos atuais têm uma aceitável validade preditiva para o estudo de transtornos psiquiátricos, principalmente aqueles avaliando transtornos da ansiedade (Haagen et al., 2015).

Finalmente, a validade de face, está relacionada com quão bom o modelo pode mimetizar a sintomatologia do transtorno (Goswami et al., 2013). Assim, respostas como medo intenso, níveis elevados de corticosterona e dificuldade na extinção são respostas esperadas em modelos animais de TEPT.

Na figura 2 podem ser observados alguns dos principais modelos existentes para o estudo do TEPT. Para a compreensão de modelos e os experimentos que serão mostrados nesta tese, focaremos na validade do condicionamento aversivo ao contexto (CAC) e em outros

modelos de condicionamento aversivo para o estudo dos transtornos associados ao medo ou trauma.

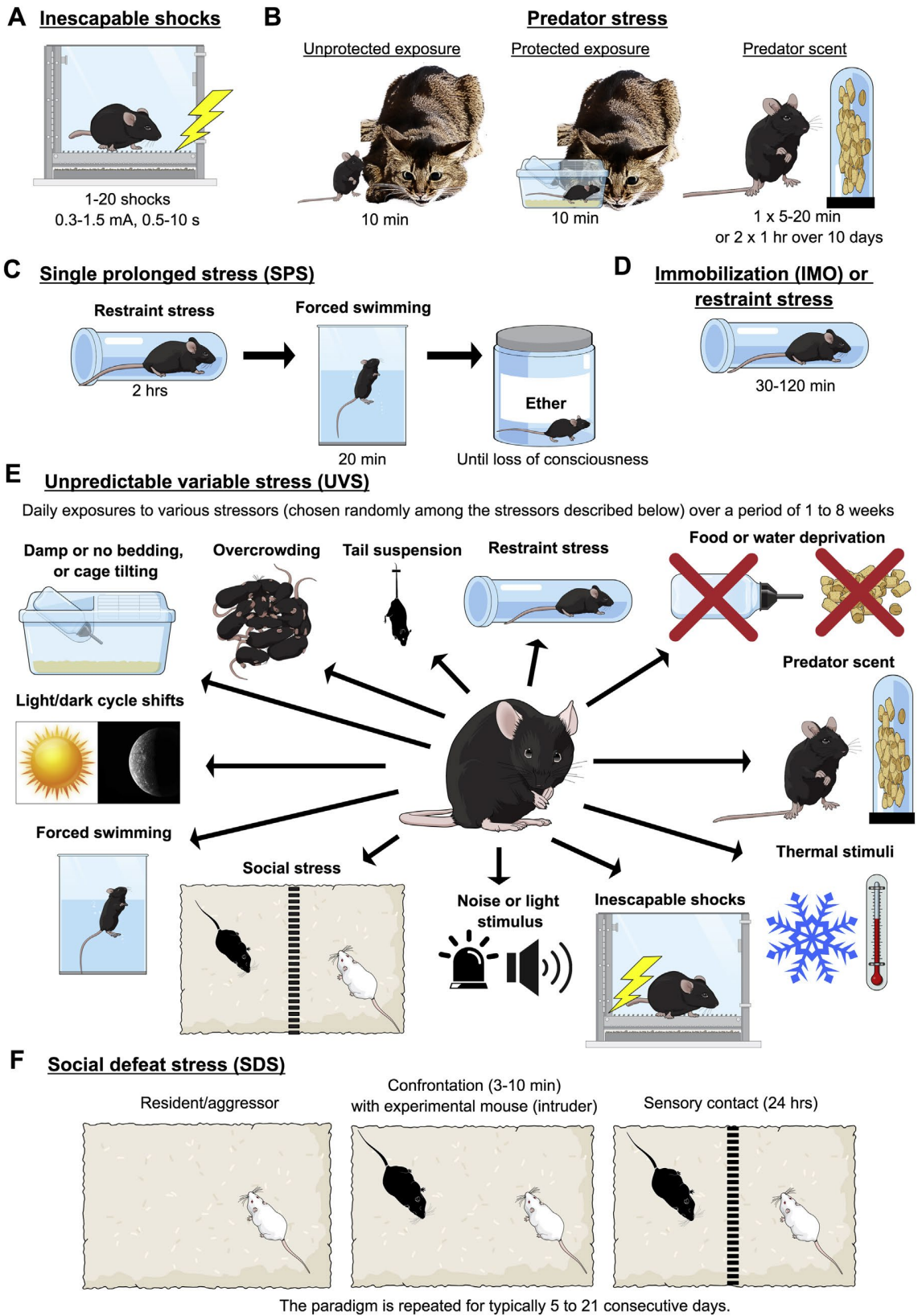


Figura 2: Principais modelos animais utilizados no estudo do TEPT. **A)** O choque inescapável, no qual pode ser encontrado o condicionamento aversivo ao contexto (CAC), expõe o animal a um estresse (choque nas patas) concomitante com estímulos preditivos como tons ou o próprio contexto, mas deixa o animal sem possibilidade de enfrentamento que não seja resposta do tipo passivo como o congelamento (do inglês, *freezing*). **B)** A exposição ao predador é baseada na ideia que estímulos naturalmente aversivos para o animal podem gerar memórias de medo muito robustas e persistentes. No caso da exposição direta, o predador (gato) interage diretamente com o indivíduo (roedor) sem barreira física. Existem ainda duas variantes, que expõem o animal ao predador, mas evitando o contato físico ou também só com a exposição ao cheiro do predador. **C)** O estresse crônico imprevisível (ou estresse crônico variável) também é outro modelo que pode desencadear comportamento do tipo ansioso e também semelhante à depressão. O modelo consiste na exposição repetida a diferentes tipos de estressores ao longo de vários dias, como por exemplo teste de nado forçado, choques inescapáveis, troca do ciclo claro/escuro, restrição motora, dentre outros. **D)** O teste de derrota social se baseia na dominância de um animal sobre o sujeito experimental. Essa dominância é estabelecida por meio de contato e confrontação social. Geralmente o animal deve ser exposto a um outro animal de maior tamanho, com maior probabilidade de ganhar o confronto, e o teste final consiste em avaliar a aproximação do derrotado com o ganhador, sem contato físico. Figura extraída com base em Deslauriers e colaboradores (2018).

Uma das características-chave do condicionamento aversivo pavloviano é que se fundamenta na associação de estímulos inicialmente neutros, que ganham um valor preditivo de um estímulo incondicionado como um choque nas patas (Fanselow et al., 1998). Por meio do pareamento desses estímulos, é gerada uma resposta condicionada que, nesse caso específico, seria a expressão de medo a estímulos discretos ou contextuais (Figura 3). Tal processo de aprendizado tem se mostrado associado ao desenvolvimento de TEPT, motivo pelo qual o condicionamento aversivo oferece a possibilidade de investigar os substratos neurobiológicos responsáveis pela manutenção deste tipo de informação emocionalmente marcante (LeDoux, 2000; Walker e Davis, 2002; Maren e Quirk, 2004; Sah e Westbrook, 2008). Adicionalmente o TEPT, que por natureza é resistente à extinção (Ursano et al., 2009), parece afetar significativamente o controle inibitório de estruturas pré-frontais importantes para a flexibilidade cognitiva e a própria extinção (George et al., 2015). O mesmo acontece nas manifestações clínicas do TEPT,

quando a expressão de medo após o condicionamento pode estar influenciada pela aversividade da experiência. Desta forma a quantidade de associações ou a intensidade do treino podem gerar memórias fortes ou fracas, assim como resistentes ou não à extinção (Rescorla, 1968; Bauer et al., 2001, Norrholm et al., 2011). Como será explicado mais adiante, a intensidade do treino também muda a generalização da memória aversiva, induzindo respostas de medo a eventos ou estímulos similares (Pedraza et al., 2016; Jasnow et al., 2017), um processo-chave na manutenção da patogênese dos transtornos do estresse/ansiedade.

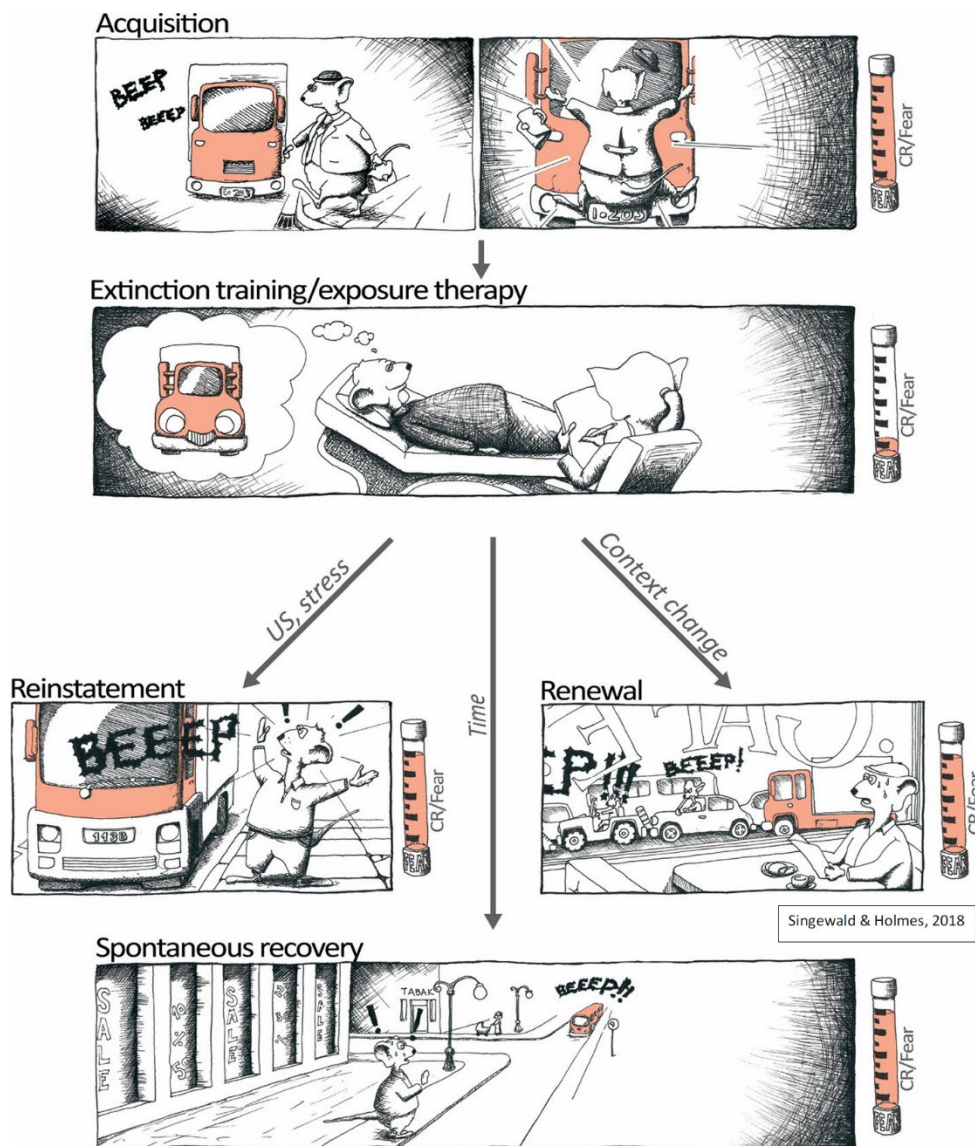


Figura 3. Sequência de eventos envolvendo o condicionamento clássico pavloviano. O condicionamento pavloviano se fundamenta na aquisição de uma resposta aversiva pela exposição a estímulos neutros como tons ou contextos, pareados com estímulos que geram uma resposta incondicionada (choque nas patas produz medo, sendo o medo a

resposta incondicionada). O aprendizado permite que os estímulos neutros ganhem um valor preditivo sob a consequência aversiva, desta forma, a exposição a esses estímulos, (que agora podem ser chamados de estímulos condicionados), gera a resposta incondicionada. Em conjunto, observamos que a exposição ao estresse com estímulos preditores gera uma resposta condicionada. A resposta de medo pode ser enfraquecida por meio da extinção, que envolve uma exposição aos estímulos condicionados em total ausência de consequências aversivas. É esperado que ao longo da extinção o indivíduo consiga reduzir a resposta de medo condicionada. No entanto, a extinção pode ser muito vulnerável a estímulos externos fora do contexto de extinção, que levam à recuperação da resposta. Por exemplo, exposição a contextos diferentes com estímulos presentes no momento do aprendizado, a exposição ao estímulo incondicionado em contextos diferentes ou o simples passar do tempo, podem reestabelecer a resposta aversiva. Aqui em suma, o grande objetivo é como prevenir dita recuperação. Figura retirada de Singewald e Holmes (2018).

A crescente ideia de utilizar a reconsolidação da memória como estratégia terapêutica no TEPT foi resgatada usando um modelo de condicionamento pavloviano (Nader et al., 2000), bem como trabalhos pré-clínicos que baseiam suas metodologias nos processos de reativação de forma idêntica ao trabalho realizado em animais (Schiller et al., 2010; Ross et al., 2017).

Uma possível base genética do TEPT também pode ser estudada em modelos de condicionamento aversivo. Por exemplo, Dias e Ressler (2014) mostraram que uma associação aversiva usando um cheiro específico em camundongos, pode influenciar o comportamento de gerações futuras ao mesmo cheiro. As duas subseqüentes gerações mostraram sensibilidade ao cheiro que foi usado para gerar o condicionamento na primeira geração. Os resultados sugerem uma interessante possibilidade de transmissão parental de informações aprendidas, complementando evidências sobre a hereditabilidade da suscetibilidade ao TEPT (Stein et al., 2002; Hettema et al., 2003, 2008).

Desde um ponto de vista farmacológico, o condicionamento aversivo pode ser usado para o estudo de substâncias químicas, por exemplo, com efeito amnésico (Izquierdo, 1989). No entanto, outros estudos têm usado o condicionamento aversivo como uma medida de ansiedade e modelo de transtornos de ansiedade generalizada (Dias et al., 2014).

Considerando que muitos ansiolíticos podem ter efeitos amnésicos, é possível dissociar os efeitos de tais fármacos, sobre a memória e na ansiedade, por meio de testes adicionais como o labirinto em cruz elevado ou o campo aberto (Quillfeldt, 2016). Dessa forma alguns estudos têm mostrado como substâncias podem interferir diretamente em alguma das fases da memória sem comprometer a ansiedade ou a locomoção do animal (McEown e Treit, 2013). A conceitualização do TEPT como um transtorno primariamente da memória, faz do condicionamento pavloviano uma ferramenta muito útil no estudo da neurobiologia e fisiopatologia do TEPT assim como para o desenvolvimento de novas intervenções.

1.6 Controle farmacológico da expressão de memórias aversivas: evidências de modelos animais e ensaios clínicos

Como aconteceu com a depressão, o TEPT teve como principal ferramenta farmacológica os antidepressivos inibidores da monoaminoxidase (iMAO), com resultados conflitantes (Schestastky et al., 1988; Kosten et al., 1991). Similar aos iMAOs, os tricíclicos como cloridrato de amitriptilina tiveram efeitos modestos (Davidson et al., 1990), no entanto seus efeitos secundários levaram a uma retração progressiva do seu uso. Sem dúvida, a incorporação dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs) permitiram uma redução considerável dos efeitos adversos, no entanto a eficácia terapêutica de compostos como a paroxetina, sertralina e fluoxetina se mantém em discussão (NICE, 2005). Entretanto, a implementação clínica destes fármacos antecedeu uma pesquisa exaustiva dos seus efeitos celulares e moleculares e as situações nas quais poderiam ser efetivos. A falta de marcadores objetivos, assim como uma terapêutica clássica baseada na tentativa e erro, tem levado à psiquiatria clínica a níveis onde cerca de 20-30% dos pacientes são considerados refratários aos tratamentos (Crown et al., 2002).

Conhecendo a efetividade reduzida de alguns antidepressivos, estudos recentes apontam possíveis novos alvos. Como mencionado anteriormente, os elevados níveis de NA após a aquisição de respostas aversivas levaram a considerar que inibidores desse sistema, como o propranolol, podem prevenir a formação de memórias aversivas assim como modificá-las durante a reconsolidação, estratégia que tem obtido sucesso em importantes ensaios clínicos e pré-clínicos (Pitman et al., 2002, Taylor e Cahill, 2002; Taylor e

Raskind, 2002, Vaiva et al., 2003). Por outro lado, antagonistas de receptores α_1 adrenérgicos como a prazosina e agonistas α_2 como a clonidina mostraram-se efetivos na redução dos níveis de ansiedade generalizada e hiper-reatividade em pacientes com TEPT (Boehnlein e Kinzie, 2007). Em roedores, sob a perspectiva da reconsolidação da memória, a clonidina, quando administrada após a reativação de um condicionamento aversivo pavloviano, prejudica a memória aversiva persistentemente e em forma dose dependente (Gamache et al., 2012). Em população clínica a clonidina se mostra eficaz em sintomas como transtornos do sono após o trauma (Van Liempt et al., 2006), mas uma meta-análise recente que a compara com outros fármacos disponíveis concluiu que não existem dados suficientes para ser considerada como uma opção segura para a terapia do TEPT, apesar de seu efeito positivo na sintomatologia secundária (comorbidades), como ocorre com pesadelos/flashbacks (Detweiler et al., 2016).

Antidepressivos como a Tianeptina têm mostrado eficácia no controle da sintomatologia do TEPT (Onder et al., 2006). Contrário a outros antidepressivos, o efeito terapêutico da tianeptina é aparentemente mediado pela melhora da transmissão glutamatérgica e sobre parâmetros de plasticidade sináptica (Kole et al., 2002, Kasper e McEwen, 2008, McEwen et al., 2010). A eficácia da tianeptina é apoiada por evidências mostrando que estressores aumentam níveis de liberação de glutamato (Bagley e Moghaddam, 1997, Reznikov et al., 2007), inibe sua recaptação (Yang et al., 2005) e aumenta a expressão de receptores para dito neurotransmissor (McEwen et al., 2002). De fato, em um modelo animal de TEPT, foi verificado que a exposição a um choque nas patas leva a um aumento da expressão de receptores AMPA concomitante com um aumento na expressão persistente do medo (Thoeringer et al., 2012). A tianeptina parece prevenir essas mudanças sinápticas induzidas pelo estresse e seus efeitos adversos no aprendizado e na memória (Campbell et al., 2008, McEwen et al., 2010, Pillai et al., 2012).

Na mesma linha, o fármaco D-Cicloserina (DCS), um modulador do sítio de ligação da glicina no receptor NMDA, favorece a extinção em animais (Mao et al., 2008; Bouton et al., 2008; Weber et al., 2007 e humanos (Grillon, 2009). Adicionalmente, a DCS favorece o processo de reconsolidação por meio do benefício aos mecanismos que permitem a desestabilização da memória. Por exemplo, Espejo et al., (2016) demonstraram que o estresse prévio a uma reativação da memória aversiva torna a informação insensível aos efeitos amnésicos do midazolam. No entanto, a administração de D-Cicloserina restaura

a possibilidade de interferência quando administrado sistemicamente ou intra-amígdala. Os efeitos da DCS parecem ser mediados pelas conexões entre córtex pré-frontal e amígdala e a expressão de receptores de NMDA nessas estruturas (Baker et al., 2018). De fato, a lesão de regiões pré-frontais como o córtex orbitofrontal medial inibe o efeito facilitatório da DCS durante a extinção, sugerindo que a eficácia do tratamento depende da integridade do córtex pré-frontal para a redução da resposta aversiva (Sierra et al., 2016).

Finalmente, os hormônios esteroides também devem ser aqui considerados. Hormônios como a desidroepiandrosterona (DHEA, do inglês) podem controlar os efeitos deletérios do estresse durante o TEPT, bloqueando a ação tóxica do cortisol (Cardounel et al., 1999; Rasmusson et al., 2003). De forma interessante, pacientes que apresentam remissão depois de 16 semanas de psicoterapia para o TEPT, tiveram níveis elevados de DHEA comparado com aqueles que não foram responsivos ao tratamento (Olf et al., 2007). Em modelos animais, a administração de DHEA aumenta os níveis de BDNF (Naert et al., 2007) e receptores 5-HT_{2A} na amígdala (Cyr et al., 2000) e pode inibir os efeitos do estresse na plasticidade hipocampal (Diamond e Fleshner, 1999; Diamond et al., 1999). A administração de inibidores de glicocorticoides como a metirapona após o CAC inibe a expressão de memórias de medo generalizadas (Pedraza et al., 2016), um componente essencial do TEPT (Jovanovic et al., 2012; Lopresto et al., 2016). Os efeitos benéficos da metirapona em populações clínicas têm sido observados principalmente no reestabelecimento de padrões de sono assim como o controle dos níveis de cortisol, fisiologicamente elevados nestes pacientes (Otte et al., 2007; Inslicht et al., 2018).

Nas seções seguintes, analisaremos os efeitos de um agente farmacológico clássico no tratamento do TEPT, a fluoxetina, assim como evidências que tem surgido de substâncias naturais potencialmente úteis no controle de respostas de medo, como é o caso da cafeína, um antagonista adenosinérgico.

1.6.1 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e controle da expressão do medo: O caso da fluoxetina

O ISRS fluoxetina foi lançado inicialmente como nova estratégia terapêutica no tratamento da depressão no final da década de 1980, mas foi estendido para uma longa lista de psicopatologias, tais como ansiedade generalizada (Zou et al., 2013), agorafobia (Bakker et al., 2000), insônia (Fava et al., 2006), transtorno obsessivo compulsivo (Bergeron et al., 2002) e inclusive como coadjuvante no tratamento de transtornos do espectro autista (Lucchelli e Bertschy, 2018) e esquizofrenia (Watanabe, 2011). Sua função como regulador do humor em estados depressivos e no perfil ansiolítico converteu os ISRS, em particular a fluoxetina, como ferramenta farmacológica de primeira linha em transtornos de ansiedade como o TEPT (Ravindran and Stein, 2017). É importante salientar que outros fármacos foram desenvolvidos ao longo dos anos com um perfil mais seletivo, como o escitalopram, com menos efeitos adversos e redução da ansiedade mais rápida em comparação com a fluoxetina, que de fato, pode induzir ansiogênese nas primeiras fases do tratamento (Gorman, et al 1897). Os relatos clínicos de aumento na ansiedade, no início do tratamento, foram respaldados por pesquisas recentes mostrando que os ISRSs inicialmente recrutam uma via proveniente do núcleo da rafe dorsal, que induz a atividade de uma subpopulação de neurônios da estria terminal (BNST, do inglês). Tais neurônios são responsáveis pela liberação do fator de liberação de corticotropinas que, por meio de circuitos inibitórios, silencia a comunicação entre o BNST e a área tegmental ventral (VTA, do inglês), uma via previamente implicada na redução da ansiedade e percepção de segurança em animais – de ação predominantemente dopaminérgica (Marcinkiewicz et al., 2016). Adicionalmente, os receptores 5-HT_{2C} parecem mediar dito fenômeno, pelo qual os autores propõem um estado hiperserotoninérgico durante a fase aguda do tratamento, que favorece a inibição de circuitos no BNST que regulam a expressão da ansiedade. Estudos adicionais têm mostrado que a administração de fluoxetina ou citalopram, de forma aguda, pode melhorar a aquisição de respostas aversivas assim como a sua evocação, quando administradas antes do teste no condicionamento aversivo ao som (Burghardt et al., 2007).

Na prática clínica, o aumento da ansiedade pode ser contrabalanceado por meio da administração concomitante de ansiolíticos nas primeiras semanas do tratamento

(Baldwin et al., 2014). Além do efeito adverso na administração aguda, os ISRSs têm uma eficácia questionável no tratamento de TEPT, com relatos que não superaram os grupos placebo (Berger et al, 2009). Como já mencionado, a tentativa e erro, própria da psiquiatria, e a ausência de medicina psiquiátrica individualizada e de precisão podem estar na base destes resultados heterogêneos, onde uma população clínica com diagnósticos similares respondem diferentemente ao mesmo tratamento.

Boa parte dos efeitos benéficos da fluoxetina (e outros ISRSs) no controle de respostas de medo, em modelos animais, tem sido associada com o aumento progressivo na produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, em inglês), em regiões como o hipocampo, ao longo do tratamento. Por exemplo, Santarelli e colaboradores (2003) mostraram que a irradiação de raios X no hipocampo diminui a neurogênese induzida pela administração crônica de fluoxetina, imipramina e desipramina, que por sua vez inibe a diminuição da ansiedade induzida pelo tratamento. Alterações genéticas no funcionamento fisiológico do BDNF, em roedores, gera fenótipos de tipo ansioso que são resistentes ao tratamento com fluoxetina (Chen et al., 2006). Usando também fluoxetina e desipramina, Santos e colaboradores (2006) mostraram que o efeito de antidepressivos pode depender da intensidade do evento aversivo. Por meio do CAC com intensidades de treino moderadas e elevadas, os autores reportam que animais treinados com intensidades altas foram mais sensíveis aos efeitos da administração de fluoxetina durante 2 semanas, diminuindo o congelamento significativamente em comparação com a desipramina. No entanto, em animais selecionados fenotipicamente para a expressão de altos ou baixos níveis de congelamento após o condicionamento, a fluoxetina se mostrou igualmente efetiva, sugerindo que o tratamento pode ser efetivo tanto em perfis vulneráveis como resilientes ao estresse (Graham et al., 2018).

A relação entre fluoxetina e plasticidade sináptica tem se fortalecido com evidências mostrando que o condicionamento aversivo pode diminuir a eficácia sináptica e indução da LTP nas fibras entre fimbria-CA3 que por sua vez é prevenido pela administração concomitante de fluoxetina (Spennato et al., 2008). Mesmo sem diferenças comportamentais em termos de congelamento, o estudo mostrou que a fluoxetina pode controlar os efeitos adversos na plasticidade advinda do estresse do condicionamento. Outros estudos têm mostrado resultados similares na amígdala, indicando neurogênese hipocampal após a administração de fluoxetina, resultados que devem ser considerados

com cautela pela pouca evidência de neurogênese além das estruturas classicamente conhecidas como o hipocampo e bulbo olfatório (Jiang et al., 2014).

No caso da extinção, um dos processos-alvo que serão aqui avaliados, Deschaux e colaboradores (2011) mostraram que a administração crônica de fluoxetina durante 21 dias antes da aquisição do condicionamento, em ratos, pode inibir o subsequente ressurgimento da resposta de medo após a extinção, mesmo quando o tratamento não muda a taxa de diminuição de congelamento ao longo da extinção. Em um dos estudos mais importantes sobre o efeito da fluoxetina na extinção, Karpova e colaboradores (2011) demonstraram que a fluoxetina pode remodelar circuitos inibitórios na BLA (células contendo parvalbumina) e no hipocampo por meio do aumento na produção de BDNF e facilitando a indução da potenciação sináptica. Em termos comportamentais, a administração de fluoxetina inibiu a recuperação espontânea. Os autores propõem que o tratamento pode afetar as redes perineurais na amígdala e no hipocampo, retornando a um estado imaturo, promovendo a plasticidade e conseqüentemente uma maior possibilidade de mudar o comportamento de medo por meio da extinção. Resultados similares têm sido demonstrados com a administração seletiva de fluoxetina após a extinção (Deschaux et al., 2013). Um estudo subsequente ampliou os resultados de Karpova e colaboradores, mostrando que o uso de fluoxetina na extinção aumenta a expressão da subunidade GluN2A do receptor NMDA na amígdala e no hipocampo, bem como promove uma efetiva redução da resposta de congelamento (Popova et al., 2014). Além da evidência já mencionada de que a extinção promove a regulação de receptores AMPA na Amígdala lateral, o que torna possível uma janela temporária na qual a memória do medo pode ser degradada pela experiência comportamental mostrando um mecanismo molecular para o apagamento do medo (Clem e Huganir, 2010); sob este viés, parece evidente que a fluoxetina precisa, pelo menos em parte, da atividade de receptores NMDA e AMPA para promover a redução do medo.

De forma interessante, Lebrón-Milad e colaboradores (2013), usando um condicionamento ao som, mostraram que a administração crônica de fluoxetina pode induzir a diminuição do congelamento em fêmeas, mas não em machos, e o efeito se mostrou altamente dependente do ciclo estral. Diferenças parecidas têm sido encontradas nas taxas de extinção entre homens e mulheres (Hwang et al., 2015) assim como a influência do ciclo menstrual na expressão de ansiedade (Lonsdorf et al., 2015).

Em conjunto, a evidência clínica sobre a variabilidade da resposta ao tratamento com ISRSs (Preskorn, 2014), assim como as diferentes variáveis que afetam suas respostas comportamentais em animais (momento da administração, intensidade do treino, ansiedade basal, sexo), parecem indicar um panorama onde um modelo transdiagnóstico e personalizado, (isto é, ajustar o tratamento às condições particulares de cada paciente), é a melhor opção para oferecer tratamentos de qualidade. É importante salientar que a discussão tem sido focada na fluoxetina, no entanto, a resposta a tratamentos com fármacos da mesma classe, por exemplo o citalopram, podem gerar resultados clínicos diferentes (Lee et al., 2016), observação esta que também foi demonstrada em modelos animais, onde a administração de citalopram prejudicou a extinção da resposta aversiva (Burghardt et al., 2013). Nos experimentos que serão aqui apresentados, uma variável adicional será contemplada neste já complicado panorama multifatorial da expressão do medo: a generalização de respostas aversivas. O fenômeno será abordado mais adiante.

1.6.2 Podem substâncias naturais afetar as respostas de medo e ansiedade? O caso da cafeína

O potencial clínico de compostos naturais tem sido relegado pela farmacologia clínica tradicional. Porém, isto resulta entendível quando comparada a evidência científica disponível para este tipo de compostos em termos de pesquisa pré-clínica e clínica vs compostos sintetizados (Asher et al., 2017). Em anos recentes, o interesse tem aumentado, no entanto, o protagonismo tem sido principalmente das substâncias psicodélicas que estão produzindo resultados bastante promissores no tratamento de patologias como a depressão e o TEPT (Slomsk, 2018; Fava et al., 2018).

Compostos como o mio-inositol, uma forma natural de inositol presente em frutas e frutos secos, tem mostrado efetividade em estudos duplo-cego para transtornos de ansiedade como o pânico. De fato, um mês de tratamento se mostrou mais efetivo na redução do número de ataques de pânico que a fluvoxamina, um dos fármacos tradicionais no tratamento desta patologia e do transtorno obsessivo compulsivo (Palatnik et al., 2001). Adicionalmente, os efeitos adversos foram reduzidos com o mio-inositol, propriedade que pode favorecer a aderência ao tratamento. Extratos de plantas como o *galphimia brasiliensis*, proveniente da planta mexicana *Carderona Amarala* ou também conhecida

como “flor de estrela”, conhecida por seus efeitos sedativos tem mostrado efeito ansiolítico em roedores expostos ao labirinto em cruz elevado (Herrera-Ruiz et al., 2006). Em humanos, a galphimia-b possui um efeito ansiolítico similar ao benzodiazepínico lorazepam (1mg) em pacientes com ansiedade generalizada (Herrera-Arellano et al., 2007). Esses efeitos parecem ser mediados pela inibição de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral VTA (Tortoriello et al., 1998) assim como por sua interação com receptores 5-HT1A, pelos menos no hipocampo (Jimenez-Ferrer et al., 2011), e tem sido excluído, paradoxalmente, um efeito direto em receptores GABAérgicos (Prieto-Gómez et al., 2003). Resultados similares têm sido encontrados com análogos do resveratrol como o pterostilbeno, que mostrou efeito ansiolítico em camundongos concomitante com uma diminuição na fosforilação das cinases reguladoras extracelulares ERK1 e 2 (Al Rahim et al., 2013). Por outro lado, os resultados com resveratrol são controversos e seu efeito em habilidades cognitivas como memória e aprendizado são nulos, apenas com um modesto efeito benéfico em estados de ânimo (Farzaei et al., 2018).

Outro exemplo importante é a curcumina, parte do componente ativo do açafrão-da-Índia (*Curcuma longa*) rico em antioxidantes e com significativa atividade anti-inflamatória. A curcumina tem se mostrado efetiva na diminuição de sintomas associados com depressão e ansiedade em pacientes obesos (Esmaily et al., 2015). Uma dieta enriquecida com curcumina, em ratos, torna os animais menos vulneráveis ao condicionamento aversivo ao som, inibindo a expressão de genes de ativação imediata na BLA, como o Arc/Arg e Egr-1, associados com a aquisição da resposta aversiva (Monsey et al., 2015). Adicionalmente, a curcumina prejudica a reconsolidação de memórias recentes e remotas (para uma revisão sobre os efeitos da curcumina em transtornos psiquiátricos ver Lopresti et al., 2017).

Compostos como a curcumina ou o resveratrol, mesmo sendo de consumo frequente através dos alimentos, não atingem o mesmo impacto na dieta que o consumo de cafeína. A cafeína é consumida através de diferentes alimentos e bebidas, embora sua principal fonte seja o café (Reyes and Cornelis, 2018). É reconhecida como a substância psicoativa mais consumida do mundo, com aproximadamente 1,6 bilhões de copos ao dia (Cappelletti et al., 2015), e tem sido parte importante histórica e economicamente, particularmente em países como Colômbia e o Brasil (Pantoja-Gomez et al., 2019). O efeito da cafeína sobre o aprimoramento físico tem sido destacado em diferentes

pesquisas (Grgic and Mikulic, 2017), no entanto seu efeito na cognição continua sendo matéria de debate (Cappelletti et al., 2015).

O principal mecanismo de ação da cafeína em doses comumente utilizadas é inibir os receptores de adenosina devido à remoção do tônus adenosinérgico com uma alta especificidade aos receptores de adenosina A1 e A2A, que são os responsáveis pelas ações tônicas da adenosina endógena (e de forma mais inespecífica nos receptores A2B e A3). (Ribeiro e Sebastião, 2010). Os receptores adenosinérgicos são acoplados à proteína G, com a adenosina como o ligante endógeno (Fredholm, 2010; Fredholm et al., 2001). O receptor A1 é acoplado à proteína Gi, inibindo a formação de AMP cíclico. Entre seus agonistas estão a adenosina e a 2-CloroN6-ciclopentiladenosina (CCPA). Dentre os antagonistas desse receptor, pode-se encontrar a cafeína, a teofilina e a 8-Ciclopentil-1,3-dimetilxantina (CPX). O receptor adenosinérgico A2A ativa a subunidade estimulatória da proteína G (Gs), dessa forma aumentando a conversão de ATP em AMP cíclico. Tem, entre seus agonistas, a adenosina, a ATL-146e, e a CGS-21680; entre seus antagonistas, pode-se encontrar a cafeína, teofilina, istradefilina e SCH-58261 (Jacobson e Gao, 2006).

Provavelmente, um dos artigos mais importantes sobre os efeitos da cafeína na memória foi publicado por Borota e colaboradores (2014), onde a ingestão de 200mg de cafeína após o aprendizado de uma lista de palavras, facilitou significativamente a evocação da memória 24h após da aquisição. O estudo também mostrou que o efeito segue uma função quadrática na forma de “U” invertido e é específico na consolidação, já que o mesmo tratamento antes da evocação não mostrou diferenças. O estudo foi importante para isolar a memória como variável principal e atingir conclusões sem a interferência de estados de alerta, ansiedade e mudanças de tempo de reação, que usualmente acompanham tarefas espaciais e procedimentais (Rogers et al., 2013).

No caso do condicionamento aversivo, Corodimas e colaboradores (2000) mostraram que a administração de cafeína (10, 20 e 30mg/kg) prejudica a formação da memória do CAC de uma forma dose-dependente, mas não tem efeito no condicionamento aversivo ao tom. Os autores concluem que dito efeito em memórias hipocampo-dependentes mostra que receptores adenosinérgicos hipocampais são essenciais na formação de representações contextuais. No entanto, um estudo posterior mostrou que no condicionamento aversivo

ao som, a administração de cafeína 30mg/kg prejudica a aquisição e evocação da memória, mas não a sua consolidação (Dubroqua et al., 2015). Outro estudo, avaliando os efeitos da administração crônica de cafeína assim como seu efeito de retirada em camundongos jovens e adultos, reportou que a cafeína pode melhorar a aquisição de memórias aversivas em baixas doses (1mg/kg) e prejudicá-la em doses maiores (3mg/kg) em animais jovens, no entanto dito efeito não foi observado em adultos (Poole et al., 2016). Adicionalmente, animais jovens se mostraram mais sensíveis à retirada/abstinência da cafeína, onde foi verificado um prejuízo na posterior execução da tarefa.

Simões e colaboradores (2016) observaram que a administração de 7 dias contínuos de cafeína em camundongos (5mg/kg), antes do condicionamento ao tom, prejudica a evocação da memória contextual 48-78h e 7-8 dias após o treino, mas não prejudicou a resposta de congelamento ao tom. Um efeito similar foi atingido com redução induzida de receptores A2A na BLA, receptor que aumenta sua densidade após a aquisição desta tarefa. Os efeitos da cafeína foram associados com a redução do receptor A2A após a administração recorrente e novamente foi constatada a vulnerabilidade hipocampal aos efeitos da cafeína.

Não existe evidência dos efeitos da cafeína na extinção e na reconsolidação de memórias aversivas, ponto que estimulou os experimentos que serão demonstrados adiante.

Quanto ao estado de ânimo, a cafeína tem sido associada com aumento de ansiedade, o que pode depender do histórico de consumo (consumo habitual é menos suscetível a efeitos na ansiedade, ver Rogers et al., 2013). Porém, esse efeito geralmente é reportado com doses acima de 300mg (Lader e Bruce, 1986; Green e Suls, 1996) e com uma baixa correlação entre consumo diário de cafeína e ansiedade (Gurpegui et al., 2007). Por outro lado, o consumo de cafeína em baixas doses parece favorecer o efeito antidepressivo de fármacos como a mianserina (Poleszak et al., 2016; Szopa et al., 2016), havendo uma correlação negativa entre sua administração e tentativa de suicídio (Kawachi et al., 1996; Lucas et al., 2014). Recentemente, Liu e colaboradores (2017) mostraram que baixas doses de cafeína (60mg), junto com a ingestão de um antidepressivo, pode reduzir sintomas de depressão em mulheres mais rapidamente que com o uso isolado do antidepressivo. O efeito foi acompanhado por uma melhora em testes cognitivos assim como normalização de níveis de cortisol na saliva. Esses resultados com população clínica contrastam com as

evidências em pacientes saudáveis, onde a cafeína não mostra influências no estado de ânimo, além de uma melhora na disposição diária (Judelson et al., 2005).

Em modelos animais, um consenso dos efeitos da cafeína na ansiedade é difícil de atingir pela variabilidade de doses e testes usados, sendo possível encontrar tanto efeitos ansiogênicos (Bhattacharya et al., 1997) como ansiolíticos (Tang et al., 1899). A potencial melhora no estado de ânimo induzida pela cafeína poderia estar associada ao fato de aumentar os níveis de dopamina extracelular no núcleo accumbens (Solinas et al., 2002) que, por sua vez, poderia explicar os achados de preferência e aversão condicionada com cafeína (Brockwell et al., 1991).

Neste trabalho, a interface entre memória, ansiedade e preferência condicionada com cafeína serão focos importantes, assim como o potencial da cafeína no controle da expressão do medo condicionado no CAC.

1.7 A generalização da memória como um marcador de transtornos associados ao trauma: Relação com a consolidação sistêmica da memória

A generalização de informações a situações similares pode ser altamente adaptativo, permitindo inferências e estabelecendo novas regras a partir de conhecimentos prévios (Behrens et al., 2018). No entanto, a generalização pode ser patológica quando envolve comportamentos não apropriados durante a exposição a novos estímulos e eventos. A generalização de respostas de medo faz parte dos critérios diagnósticos do TEPT (Jovanovic et al., 2012; Lopresto et al., 2016), onde pacientes são incapazes de restringir as respostas de medo e ansiedade aos preditores apropriados (Kaczkurkin et al., 2017). Porém, a generalização do medo pode estar presente em outros transtornos como fobias específicas, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de pânico e ansiedade generalizada (Dymond et al., 2015). Assim, estudos visando investigar a generalização do medo em populações clínicas têm reportado que transtornos de ansiedade aumentam a taxa de generalização entre estímulos condicionados e seguros em comparação com grupos-controle (Lissek et al., 2010; 2014). Mesmo com um limitado número de estudos focando nas respostas de generalização no TEPT (Lissek et al., 2014), a presença da generalização como marcador patológico dos transtornos de ansiedade tem levado a

sugerir que a melhoria da discriminação entre estímulos seguros e aversivos poderia ser essencial para facilitar as intervenções terapêuticas (Dunsmoor e Paz, 2015).

Em modelos animais, a generalização pode ser atingida durante o condicionamento aversivo utilizando estímulos como tons ou luz, onde o animal é exposto a dois estímulos condicionados claramente distinguíveis, mas só um deles é pareado com o estímulo aversivo (para um exemplo, ver Bundel et al., 2016). Também é possível haver generalização contextual, onde o animal não consegue discriminar entre o contexto de treino e um contexto novo (Asok et al., 2019). Mesmo que ambos os protocolos sejam úteis para estudar a generalização do medo, eles diferem nas estruturas implicadas, assim como o gradiente temporal no qual a generalização é estabelecida. Por exemplo, a generalização com estímulos como tons pode ser avaliada 24h depois do treino (Bundel et al., 2016), no caso contextual; no mesmo ponto de tempo os animais conseguem discriminar os contextos e a generalização só é verificada ao longo tempo (Pedraza et al., 2016; 2017). Desta forma, podemos afirmar que o gradiente temporal da generalização a estímulos discretos é rápido, quando comparado com o gradiente temporal da generalização contextual (no entanto, recentemente um protocolo foi adaptado para gerar generalização contextual em 24h, (Zhou et al., 2017)).

As diferenças parecem residir nas estruturas envolvidas em cada um dos aprendizados. Classicamente, o condicionamento aversivo a estímulos discretos tem se demonstrado principalmente dependente da amígdala (Tallot et al., 2016), enquanto o CAC é dependente do hipocampo (Izquierdo et al., 2016). A palavra dependência aqui deve ser entendida como uma prioridade funcional de dita estrutura na manutenção da informação, mas hipocampo e amígdala participam de ambos aprendizados. Considerando que neste trabalho foi usado o CAC, a ênfase será voltada ao hipocampo e seu papel na discriminação de estímulos.

Uma estratégia básica na resolução de informações ambíguas é a comparação de estímulos novos como estímulos previamente codificados (Albasser et al., 2013). No caso de informações contextuais, a comparação permite estimar a probabilidade de ocorrência de eventos no novo contexto permitindo ajustar o comportamento em consequência (Maren et al., 2013). A ambiguidade entre estímulos é sugerida como uma forma de interferência onde novos estímulos podem desencadear a reativação de traços de memória

já codificados (Besnard e Sahay, 2016). Um número considerável de evidências tem mostrado que o hipocampo possui um papel central na resolução de ambiguidades contextuais. Por exemplo, a lesão da região dorsal do hipocampo tem sido associada com o prejuízo na discriminação de contextos aversivos e seguros (Maren et al., 1997; Frankland et al., 1998). De fato, há registros de uma relação direta entre o envolvimento hipocampal e a discriminação da memória (Wiltgen et al., 2010).

Algumas teorias têm sido propostas para explicar a generalização de memórias contextuais. Riccio e colaboradores (1992) propõem que a generalização é essencialmente um processo de esquecimento dos atributos envolvidos no treino. Desta forma, ao longo do tempo esses atributos são “semantizados” onde ideias gerais daquilo que foi aprendido se mantêm, mas os detalhes são perdidos. Como anteriormente mencionado, a generalização contextual se mostra mais lenta que a generalização a estímulos discretos, e a hipótese do esquecimento se ajusta a esse fenômeno. Wiltgen e Silva (2007) encontraram um gradiente de generalização onde animais treinados no CAC conseguem discriminar entre contextos 1 dia após o aprendizado, no entanto o congelamento no novo contexto aumenta ao longo do tempo, sendo igualado a contexto de treino 36 dias após. Dito efeito parece ser inibido quando os animais são expostos ao contexto de treino antes do teste, protocolo no qual a precisão é recuperada (Zhou e Riccio, 1996; Pedraza et al., 2017). Em concordância, a reativação periódica da memória no contexto de treino mantém a precisão contextual e o envolvimento hipocampal na evocação (de Oliveira Alvares et al., 2012). Esse último resultado sugere que o gradiente de generalização pode ser produto, por sua vez, de uma degradação do papel do hipocampo na evocação da memória. Sob esta perspectiva, se a memória é periodicamente reativada ao longo do tempo, mantêm-se a dependência hipocampal diminuindo o gradiente de consolidação sistêmica da memória.

A consolidação sistêmica da memória explica o fortalecimento gradual ao longo do tempo das conexões cortico-corticais que sustentam uma memória particular, as quais serão as principais responsáveis pela sua evocação. Existem algumas teorias sobre a consolidação sistêmica que devem ser entendidas para estabelecer sua possível relação com a generalização. Por um lado, a teoria “padrão” (*standart theory*) sugere o hipocampo como um repositório temporal de traços de memórias episódicas e semânticas e como consequência, lesões hipocampais interferem com a recuperação destas informações

(Frankland e Bontempi, 2005). Só aquelas memórias que são consolidadas em estruturas extra-hipocampais poderiam sobreviver a esse tipo de lesões (por exemplo, memórias remotas que classicamente são dependentes de estruturas encefálicas como o córtex cingulado anterior e o córtex pré-frontal medial). Tomando em consideração que o hipocampo seria fundamental para essa transformação de memórias hipocampo-dependentes em hipocampo-independentes, lesões do hipocampo gerariam a perda de informações antigas que não completaram essa transferência, assim como incapacidade de codificar novas informações dependentes do hipocampo e conseqüentemente sua consolidação sistêmica (Frankland e Bontempi, 2005). Por outro lado, a teoria dos múltiplos traços contempla que lesões do hipocampo vão afetar seletivamente aquelas memórias com rico conteúdo contextual, isto é, memórias episódicas, mantendo intactas memórias semânticas (Nadel e Moscovitch 1997). Adicionalmente, o envolvimento do hipocampo na evocação de informações contextuais é tido como constante, e desta forma se a lesão ocorreu temporalmente perto da codificação ou longe, o prejuízo seria igual. Em suma, na teoria dos múltiplos traços o envolvimento do hipocampo não teria janela temporal.

Os casos clínicos de lesões do hipocampo têm sido uma fonte fundamental para entender a organização anátomo-funcional da memória no encéfalo. Provavelmente um dos casos mais famosos envolve a história do paciente Henry Molaison (paciente H.M.), mundialmente conhecido como H.M. O paciente H.M. foi submetido a um procedimento cirúrgico na década de 50 para ablação bilateral dos lobos temporais mediais para controle de múltiplos ataques epiléticos recorrentes e resistentes à farmacoterapia à época. O procedimento, mesmo que efetivo no controle das crises epiléticas, resultou em um profundo e irreversível déficit de memória que tornou H.M. incapaz de armazenar novas informações (amnésia anterógrada) associado com uma deterioração significativa de memórias de eventos próximos da cirurgia (amnésia retrógrada). Porém, até sua morte em meados de 2000, H.M. manteve-se sem prejuízos na realização de tarefas procedurais, tipicamente dependentes do cerebelo e do corpo estriado e de suas estruturadas adjacentes implicadas na consolidação de memórias procedurais, cujo conteúdo psicomotor é necessário (Para uma análise ampla e aprofundada sobre o assunto ver Corkin, 2013). Apoiando a teoria padrão da consolidação sistêmica da memória, a amnésia retrógrada de H.M. seguia um gradiente temporal onde informações próximas do momento da intervenção se mostraram mais prejudicadas, quando comparadas com as memórias mais

distantes (Squire e Wixted., 2011). Porém, a teoria de múltiplos traços também tem estudos a favor, mostrando que o hipocampo é recrutado durante a evocação de memórias remotas autobiográficas (Nadel et al., 2000; Moscovitch et al., 2005) enquanto memórias semânticas parecem prescindir dessa estrutura (Rosenbaum et al., 2001).

Em nosso laboratório, mostramos que maior intensidade do treino no CAC está associado com uma generalização acelerada (possível de ser verificada 15 dias após o treino em animais submetidos a treinos com choques de 1mA) e ao mesmo tempo com a independência do hipocampo para sua evocação, verificada por meio da inibição seletiva do hipocampo dorsal, com muscimol, antes da sessão de teste (Pedraza et al., 2016). Se as memórias recentes e precisas dependem do hipocampo, então, que estruturas podem mediar a evocação de memórias remotas e generalizadas?

Bontempi e colaboradores (1999) mostraram que a evocação de memórias recentes aumenta a atividade do hipocampo, enquanto memórias remotas contextuais estão associadas com a atividade de estruturas pré-frontais como o córtex cingulado anterior (CCA) (Frankland et al., 2004). Resulta interessante que o CCA tem sido associado com a expressão seletiva de memórias generalizadas (Cullen et al., 2015). Adicionalmente, Einarsson e colaboradores (2015) mostraram que a reativação da memória remota pode tornar o hipocampo novamente suscetível a manipulações farmacológicas durante as 6h seguinte à reativação (isto é, durante a janela temporal da reconsolidação). Como mostrado inicialmente por Zhou e Riccio (1994), a reativação pode recuperar os detalhes contextuais da memória original, sugerindo que ao mesmo tempo o hipocampo se torna novamente responsável por essa informação, ainda que provisoriamente. Resultados similares têm sido mostrados por Pedraza e colaboradores (2017), mostrando uma estreita relação entre memórias recentes e remotas, e a generalização e a dependência hipocampal ou cortical de informações aversivas ao contexto.

Sob uma perspectiva molecular, tem sido proposto que a dinâmica de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 no hipocampo é essencial na generalização e esquecimento dos detalhes contextuais (Hardt et al., 2013). O bloqueio na internalização desses receptores consegue evitar o esquecimento de memórias não emocionais como a localização de objetos e mantém a precisão de memórias no CAC (Migues et al., 2016). É importante salientar que a internalização destes receptores tem sido associada com

processos de LTD e depotenciação da LTP, sugerindo que a generalização e o esquecimento progressivo dos atributos do estímulo poderiam ser mediados por processos de enfraquecimento ativo de sinapses hipocampais. Seguindo a linha de relação entre dependência hipocampal e generalização, pode-se hipotetizar que o mesmo mecanismo molecular poderia mediar a transformação de memória hipocampo-dependentes em córtex-dependentes.

Neste trabalho demonstramos que a generalização de memórias de medo pode ser postergada, mantendo a dependência hipocampal e com claras consequências para a subsequente atenuação da memória de medo por meio da extinção.

1.8 Perspectiva sistêmica do condicionamento aversivo: Padrões oscilatórios

Até aqui, foram descritos alguns dos mecanismos moleculares e celulares associados com fases da memória como a consolidação, reconsolidação e extinção. No entanto, é importante descrever o que acontece com a manutenção de traços mnemônicos desde uma perspectiva sistêmica. Recentemente foi identificado que os potenciais extracelulares, (também conhecidos como “oscilações neuronais”), em circuitos límbicos medeiam a comunicação entre estruturas associadas com a consolidação e expressão de memórias aversivas (Bocchio et al., 2017). Em particular, a atividade oscilatória da BLA pode ser registrada em diferentes bandas como delta (0.5–4 Hz), teta (4–12 Hz), beta (12–30 Hz) e gama (30–120 Hz), que mudam em relação ao estado comportamental do animal (Buzsaki, 2009). Por exemplo, a sincronia em banda teta entre a BLA e a região CA1 do hipocampo pode ser observada durante a evocação de memórias aversivas (Narayanan et al., 2007). Adicionalmente, o padrão oscilatório da BLA se mostra fundamental na consolidação da memória durante o sono, principalmente durante a fase REM, onde a sincronização direcional na BLA ao córtex pré-frontal e à região CA1 do hipocampo está correlacionada positivamente com a magnitude da expressão da memória na vigília (Popa et al., 2010). O mecanismo que estabelece essas relações oscilatórias inicialmente parece promovido pela indução da LTP em circuitos locais da amígdala, tálamo auditivo e o córtex pré-frontal que formam o engrama para a consolidação e evocação da memória (Nabavi et al., 2014). Uma verificação desse pressuposto foi a indução de congelamento pela atividade induzida (optogenética e quimiogenética) das células ativadas durante o

condicionamento (Yiu et al., 2014). A ativação artificial dessas mesmas células provenientes do condicionamento aversivo foi suficiente para gerar uma aversão condicionada ao contexto (Redondo et al., 2014).

Outros estudos têm mostrado que a sincronia em frequência teta, além da amígdala e do córtex pré-frontal, envolve a região dorsal de CA1 e o córtex temporal onde pode ser verificada correlação em poder espectral e coerência de fase (Seidenbecher et al., 2003; Cambiaghi et al., 2016). O padrão oscilatório não somente se mostra importante na evocação de informação aversivas, mas também faz parte da possibilidade de discriminar entre estímulos seguros e perigosos como descrito anteriormente. Por exemplo, Likhtik e colaboradores (2014) mostraram que um estímulo percebido como seguro (um estímulo não associado com o choque) gera a sincronização em fase da banda teta entre a BLA e o córtex pré-frontal medial, quando comparado com um estímulo percebido como perigoso. Um estudo recente também identificou a sincronização nas bandas baixas da frequência gama (40-70 Hz) entre o córtex pré-límbico e o córtex auditivo primário na presença de um novo estímulo (no caso um tom), direcionando assim a discriminação entre estímulos seguros e perigosos (Concina et al., 2018). Um padrão similar tinha sido previamente relatado nas frequências altas de gama (70-120Hz) durante a discriminação de memórias aversivas. A expressão de congelamento se mostra correlacionada com a sincronia em 4Hz entre a amígdala e o córtex pré-frontal medial, predizendo a expressão de medo (Karalis et al., 2016). Dita sincronia depende da atividade de neurônios principais da amígdala pela coordenação temporal detectada no disparo dessas células com a oscilação em 4Hz (Karalis et al., 2016). Alguns autores têm sugerido que esses 4Hz poderiam estar associados mais ao valor emocional da memória que ao próprio congelamento, tomando em consideração que o mesmo padrão tem sido verificado em memórias apetitivas (Bocchio et al., 2017).

Por outro lado, a extinção tem sido associada com um aumento da sincronização na banda teta entre CA1 e a BLA (Lesting et al., 2011), assim como direcionalmente na mesma banda do cortex pré-frontal medial à BLA (Lesting et al., 2013). Uma sincronia entre frequências também foi identificada durante a extinção, entre o aumento no poder de gama na BLA e o poder de teta no córtex pré-frontal (Stujenske et al., 2014). Além disso, foi sugerido que a inicial potenciação sináptica decorrente do condicionamento na BLA é parcialmente substituída por depotenciação, quando ocorre a diminuição do

congelamento (Maren, 2015). Porém, algumas das células responsivas ao estímulo condicionado mantêm sua atividade mesmo depois da extinção, mostrando que a extinção não é um processo homogêneo e pode influenciar populações neuronais diferentemente (Herry et al., 2008).

Finalmente, a evidência deste tipo de mudanças sistêmicas durante a reconsolidação é bastante escassa. Radiske e colaboradores (2017) mostraram que a reativação na esquiva inibitória aumenta o poder da banda teta no hipocampo dorsal, atividade que foi associada com a detecção de informação conflitante durante a sessão.

Na última seção desta introdução será demonstrado como atividades eletrofisiológicas provenientes de eletroencefalografia e de registros intracranianos, como as aqui descritas, estão sendo de utilidade para a implementação de novas técnicas de análise, assim como predição de respostas comportamentais e possíveis intervenções de circuito fechado na aqui denominada *psiquiatria de precisão*.

1.9 Muito além da farmacologia: Presente e futuro da psiquiatria de precisão

Historicamente a farmacologia e a psicoterapia convergem de maneira central no campo do tratamento dos transtornos mentais. No entanto, mesmo com o desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos com menos efeitos adversos, e tratamentos terapêuticos baseados em evidências científicas, os transtornos mentais continuam sendo um desafio para a medicina com amplo impacto econômico e social na sociedade moderna.

O termo, psiquiatria de precisão, foi sugerido para propor novos sistemas de pesquisa e intervenções que consigam atingir as psicopatologias de forma objetiva (Gandal et al., 2016). A proposta pretende converter a psiquiatria, com tecnologia de ponta, equiparável a outras disciplinas médicas que possuem ferramentas de diagnósticos precisos que direcionam os tratamentos mais efetivos (Fernandes et al., 2018). Hoje parece pouco razoável optar por alternativas diferentes para pacientes que precisam reposição de insulina durante a diabetes, mas quando um paciente relata sintomas que se assemelham a depressão ou trauma, resulta difícil testes adicionais para corroborar que o diagnóstico correto seria, de fato, depressão ou TEPT e selecionar o tratamento mais adequado. O modelo clínico da psiquiatria se baseia de forma geral na prescrição farmacológica que

pode ser ou não efetiva, além de ser necessário um monitoramento rigoroso das reações do paciente como ajustes de doses e remanejamento medicamentoso, inclusive trocar de fármaco se não resulta adequado ao caso particular (Luo et al., 2018). A psicoterapia, mesmo que não invasiva, mostra um esquema similar onde diferentes aproximações terapêuticas estão disponíveis e algumas podem se ajustar melhor que outras dependendo da patologia do paciente (Marwood et al., 2018) assim como fatores tão imprevisíveis como crenças do paciente ao respeito da psicoterapia, características de personalidade e o estabelecimento de uma relação terapêutica adequada durante as sessões (Sierra e Hyland, 2014). Psicofarmacologia e psicoterapia devem cruzar por caminhos iguais, no que se refere a tentativa e erro, até encontrar as variáveis e condições que podem proporcionar melhora clínica significativa.

Este cenário parece piorar se consideramos que a comorbidade é a regra e não a exceção (Nabavi et al., 2015), pois de fato tem sido proposto que existem marcadores generalizáveis entre psicopatologias que sustentam uma base comum transdiagnóstica das doenças mentais (Gong et al., 2018). Alguns autores sugerem que a psicopatologia pode ser entendida como um construto de diferentes componentes que podem dizer quão disfuncional é o paciente independente de um diagnóstico restrito. O construto tem sido chamado de “fator p” que relembra o chamado “fator g” de inteligência geral (Caspi et al., 2014). No entanto, o padrão de diagnóstico continua se fundamentando em limites estreitos entre critérios diagnósticos para gerar sistemas de classificação que em poucas vezes se correspondem com a realidade. Esses problemas têm levado a novas propostas como o RDoC, previamente mencionado, que muito além de classificar, pretendem analisar as doenças mentais como um espectro com correlatos neurais que estão finalmente começando a ser identificados (Kose e Cetin, 2017).

Assim, qual seria o futuro de uma psiquiatria objetiva? Defensores dessa perspectiva propõem a convergência de técnicas para estabelecer marcadores biológicos confiáveis para os transtornos psiquiátricos, integrando áreas como a genética, epigenética, proteômica, neurociências, psicologia clínica e cognitiva, dentre outras. Essa é a base de pesquisa da psiquiatria de precisão. Os dados coletados devem ser analisados não somente com as ferramentas estatísticas clássicas, mas também devem buscar a implementação de modelos de aprendizado de máquina e inteligência artificial com o intuito de gerar

modelos preditivos que permitam um tratamento personalizado e sua subsequente previsão do curso da psicopatologia (Gandal et al., 2016; Fernandes et al., 2017).

Inicialmente a perspectiva parece muito promissória, mas qual é a realidade atual e o caminho construído para uma psiquiatria objetiva? Dados provenientes de eletroencefalografia (EEG) e imagem com fMRI têm sido utilizados como preditores de resposta ao tratamento farmacológico (Iosifescu, 2011). No caso do EEG, múltiplos sinais provenientes de eletrodos colocados no escalpo podem coletar a atividade somatória de centenas de neurônios próximos do eletrodo no córtex encefálico. Esses sinais podem ser expressos como ritmos oscilatórios localizados em diferentes bandas (delta, teta, alfa, gama) que por sua vez geram um “poder”. Estudos iniciais com pacientes diagnosticados com depressão maior mostraram que o aumento de atividade na banda alfa, em regiões parietais e occipitais, no início do tratamento com antidepressivos tricíclicos (clomipramina e maprotilina), foi associado com significativa resposta ao tratamento 3 semanas depois (Ulrich 1988; 1994). De forma similar, Bruder e colaboradores (2008) mostraram que pacientes que responderam adequadamente ao tratamento com fluoxetina tinham um aumento basal de poder na banda alfa em regiões occipitais comparado com pacientes não tratados e tratados sem resposta clínica.

Outros estudos encontraram marcadores eletroencefalográficos no córtex pré-frontal. Por exemplo, Iosifescu e colaboradores (2009) mostraram que o poder relativo na banda teta pode prever se o paciente será responsivo ou não ao tratamento com ISRS. A predição da efetividade atingiu um percentual de 63% de precisão após 8 semanas; no entanto, com apenas 1 semana, já era possível determinar se o tratamento seria efetivo ou não com uma precisão de 60%. No mesmo estudo, usando como preditores as oscilações alfa e beta em conjunto, demonstrou-se uma precisão de 70% na predição com tratamentos antidepressivos em 82 pacientes.

Os estudos utilizando EEG como medida objetiva para determinar curso e resposta de doenças mentais, na atualidade, têm como aliado o processamento massivo de dados gerados por algoritmos de aprendizado automático (Wade e Iosifescu, 2016). Como parte das especialidades da inteligência artificial, o aprendizado automático pode processar grandes números de dados e encontrar relações entre os mesmos, que podem ser imperceptíveis pelo olho humano e pouco sensitivos ao escrutínio oferecido pela

estatística tradicional (Bzdok et al., 2018). Os avanços desses sistemas de análise junto com o desenvolvimento do aprendizado profundo, estão permitindo um novo paradigma de pesquisa que pode ser chamado de “pesquisa dirigida por dados”. Neste sentido, e em contraste com os padrões clássicos do método científico, as hipóteses surgem após a análise inicial dos dados (Vu et al., 2018).

Um exemplo interessante é o caso do projeto “Registro Psiquiátrico de Avaliação Eletrofisiológica” (em inglês, *Psychiatric Electroencephalography Evaluation Registry*). A iniciativa teve por objetivo extrair características preditivas sobre a origem e tratamento de 3.671 pacientes com diversos diagnósticos psiquiátricos, nos quais se incluíam pacientes com e sem medicação, assim como a progressão e o tipo de tratamento (Debattista et al., 2011; Rush et al., 2006). Os modelos preditivos provenientes desta aproximação foram utilizados para guiar o tratamento de 114 pacientes diagnosticados com depressão durante 12 semanas. O estudo mostrou que a seleção farmacológica como resultado da comparação do EEG do paciente com o banco de dados foi superior que o tratamento guiado de forma convencional, utilizando duas escalas diferentes de depressão (Debattista et al., 2011).

Uma aproximação similar foi utilizada para prever a responsividade ou não de 10 pacientes diagnosticados com depressão maior ao tratamento com estimulação de corrente direta transcraniana. Baseado no poder espectral de bandas delta, teta, beta e gama, a classificação foi bem sucedida em 8 dos 10 participantes. Os algoritmos (máquina de suporte vectorial, máquina de aprendizado extremo e análise linear de discriminação) encontraram que o melhor preditor de estado emocional nos pacientes era a atividade alfa em eletrodos posicionados no córtex frontal (Al-Kaysi et al., 2017). Adicionalmente, registros provenientes de pacientes epiléticos submetidos a implante de eletrodos intracranianos, tem sido utilizado para decodificar com sucesso estados emocionais. Por meio de uma “escala de estado de ânimo imediata” que permite conhecer estados de ansiedade e depressão em momentos particulares, junto com o registro eletrofisiológico no momento que a avaliação é realizada, foi possível construir um modelo para cada paciente (9 no total) que foi capaz de prever o estado de ânimo em ensaios subsequentes. Neste caso, o modelo foi treinado com mudanças de poder em bandas delta, alfa, beta e gama em cada uma das regiões implantadas que cobriam estruturas importantes

relacionadas ao processamento emocional, entre elas, a amígdala, o córtex cingulado e o hipocampo (Sani et al., 2018).

Importantes pesquisas semelhantes realizadas com fMRI deram origem ao termo de “psico-radiologia”, aqui entendido como uma área emergente que pretende apoiar o diagnóstico e tratamento psiquiátrico com base na informação neurobiológica extraída destas técnicas de imagem (Lui et al., 2016) (aos interessados, um site informativo foi criado, dedicado a essa área de pesquisa; <https://radiopaedia.org/articles/psychoradiology>). Recentemente, Tolmeijer e colaboradores (2018) mostraram que atividades em áreas frontais e límbicas, associadas com o processamento de faces mostrando agressividade ou felicidade, pode prever o resultado favorável ou não de terapias cognitivo-comportamentais para sintomas psicóticos e afetivos, em pacientes com risco de crises psicóticas. No caso por exemplo do TEPT, um estudo recente usando fMRI, mostrou que uma análise de reconhecimento de padrões que pode classificar pacientes com a) TEPT, b) TEPT do subgrupo dissociativo e c) pacientes sadios, com uma precisão de 91,63%, utilizando a média da amplitude de oscilações de baixa frequência e padrões de conectividade da amígdala (Nicholson et al., 2018). Os dados podem ser úteis na detecção de fenótipos vulneráveis ao TEPT, assim como na estimação da probabilidade de desenvolvimento do transtorno.

No caso de modelos animais, sob o viés translacional, esses novos tipos de análise se alinham com a possibilidade de intervenções invasivas na busca de tratamentos personalizados e sob demanda no futuro. Usando o modelo de suspensão pela cauda, Carlson e colaboradores (2017) coletaram registros eletrofisiológicos no núcleo accumbens, córtex infralímbico e pré-límbico, tálamo medial-dorsal, VTA, amígdala e o hipocampo dorsal. Para ilustrar este exemplo, um algoritmo de regressão linear foi treinado com os dados do poder espectral de cada estrutura assim como a coerência entre elas. Os resultados mostraram que uma diminuição na conectividade entre o córtex infralímbico e o tálamo medial dorsal foi diretamente associado ao aumento da imobilidade no teste comportamental. O reestabelecimento dessa conectividade por meio de uma estimulação optogenética de circuito fechado reestabeleceu a mobilidade durante o teste (diminuição da desesperança aprendida.).

Em um experimento subsequente do mesmo grupo, foi utilizado um modelo animal também de depressão chamado de “submissão ou derrota social”, que é baseado no estresse crônico induzido pela probabilidade de agressão de outro animal. Por meio de um “electoma”, que constrói um modelo baseado na atividade eletrofisiológica de áreas límbicas, foi possível classificar animais como vulneráveis ou resilientes ao estresse (Ver Figura 4). De forma interessante, o padrão eletrofisiológico dos animais classificados como vulneráveis muda com o tratamento de cetamina, uma alternativa farmacológica com resultados sólidos em sintomas de depressão em população clínica (Hultman et al., 2018).

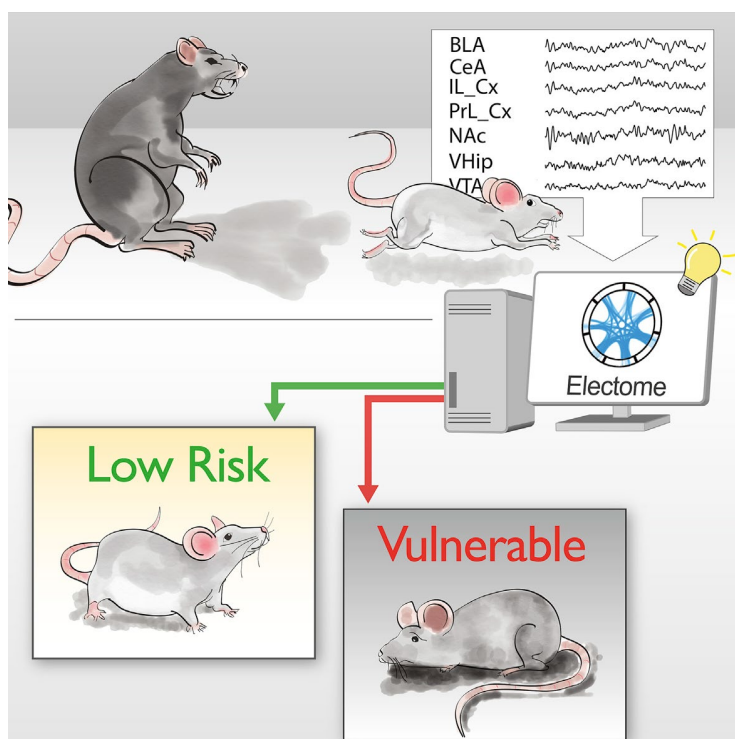


Figura 4: Modelo de electoma para avaliar fenótipos vulneráveis e resilientes ao estresse. O modelo utilizou o poder espectral e coerência entre estruturas de diferentes regiões do cérebro: BLA, amígdala basolateral; CeA, amígdala central; IL_Cx, córtex infralímbico; PrL_Cx, córtex pré-límbico; NAc, núcleo accumbens; VHip, hipocampo ventral; VTA, área tegmental ventral. Os registros foram realizados com múltiplos eletrodos nestas estruturas mencionadas e o potencial de campo extraído para cada canal utilizado. Os animais foram submetidos a um modelo de derrota social, e os registros eletrofisiológicos provenientes da reação do animal ao evento estressante, permitiu gerar perfis de animais que subsequentemente mostraram vulnerabilidade ou resiliência a desenvolver comportamentos de tipo depressivo. Em experimentos posteriores, foi

possível prever se o animal seria no futuro vulnerável ou resiliente só com os registros coletados durante a exposição ao estressor. Imagem retirada de (Hultman e colaboradores (2018).

Também em um modelo de intervenção de circuito fechado, mas sem utilizar modelos de aprendizado de máquina, Wu e colaboradores (2018) conseguiram detectar um marcador associado com a impulsividade por comida em camundongos. O aumento de poder na banda delta no núcleo accumbens foi associado com a antecipação à ingestão de comida altamente palatável. A detecção em tempo real no aumento de poder nesta banda, foi subsequentemente utilizado como um marcador para desencadear a estimulação elétrica do núcleo accumbens inibindo dito aumento. O resultado foi a inibição da resposta do animal pela comida palatável.

Como observou-se neste breve resumo de alguns dos experimentos mais importantes desta área. A psiquiatria, levando em consideração a pesquisa básica a aplicada, encontra-se a caminho da transformação de um modelo randômico farmacológico para um modelo transdiagnóstico e personalizado que consiga avaliar a doença do paciente como um deterioro em vários domínios emocionais e cognitivos e fazer tratamentos de alta precisão, indo muito além de uma classificação com limites predefinidos.

Neste trabalho também será mostrado um exemplo de como o aprendizado de máquina, no caso, não supervisionado, pode ser utilizado em comportamento como forma de análise e validação de hipóteses.

Importante: Todos os procedimentos aqui realizados estiveram estritamente de acordo com a resolução normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) no 25 de 2015, para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Igualmente com as normativas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da International Brain Research Organization (IBRO) e do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), bem como em acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS.

2. Objetivos

“Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats”. Artigo publicado na revista *Scientific Reports*

2.1 Objetivo Geral

Identificar os efeitos da administração sistêmica de cafeína na expressão de memórias aversivas ao contexto, quando administrada concomitante com uma sessão única de reativação ou reativações periódicas da memória.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Verificar os efeitos da administração sistêmica de cafeína (20mg/kg) antes ou depois de uma sessão única de reativação da memória após um condicionamento com intensidade de treino moderada (4 choques de 0.4mA).
- 2.2.2 Verificar os efeitos da administração sistêmica de cafeína (20mg/kg) antes ou depois de uma sessão única de reativação da memória após um condicionamento com intensidade de treino forte (4 choques de 0.7mA).
- 2.2.3 Verificar se o protocolo descrito no objetivo específico 2.2.2, poderia se beneficiar da reativação periódica da memória (3 sessões) junto com a administração de cafeína (20mg/kg).
- 2.2.4 Investigar se o efeito da administração com cafeína (20mg/kg) concomitante com a reativação periódica da memória poderia ter os mesmos efeitos em fêmeas.
- 2.2.5 Avaliar se a dose de cafeína utilizada (20mg/kg) possui efeitos reforçadores ou de aversão durante um condicionamento por preferência de local.

- 2.2.6 Verificar o efeito motor e na ansiedade induzida pela administração única de cafeína (20mg/kg) avaliado na tarefa de campo aberto.
- 2.2.7 Verificar os efeitos da administração sistêmica de cafeína (20mg/kg) antes de uma sessão única de reativação da memória após um condicionamento com intensidade de treino muito forte (4 choques de 1mA).
- 2.2.8 Avaliar os efeitos no protocolo do objetivo específico 2.2.7 realizando reativações periódicas da memória.
- 2.2.9 Verificar o efeito da administração de cafeína (20mg/kg) antes de uma sessão de reativação no CAC 43 dias após o treino para avaliação da memória remota.
- 2.2.10 Avaliar os efeitos no protocolo do objetivo específico 2.2.9 realizando reativação periódica.

“Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down systems consolidation”. Artigo publicado na revista *Translational Psychiatry*

2.3 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração crônica de fluoxetina na generalização de memórias aversivas ao CAC e sua possível interação com o subsequente processo de extinção.

2.3.1 Objetivos específicos

- 2.3.1.1 Avaliar os efeitos da administração crônica de fluoxetina (21 dias; 10mg/kg) na generalização da memória contextual e a subsequente extinção e recuperação espontânea.
- 2.3.1.2 Avaliar os efeitos da administração crônica de citalopram (21 dias; 10mg/kg) na generalização da memória contextual e a subsequente extinção e recuperação espontânea.
- 2.3.1.3 Avaliar os efeitos motores e na ansiedade após da administração crônica de fluoxetina (21 dias; 10mg/kg).
- 2.3.1.4 Verificar os efeitos da administração crônica de fluoxetina (21 dias; 10mg/kg) na extinção e recuperação espontânea quando iniciada depois do protocolo de extinção.
- 2.3.1.5 Verificar a dependência hipocampal na evocação da memória por meio da inativação farmacológica temporária com muscimol (1µg/µl) pré-teste na região dorsal do hipocampo, após da administração crônica de fluoxetina (21 dias; 10mg/kg).
- 2.3.1.6 Avaliar a morfologia dos espinhos dendríticos do hipocampo dorsal por meio da técnica DiI após da administração crônica de fluoxetina (21 dias; 10mg/kg).
- 2.3.1.7 Estabelecer a relação entre generalização da memória e a subsequente extinção em população não tratada.

3. Manuscritos

3.1 “Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats”. Artigo publicado na revista *Scientific Reports*

SCIENTIFIC REPORTS



Correction: Author Correction

OPEN

Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats

Lizeth K. Pedraza^{1,3}, Rodrigo O. Sierra^{1,2}, Fernanda N. Lotz² & Lucas de Oliveira Alvares^{1,3}

In the last decade, several studies have shown that fear memories can be attenuated by interfering with reconsolidation. However, most of the pharmacological agents used in preclinical studies cannot be administered to humans. Caffeine is one of the world's most popular psychoactive drugs and its effects on cognitive and mood states are well documented. Nevertheless, the influence of caffeine administration on fear memory processing is not as clear. We employed contextual fear conditioning in rats and acute caffeine administration under a standard memory reconsolidation protocol or periodical memory reactivation. Additionally, potential rewarding/aversion and anxiety effects induced by caffeine were evaluated by conditioning place preference or open field, respectively. Caffeine administration was able to attenuate weak fear memories in a standard memory reconsolidation protocol; however, periodical memory reactivation under caffeine effect was necessary to attenuate strong and remote memories. Moreover, caffeine promoted conditioned place preference and anxiolytic-like behavior, suggesting that caffeine weakens the initial learning during reactivation through counterconditioning mechanisms. Thus, our study shows that rewarding and anxiolytic effects of caffeine during fear reactivation can change the emotional valence of fear memory. It brings a new promising pharmacological approach based on drugs widely used such as caffeine to treat fear-related disorders.

Exposure to strong aversive experiences can lead to the formation of enduring traumatic memories, which can trigger many debilitating psychiatric disorders including posttraumatic stress disorder (PTSD) and phobias. In recent years, novel therapeutic strategies that target memory reconsolidation have emerged with promising results to attenuate persistent fear memories. This paradigm involves the transient labilization of the memory trace induced by a retrieval/reactivation session that makes the original memory susceptible to pharmacological and behavioral modifications¹⁻³. In animal models, this window of opportunity has been explored by systemic and central administration of different drugs such as protein synthesis inhibitors⁴, blockers of the mammalian target of rapamycin⁵, specific antagonists of NMDA and adrenergic receptors^{6,7}, among others. Except for some pharmacological agents used in preclinical studies, for instance propranolol^{8,9} and ketamine¹⁰, most reconsolidation inhibiting agents are not approved for human testing.

Memory labilization and reconsolidation are not general processes and depend on "boundary conditions"^{11,12}. This concept has been used to describe parameters that act as limiting factors for memory to undergo reconsolidation¹². For instance, both high training intensity and old memory traces are less susceptible to attenuation^{13,14}. Given the difficulty in targeting memory reconsolidation in some boundary conditions, another strategy to inhibit fear expression is the enhancement of fear extinction¹⁵. During extinction, the fear conditioned reminders are repeatedly presented in the absence of footshocks, leading to a progressive reduction of fear expression. Currently, there is a significant need to develop novel pharmacological approaches to accelerate clinical interventions based on reconsolidation disruption or extinction enhancement for fear-related disorders.

Caffeine is one of the most popular legal psychoactive drugs in the world. In the U.S alone, approximately 85% of adults consume caffeine¹⁶, mainly, but not exclusively through coffee consumption. Caffeine is a non-selective

¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Biophysics Department, Biosciences Institute, 91.501-970, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ³Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, 90.046-900, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Lizeth K. Pedraza and Rodrigo O. Sierra contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.K.P. (email: pedraza.lk@hotmail.com) or L.d.O.A. (email: lucas.alvares@ufrgs.br)

antagonist of adenosine receptors. It is thought that the primary behavioral effect of caffeine is caused by the blockage of the A1 and A2A adenosine receptors^{17–19}. Also, caffeine interferes with several adenosinergic regulation processes, including intracellular Ca²⁺ release, inhibition of phosphodiesterases (PDEs), and GABA-A receptors neurotransmission²⁰. Numerous studies have addressed the effect of caffeine on memory. Nevertheless, conflicting reports reveal that caffeine may enhance or disrupt memory acquisition, consolidation and retrieval across a variety of fear memory tests^{21–26}.

On the other hand, caffeine promotes place preference or aversion in a dose-dependent way²⁷ and increases the extracellular levels of dopamine and glutamate in the Nucleus Accumbens Shell²⁸. Moreover, there are several mixed results showing that acute caffeine injection induces either anxiolytic or anxiogenic-like behaviors in a large range of doses^{29–32}.

Despite these several evidence showing that caffeine administrations affect contextual fear conditioning, no studies were performed to evaluate the effects of acute caffeine administration on fear memory reconsolidation to date. Here, we explored for the first time the effect of caffeine administration as a pharmacological strategy to attenuate contextual fear memory in rats.

Material and Methods

Subjects. Naïve, male and female Wistar rats (270–320 g/3 months) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, 4 per cage, under a 12-h light/dark cycle at a constant temperature of 24 °C, with water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with local and national guidelines for animal care (Federal Law no 11.794/2008), and the project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Drugs. Caffeine was dissolved in 0.9% sterile saline to obtain the final concentration of 20 mg/kg, based on previous studies^{21,22}. Caffeine or vehicle (saline) were administered via intraperitoneal injection (i.p.) in a volume of 1 ml/kg. We used i.p. instead of oral administration in order to guarantee a more precise control regarding both the amount of caffeine received per animal and the exact timing each animal received the treatment before the reactivation sessions.

Behavioral procedure. *Contextual Fear Conditioning (CFC).* Along with the experiments, animals were transported from the colony to the holding room. After 30-min of habituation, subjects were moved individually to the experimental chamber and then back to their home cages. The conditioning chamber consisted of an illuminated plexiglas box, 25 × 25 cm, with a metallic grid floor. During training, rats were placed in the chamber for 3-min and then received three possible training protocols: weak training (4 footshocks of 0.4 mA/2 s), strong training (4 footshocks of 0.7 mA/2-s) and very strong training (8 footshocks of 1.0 mA/2-s). Every 4 footshocks were separated by a 30-s interval; animals were kept in the conditioning environment for additional 30-s before returning to their homecages. These training protocols were used based on a previous study³³.

Reactivation sessions. Subjects were re-exposed to the training context at different time intervals depending on the experiment performed, without the US (footshocks) for 5-min. Caffeine or vehicle (saline) was administered 30-min before reactivation sessions.

Test Session. Animals were tested for 4-min in the training context 24-h or 6 days after the last reactivation, depending on the experiment performed.

Conditioned Place Preference (CPP). The conditioning box consisted of three chambers, two for the conditioning session with same dimensions (24 × 40 × 50 cm), and the other central/start chamber (10 × 40 × 50 cm). Each chamber was adapted with particular contextual cues and floor texture. The floor of the conditioning chambers was divided into 9 equal rectangles or “sectors” in order to evaluate locomotion along with conditioning and test sessions.

Conditioned place preference consisted of three phases: pre-conditioning (day 1), conditioning (days 2–6) and test (day 7). Animals were injected with vehicle or caffeine before each conditioning session and placed in the chamber associated with the treatment (vehicle or caffeine). The pre-conditioning session (15-min) was intended to reduce novelty and determine initial preferences for any of two chambers using the time spent in each compartment. In case of individual pre-conditioning preferences, conditioning took place in the opposite chamber. For the following 5 days conditioning sessions were performed. Conditioning consisted of pairing one chamber with the injection of caffeine and the other one with the injection of vehicle; animals were in the chamber for 25-min. Animals were submitted to two conditioning sessions a day, for 5 days, separated by a 6–8-h interval between sessions, and received alternating injections of vehicle or caffeine depending on the session. Drug paired-chamber and injection order were counterbalanced across the rats. A 15-min test in the absence of vehicle or caffeine administration was conducted 24-h after the last conditioning day.

Open Field (OF). The open field chamber consisted of a 50 cm height, 60 × 40 cm plywood box and a linoleum floor divided into 12 equal rectangles or “sectors.” In addition, floor was divided into two squares, which allowed the definition of central and peripheral areas. During the experiment, a white room light of ~22 lux was equally distributed into the chamber. The behavior was recorded by video tracking and processed offline. Animals were injected with vehicle or caffeine 30-min before open field exposition. During the 5-min test session, crossings between sectors (locomotor activity) and the time spent in the periphery and center of the apparatus were measured.

Behavioral Scoring. In all fear conditioning experiments, freezing behavior was registered in real time using a stop-watch and by an experienced observer who was blind to the treatments. Freezing was defined as a tense body posture that resulted from a defensive state with the absence of any movements, except those related to breathing³⁴.

During Conditioned Place Preference, the time spent in each chamber was measured and their results were expressed using a preference index (caffeine-paired chamber/caffeine-paired chamber + vehicle-paired chamber). Motor performance was evaluated based on the number of crossings through the sectors.

In the open field test, the number of crossings was considered a measure of motor performance, while the time spent in the center or periphery of the field was considered anxiolytic or anxiogenic responses induced by the treatment, respectively.

Statistical analysis. After checking for normality (Kolmogorov-Smirnov Test) and Homoscedasticity (Levene test), data were analyzed by repeated measures ANOVA followed by Fisher (LSD) *post hoc* test or independent *t*-student test, with significance set at $p < 0.05$.

Results

Caffeine administration attenuates weak fear memories expression under a classical memory reconsolidation protocol. Memory reconsolidation can be affected by pharmacological treatments administered before or after memory reactivation^{4,35}. We have previously shown that memory reactivation for 3 to 5-min undergoes memory reconsolidation^{2,36,37}. First, we evaluated the effects of systemic caffeine administration before a standard memory reconsolidation protocol. Animals were submitted to weak contextual fear conditioning (CFC) training (4 footshocks of 0.4 mA/2-s) on day 1 and injected systemically with vehicle or caffeine 20 mg/kg, 30-min before memory reactivation on day 3, and tested 24-h later in a drug-free condition. An additional group of animals was submitted to the same protocol; however, they were non-reactivated on day 3. Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,11} = 15.077$, $p = 0.002$) but not for time factor (reactivation vs. test) ($F_{1,11} = 0.130$, $p = 0.724$) or for treatment x time interaction ($F_{1,11} = 0.750$, $p = 0.404$). Post-hoc analysis showed that caffeine-treated animals expressed less freezing during reactivation and test compared to control ($p < 0.05$). No differences were found in non-reactivated animals ($t(18) = -0.332$; $p = 0.743$, independent *t*-test) (Fig. 1a). This result suggests that standard reconsolidation protocols concomitant with caffeine administration are able to attenuate weak fear memories. Notably, if caffeine was administered immediately after the reactivation session, it did not affect memory expression in the test: Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of time factor (reactivation vs. test) ($F_{1,11} = 6.202$, $p = 0.030$) but not for treatment factor ($F_{1,11} = 0.093$, $p = 0.765$) and time x treatment (vehicle vs. caffeine) interaction ($F_{1,11} = 1.429$, $p = 0.256$) (Fig. 1b). This result raised the possibility that endogenous state triggered by caffeine administrations before memory reactivation may be a necessary condition to promote fear attenuation.

Periodical memory reactivation under caffeine administration attenuates strong fear memory expression. It has been shown that memory strength is a critical constraint that limits the effectiveness of fear expression reduction^{11,13}. That is, high training intensity induces a boundary condition that prevents reconsolidation interference. In order to evaluate whether caffeine would also be effective at disrupting fear memory reconsolidation in a stronger training condition, animals were fear-conditioned in a higher intensity protocol (4 footshocks of 0.7 mA/2 s). Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of time factor (reactivation vs. test) ($F_{1,9} = 21.856$, $p = 0.001$) and time x treatment (vehicle vs. caffeine) interaction ($F_{1,9} = 12.054$, $p = 0.007$) but not for treatment factor ($F_{1,9} = 1.557$, $p = 0.243$). Post-hoc analysis showed that there were no differences between groups during reactivation and test sessions ($p > 0.05$) (Fig. 2a). This result indicated that memory strength is a limiting factor for caffeine efficacy.

Previous experiments of our lab showed that 3-time memory reactivation was able to maintain memory precision³⁸ and was effective in modifying the emotional valence of contextual fear memory when associated with rewarding stimuli⁵. Based on these reports, next we evaluated whether additional reactivation sessions associated with caffeine administration would be able to attenuate fear memory in the strong training protocol. Animals were fear-conditioned as described above and were reactivated once a week for 3 weeks. Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,10} = 21.579$, $p < 0.001$) and time factor (reactivation vs. test) ($F_{3,30} = 8.343$, $p < 0.001$) but not for treatment x time interaction ($F_{3,30} = 0.554$, $p = 0.649$). Post-hoc analysis showed that with the exception of reactivation 1 ($p = 0.082$), caffeine-treated animals expressed less freezing in the remaining reactivation sessions (2 and 3) ($p < 0.05$) and during the test session ($p < 0.05$) (Fig. 2b). Taken together, these results showed that additional reactivation sessions under the effect of caffeine disrupted strong contextual fear memory during reactivations (on-caffeine) and test (off-caffeine).

It is well established that males and females respond differently to threat stimuli. For instance, fear-conditioning studies performed in females found less freezing behavior to conditioned stimulus compared to males³⁹. Interestingly, sex differences have been associated with individual vulnerability to stress-related disorders such as PTSD⁴⁰. However, most of the fear conditioning studies evaluating the neurobiological mechanism underpinning stress responses have been performed mainly in male rodents. In order to evaluate periodical memory reactivation under the effect of caffeine in females, rats were injected and reactivated 3 times using the strong training protocol, as described above in males. Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,15} = 19.691$, $p < 0.001$), time factor (reactivation vs. test) ($F_{3,45} = 22.472$, $p < 0.001$), and treatment x time interaction ($F_{3,45} = 5.756$, $p = 0.002$). Post-hoc analysis showed that caffeine-treated animals expressed less freezing compared to the control group ($p < 0.01$) in reactivation

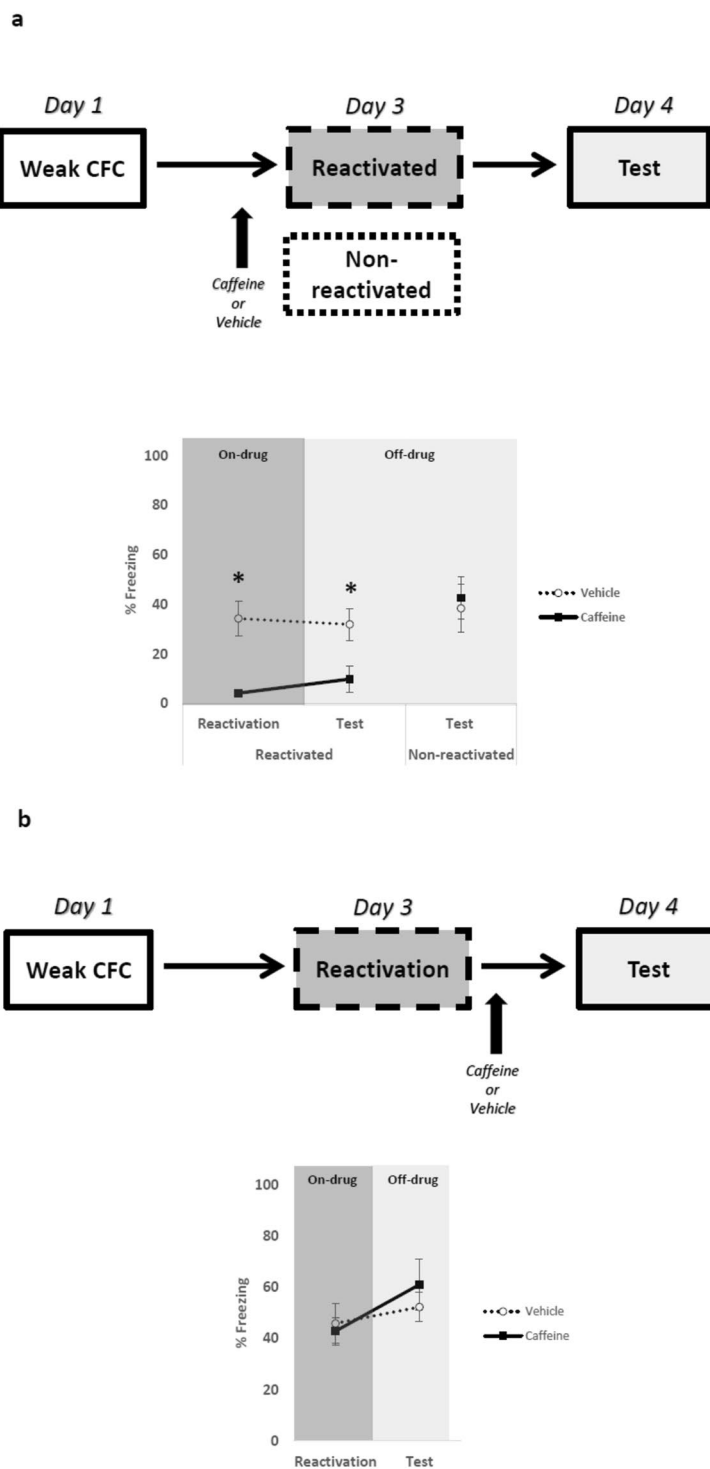


Figure 1. Caffeine administration before but not after single memory reactivation is able to attenuate weak fear memories. The graphs show percent of freezing time expressed as mean \pm SEM, and experimental design is shown at the top of each panel; **(a)** Caffeine administration reduces freezing behavior during test with only one memory reactivation after weak training (Vehicle $n = 7$ and Caffeine $n = 6$). The same performance was not achieved in non-reactivated animals (Vehicle $n = 10$ and Caffeine $n = 10$); **(b)** In addition, there is no effect of caffeine with post-reactivation administration (Vehicle $n = 6$ and Caffeine $n = 7$). * $p < 0.05$, Repeated Measures ANOVA followed by *post hoc* test.

sessions 1 and 2. However, these differences were not detected during reactivation 3 and in the test session ($p > 0.05$). Moreover, there was a significant difference within group in animals injected with vehicle throughout the reactivations and test session ($p < 0.05$), suggesting an accelerated extinction process in females (Fig. 2c).

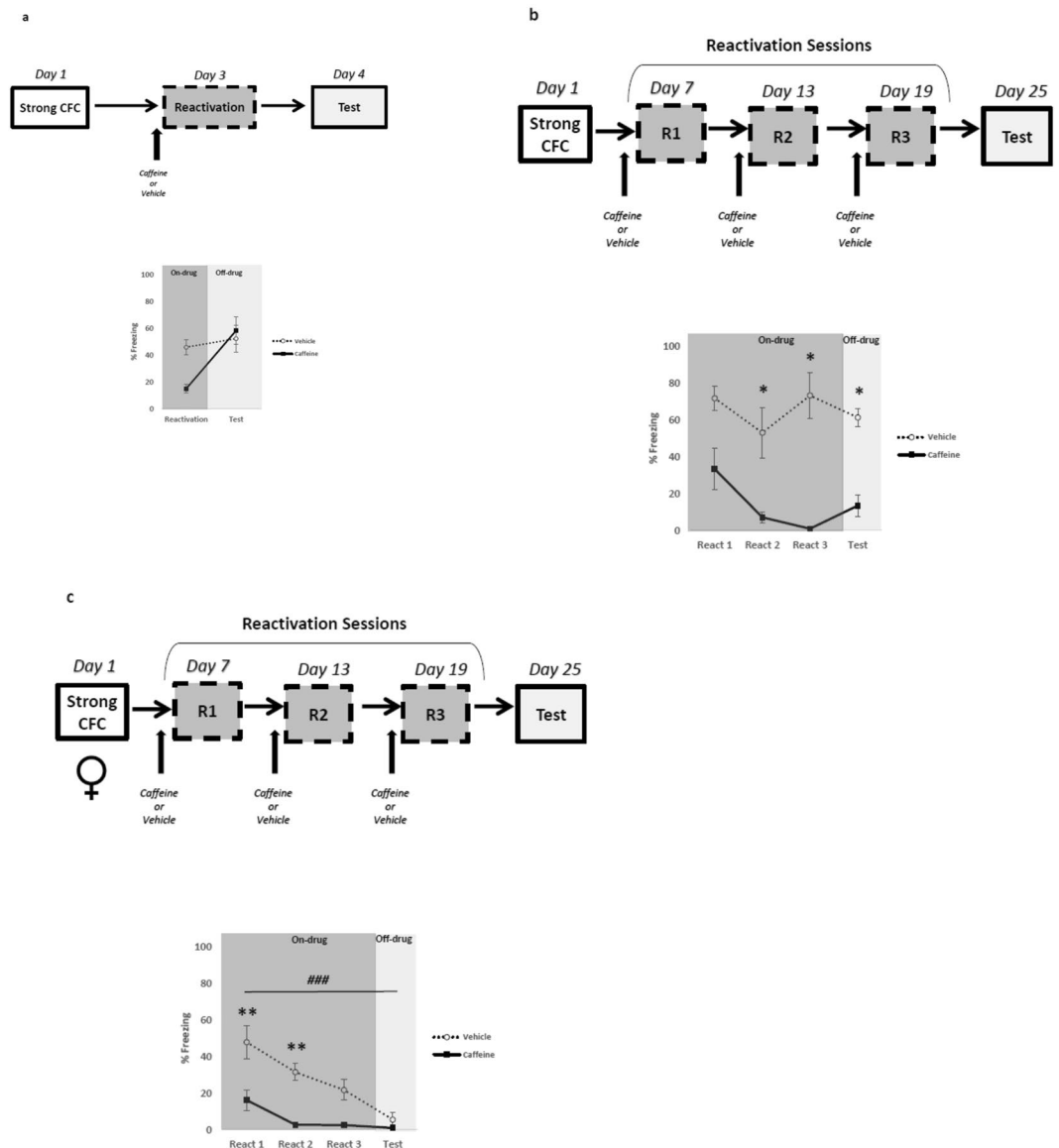


Figure 2. Caffeine administration concomitant with periodical memory reactivation attenuate strong fear memories. The graphs show percent of freezing time expressed as mean \pm SEM, and experimental design is shown at the top of each panel; (a) The single-reactivation approach fails in strong memories (Vehicle $n = 7$ and Caffeine $n = 7$); (b) Periodical memory reactivation (3 reactivations, 1 per week) under caffeine administration reduces freezing behavior during the reactivation sessions (on-drug) and test (off-drug) in strong memories (Vehicle $n = 6$ and Caffeine $n = 6$); (c) Caffeine administration during reactivation reduces freezing behavior in *females* (Vehicle $n = 8$ and Caffeine $n = 9$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ - Repeated Measures ANOVA followed by *post hoc* test. *Differences between groups; #Differences within groups.

Caffeine administration induces conditioned place preference and anxiolytic response in the open field.

It has been shown that fear memory may be reinterpreted to a less aversive level by updating it during reactivation with appetitive stimulus³, a pharmacological agent such as morphine², or by preventing freezing expression with an air puff distractor⁴¹. In order to verify if the effects observed in fear memory disruption are mediated by a possible positive valence stimulus triggered by caffeine during reactivation, we tested its rewarding effect in the conditioned place preference (CPP). Indeed, previous studies have shown that caffeine administration induces place preference in a dose-dependent way^{27,42}. In order to address whether the dose used here causes place preference, animals were habituated to CPP and exposed to the conditioning chambers during 5 days (twice per day) with previous administration of vehicle or caffeine. Test session was conducted in a drug-free condition (see Material and Methods for details). Repeated-measure ANOVA revealed significant effects for treatment \times time interaction ($F_{1,16} = 6.131$, $p = 0.024$) but not for treatment (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,16} = 1.730$, $p = 0.206$) and time (pre-conditioning vs. test) ($F_{1,16} = 0.211$, $p = 0.652$) factors. Post-hoc analysis showed no initial preference during pre-conditioning session between contexts ($p > 0.05$). Indeed, only 27.7% (5 of 18) of our animals showed initial preferences for one context (upper to 0.55 or lower to 0.45 index preference). However, during test, the

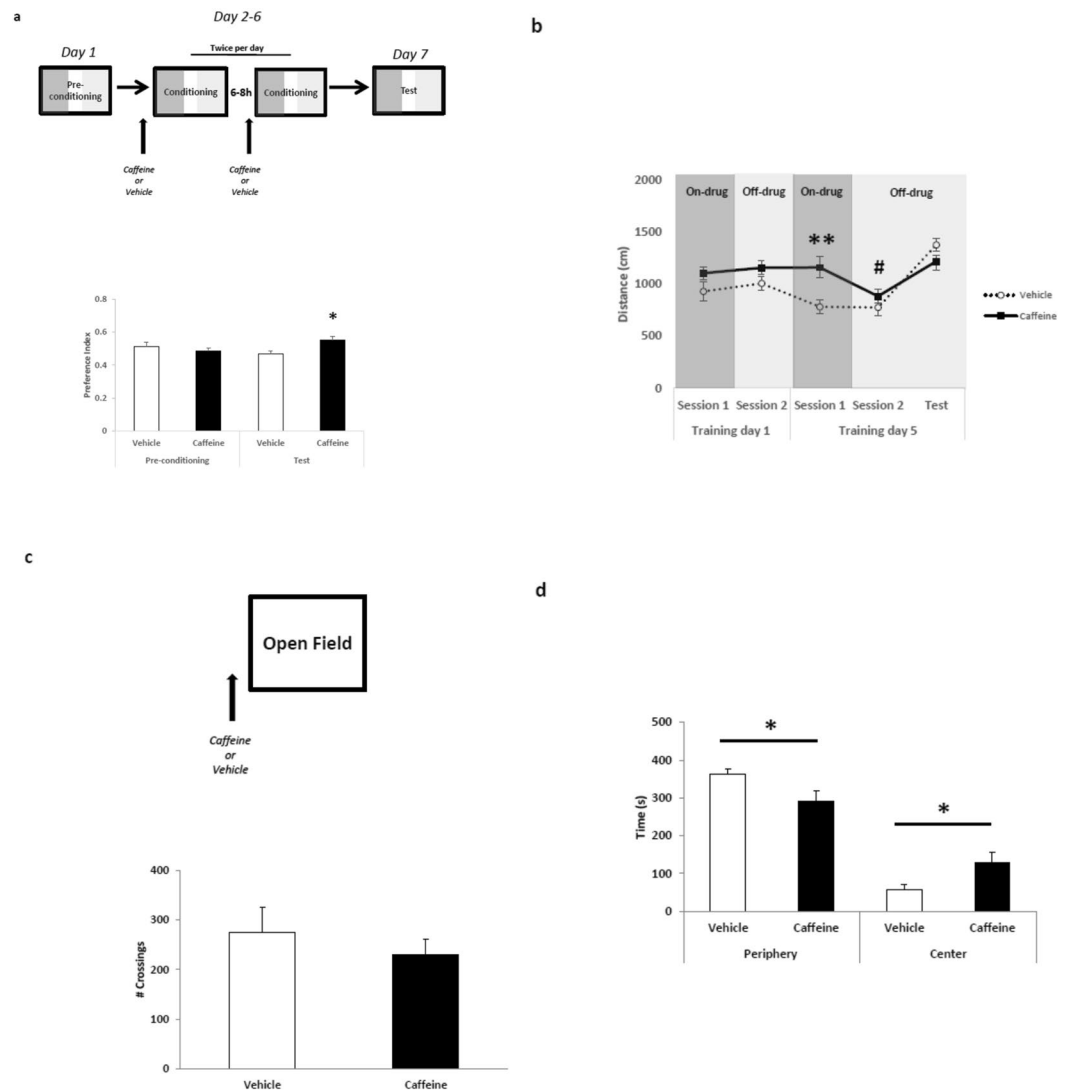


Figure 3. Caffeine induces conditioned place preference and anxiolytic-like behavior in the open field. The graphs show preference index during CPP (caffeine-paired chamber/caffeine-paired chamber + vehicle-paired chamber), number of crossings and time spent in the periphery and center of the open field, respectively. Experimental design is shown at the top of each panel; (a) Animals express preference for caffeine-paired chamber compared to control during CPP test session (Vehicle $n = 10$ and Caffeine $n = 8$); (b) Caffeine-treated animals express higher locomotion during the conditioning day 5 compared to control group and within sessions in an off-drug condition. However, no differences were found on day 1 and in the test session– (Vehicle $n = 10$ and Caffeine $n = 8$); (c) No difference was detected in number of crossings; (d) Caffeine-treated animals spent less time in the periphery and more in the center of the open field, suggesting an anxiolytic effect of acute caffeine administration (Vehicle $n = 7$ and Caffeine $n = 7$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ differences between groups (vehicle vs. caffeine) and within sessions (on drug vs. off drug), # $p < 0.05$, differences between conditioning sessions (day 1 vs. day 5).

caffeine group significantly increased preference for the drug-paired chamber compared to the vehicle group ($p < 0.05$) (Fig. 3a).

We also evaluated the distance walked during CPP. Repeated-measure ANOVA revealed significant effects for conditioning day (day 1 vs. day 5) ($F_{1,32} = 5.806$, $p = 0.021$), group (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,32} = 10.721$, $p = 0.002$) and time (session 1 vs. session 2) \times conditioning day interaction ($F_{1,32} = 5.441$, $p = 0.026$), but not for conditioning day and group interaction ($F_{1,32} = 0.420$, $p = 0.521$), time ($F_{1,32} = 0.741$, $p = 0.395$), time \times group interaction ($F_{1,32} = 2.766$, $p = 0.106$) and time \times day \times group interaction ($F_{1,32} = 1.921$, $p = 0.175$). Post-hoc analysis showed that caffeine-treated animals only expressed higher locomotion during the conditioning day 5 (only in session 1) compared to control group ($p < 0.01$) (Fig. 3b). No differences between the groups were found in the motor activity on the conditioning day 1 ($p > 0.05$) and in the test session ($t(16) = 1.573$; $p = 0.135$, independent t -test). The control group decrease locomotion along the days ($p < 0.05$). The same pattern was verified in caffeine-treated animals only in free-drug sessions. Taken together, these results indicate that CPP exposition

induces context habituation and reduces its locomotion. However, this effect was not shown under caffeine effect. Importantly, in drug-free conditions such as the test session, the caffeine treated group did not show any motor effect.

It has been shown that caffeine induces either anxiolytic or anxiogenic behavior^{29–32}. In order to evaluate deeply a possible caffeine effect in motor activity and in anxiety-like behavior, we next submitted animals to an open field test. Animals were treated with caffeine or saline and, 20-min later, exposed in an open field arena. No differences were detected in number of crossings during open field exposition between the groups ($t(12) = 2.000$; $p = 0.068$, independent t -test) (Fig. 3c). However, the caffeine treated group spent less time in the periphery and more in the center of the open field compared to vehicle ($t(12) = 2.371$; $p = 0.035$, independent t -test) (Fig. 3d).

Our results showed that caffeine in the dose of 20 mg/kg was able to establish conditioned place preference and decreased anxiety responses. The rewarding and anxiolytic profile showed by our treatment allows us to hypothesize that caffeine changes the endogenous state during reactivation, weakening unwanted fear memories through the incorporation of reinforcing information. This “re-signification” phenomenon has been previously shown using natural appetitive stimuli³ and opiate drugs² concomitant with memory reactivation.

Periodical memory reactivation under caffeine administration attenuates remote fear memories.

It has been reported that some boundary conditions prevent attenuation of fear memories such as training intensity and memory age. High training intensity makes memory less prone to be affected by pharmacological agents^{11,43}. Also, older memories are less susceptible to modification than recent ones¹⁴. Indeed, long-intervals between acquisition and extinction produce a smaller rate of fear attenuation in rodents⁴⁴ and a more intense hyperarousal compared to early interventions⁴⁵.

The following set of experiments were addressed to evaluate if caffeine administration concomitant with memory reactivation would be able to attenuate either very strong training or remote memory. First, animals were trained with 8 footshocks of 1.0 mA/2-s on day 1 and submitted to memory reactivation for 5-min on day 3 with previous administration of vehicle or caffeine. On day 4, animals were tested in a drug-free condition. Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,11} = 5.004$, $p = 0.04$), time factor (reactivation vs. test) ($F_{1,11} = 5.621$, $p = 0.03$) and time x treatment interaction ($F_{1,11} = 10.559$, $p = 0.007$). Post-hoc analysis showed that caffeine-treated animals expressed less freezing during reactivation compared to vehicle ($p < 0.05$). However, no differences were detected during test (Fig. 4a). This result indicated that even after very strong fear conditioning, caffeine may disrupt memory retrieval during reactivation, but this effect is not persistent.

In the next experiment, periodical memory reactivation under caffeine administration was performed in animals trained with 8 footshocks of 1.0 mA/2-s. Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,16} = 33.388$, $p < 0.001$) time factor (reactivation vs. test) ($F_{3,48} = 51.436$, $p < 0.001$) and treatment x time interaction ($F_{3,48} = 5.754$, $p = 0.001$). Post-hoc analysis showed that with the exception of reactivation 1 ($p > 0.05$), caffeine-treated animals expressed less freezing in the remaining reactivation sessions (2 and 3) ($p < 0.05$). However, no differences were detected during test ($p = 0.058$). Moreover, there is a significant freezing decrease throughout the reactivation sessions in vehicle-treated animals ($p < 0.05$) (Fig. 4b).

Next, we evaluated whether caffeine would affect remote fear memory. When remote memory was evaluated in animals trained with the strong protocol (4 footshocks of 0.7 mA/2-s) and reactivated 43 days later, repeated-measure ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,16} = 16.248$, $p < 0.001$), time factor (reactivation vs. test) ($F_{1,16} = 4.920$, $p = 0.040$) and time x treatment interaction ($F_{1,16} = 7.943$, $p = 0.010$). Post-hoc analysis showed that caffeine-treated animals expressed less freezing during reactivation compared to vehicle ($p < 0.001$). However, no differences were detected during test (Fig. 4c).

Finally, animals were trained with the same strong protocol, but they were reactivated three times (starting on day 25) and tested on day 43. Repeated-measure ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. caffeine) ($F_{1,15} = 62.746$, $p < 0.001$), time factor (reactivation vs. test) ($F_{3,45} = 26.529$, $p < 0.001$) and time x treatment interaction ($F_{3,45} = 11.009$, $p < 0.001$). Post-hoc analysis showed that for all reactivation sessions caffeine-treated animals expressed less freezing compared to the control group ($p < 0.001$). This effect was maintained in the test session in the absence of caffeine ($p < 0.05$) (Fig. 4d). This result shows that even remote fear memories may be weakened by caffeine administration during reactivation.

Discussion

In the present study, we evaluated the effect of systemic administration of caffeine concomitant with standard memory reconsolidation protocol and periodical memory reactivation as a potential strategy to attenuate contextual fear memories. Caffeine administration was effective to attenuate weak fear memories through a standard reconsolidation protocol (Fig. 1a). However, the same approach failed when animals were submitted to a strong training (Fig. 2a). A significant fear reduction during test in a drug-free condition was reached in strong memories after 3 periodical reactivations (1 per week for 3 weeks) in both recent and remote memory (Figs 2b and 4d). The dose of caffeine used here was able to establish conditioned place preference (Fig. 3a) and induced anxiolytic effects in the open field (Fig. 3d).

The effects of caffeine consumption on cognition and mood states are well documented. However, there are several reports showing that caffeine effects depend on drug concentration, time consumption (acute vs. chronic), memory phase in rodents (memory acquisition, consolidation, or retrieval) and memory task^{21–23,46}. For instance, pre-test injection of caffeine (3 or 10 mg/kg) enhances memory retrieval²⁴. However, Corodimas and colleagues have shown that systemic caffeine injection (30 mg/kg) before testing impairs fear memory retrieval²¹. This effect was not state-dependent since caffeine disrupted memory retrieval independent of previous history of caffeine treatment. Accordantly, we have shown here a robust reduction of freezing pattern using 20 mg/kg in the reactivation sessions (under effect of caffeine during retrieval).

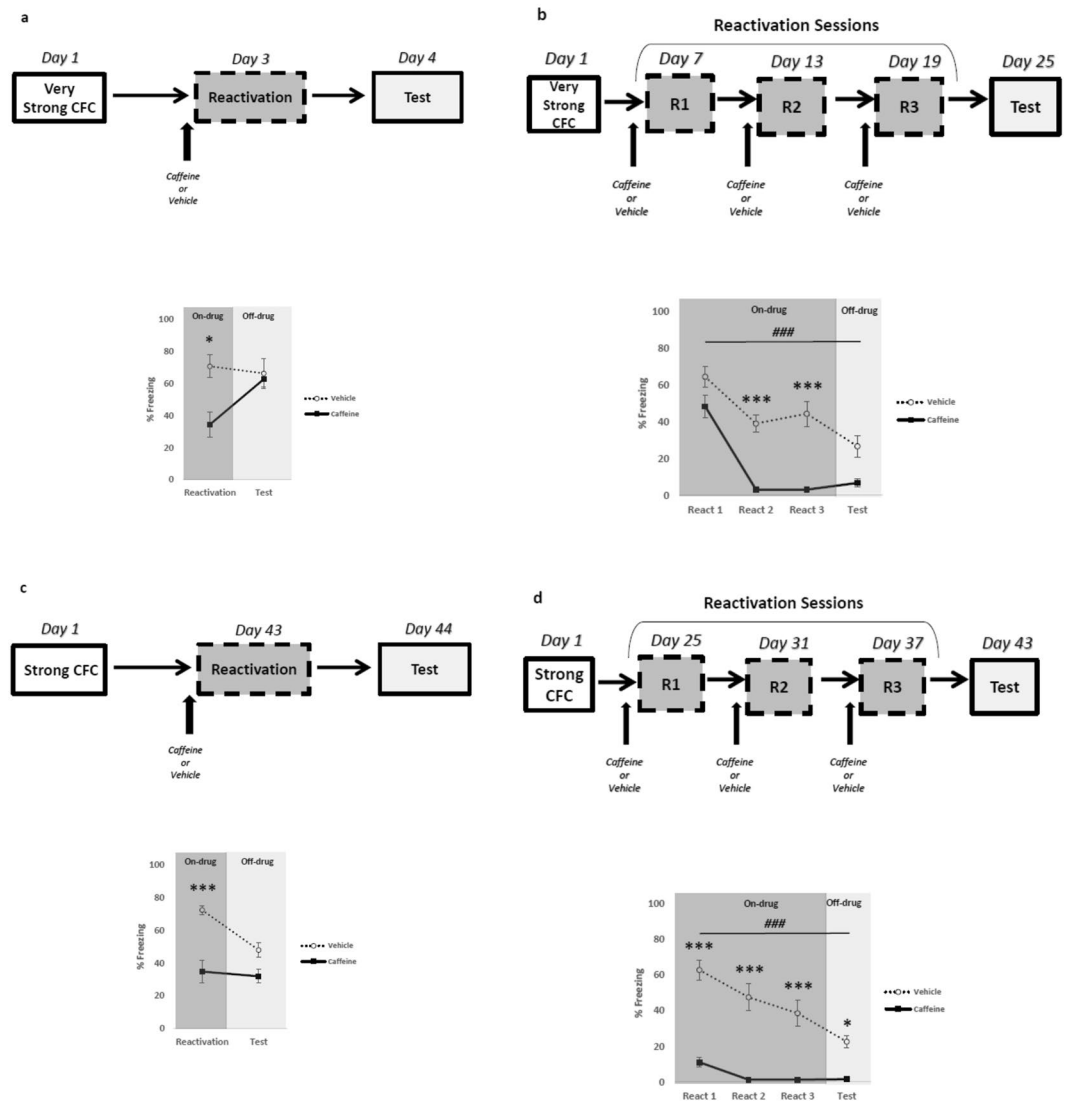


Figure 4. Caffeine administration concomitant with periodical memory reactivation attenuates remote memories. The graph shows percent of freezing time expressed as mean \pm SEM, and experimental design is shown at the top of each panel. (a) Caffeine administration before a single memory reactivation reduces fear expression during reactivation, but fails to attenuate very strong fear memories (8 \times 1.0 mA) in the test (Vehicle $n = 6$ and Caffeine $n = 7$); (b) Similar results were obtained with very strong memories and periodical memory reactivation under the effect of caffeine (Vehicle $n = 9$ and Caffeine $n = 9$); (c) Caffeine hinders remote memory during reactivation, but the effect was not persistent during test with a single-reactivation session (Vehicle $n = 8$ and Caffeine $n = 8$); (d) Periodical memory reactivation under the effect of caffeine reduces freezing expression during reactivation (on-drug) and test (off-drug) of remote memories (Vehicle $n = 8$ and Caffeine $n = 9$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ### $p < 0.001$, Repeated Measures ANOVA followed by *post hoc* test. *Differences between groups; #Differences within groups.

The inability to retrieve fear memory in a conditioned context may affect the subsequent fear expression in the same context. We have previously shown that fear conditioned animals that were unable to freeze due to an air puff distractor during the reactivation session expressed low freezing levels in the following tests (in the absence of the distractor)⁴¹. Thus, one possible explanation for our results is that the retrieval deficits under the effect of caffeine observed during the reactivation may cause a memory change that affects subsequent tests (in a drug-free condition).

Few evidence of caffeine's reinforcing properties in non-human animals have been shown. Some studies were able to demonstrate preference for caffeine consumption^{47,48} and the enhancement of reinforcement effects of other drugs such as alcohol⁴⁹ and cocaine⁵⁰. Furthermore, Brianna *et al.*, showed that acute doses of 6.25, 12.5, or 25 but not 50 mg/kg of caffeine increased the number of active lever presses in an operant conditioning training under progressive ratio schedule for sucrose intake⁵¹. Also, a low dose of caffeine (3.0 mg/kg) was able to establish CPP while a higher dose (30 mg/kg) produced place and taste aversion²⁷. Altogether, these results suggest that caffeine in appropriate doses can be considered a reinforcement enhancer as well as reward stimuli *per se*. In

agreement with this view, our results have shown that caffeine induces contextual place preference. In addition, we found that animals under the effect of caffeine spend more time in the central part of an open field arena and less in the periphery compared with the control group, suggesting that this dose of caffeine promotes an anxiolytic-like effect. Indeed, it has been shown that similar doses of caffeine used in the present study induce an anxiety reduction in the open field and elevated plus maze task^{29,30}. However, other studies have shown the opposite effect^{31,32}. Interestingly, 10 mg/kg in rats correspond to approximately 200 mg of caffeine in human (~2 cups of coffee), a dose that has been associated with positive subjective effects⁵² and memory consolidation enhancement in humans⁵³.

The fear reduction shown in our experiments following memory reactivation under the effect of caffeine may be mediated by counterconditioning. This process involves pairing the original conditioned stimuli with a new unconditioned stimuli that has an opposite valence to the original learning^{54,55} (in our case the aversive fear-conditioned context with the rewarding and/or anxiolytic properties of caffeine). Indeed, counterconditioning models applied to PTSD emphasize that negative affective states such as fear or anxiety can be changed by introducing positive stimulus such as pleasurable emotions during exposition^{56,57}. Classically, counterconditioning has been considered a reciprocal inhibitory system between aversive and appetitive states that compete for behavioral outcome during retrieval⁵⁸. However, counterconditioning has important differences compared with extinction, since it is based on an incompatible response using stimuli of opposite valence instead of a simple new learning caused by the absence of the US⁵⁹. Despite the fact that counterconditioning has been considered a potential strategy to update memory traces during reconsolidation^{60,61}, we cannot rule out the possibility that caffeine accelerates fear extinction since many studies have shown that fear extinction may be enhanced pharmacologically, even in short reactivation trials^{62–64}.

In fact, fear reduction over time was verified in control animals exposed to periodical memory reactivation protocol suggesting fear extinction. While time to single exposure in the training context seem to be critical to induce reconsolidation or extinction⁶⁵, repetitive contextual exposition promotes fear extinction⁶⁶. We have previously shown that 3-to-5 min exposure to the context induces memory reactivation/reconsolidation^{2,36,37,67}. Accordingly, this allows us to hypothesize that caffeine administration using single memory reactivation may attenuate fear memories via reconsolidation-driven mechanism. However, this assumption cannot be generalized to multiple contextual exposure, which might be acting as an extinction enhancer. Notably, the hypothetical counterconditioning proposed above has been shown during extinction as well as reconsolidation protocols^{61,68}, suggesting that memory reactivation concomitant with appetitive valence stimulus is a general mechanism to promote fear attenuation. Because predictability of exposure to conditioned stimuli⁶⁹ and differences between massed and long-spaced exposures⁴⁴ are able to influence the extinction outcome, future experiments should be conducted to address the effects of caffeine under these conditions.

The requirement of repetitive memory reactivation coupled with caffeine administration is in accordance with a time-dependent process necessary for the effective incorporation of an endogenous state induced by the treatment. Interestingly, similar results were reported by our group with the consumption of appetitive stimuli during reactivations³. In this study, the presence of chocolate during three reactivation sessions of fear conditioned animals resulted in a context-appetitive stimulus association that changed the memory emotional valence to a less aversive level, weakening fear expression in the following tests (even in the absence of chocolate). This suggests that when a contextual fear memory is reactivated in the presence of an appetitive stimulus (chocolate or caffeine), such positive information may be incorporated into a preexisting memory, retuning its emotional valence to a less aversive state.

It has been shown that a remote memory is less likely to be modified or updated than a recent one^{70,71}, although there are divergent results^{11,72}. In fact, remote memories seem to be resistant to pharmacological disruption of reconsolidation^{13,14} and induce fear incubation⁷³. Although some studies have been shown enhanced fear reduction in early vs. late interventions^{44,45,69}, we found that caffeine was able to attenuate fear memory even in long intervals between training and test. Nevertheless, it remains to be investigated if additional responses such as fear generalization and hyperarousal could also be attenuated.

In females, although caffeine induced a freezing reduction during reactivation, there was no effect in the test. Probably this result was caused by the low freezing levels observed in the control group. In the animals conditioned with the very strong training protocol, caffeine was able to reduce freezing expression in the reactivation sessions, but only a tendency in the test. Indeed, this discrepancy between fear expression during memory reactivation and test have been thoroughly demonstrated, showing that the performance during the within-session does not necessarily predict the between session fear expression⁶⁹. It is possible that caffeine may be effective even in a very strong condition if some parameters are adjusted, such as the number of reactivation sessions or its duration. Importantly, even with small differences in freezing behavior across training protocols, we showed that the conditioning strength as well as reactivation length may be critical factors to determine the caffeine effect in memory. Thus, it is possible that the behavioral expression may not correspond strictly to cellular and molecular mechanisms underpinning memory processes^{11,74}.

In the last decade, several studies have shown that fear memories can be attenuated by interfering with the reconsolidation process with different drugs^{4,6,7}. However, most of these pharmacological agents cannot be administered to humans. Our findings show that fear memory can be weakened using a widely used drug during memory reactivation. Nonetheless, the fact that caffeine intake in humans are commonly chronic in society might be a limitation to translate our findings for humans and requires further studies. Preclinical and clinical research on caffeine effects on memory reconsolidation and extinction could bring new therapeutic approaches for fear-related disorders such as PTSD and phobias.

References

- Monfils, M.-H., Cowansage, K. K., Klann, E. & LeDoux, J. E. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science*. **324**, 951–955 (2009).
- Sierra, R. O. *et al.* Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem.* **20**, 379–387 (2013).
- Haubrich, J. *et al.* Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*. **40**, 315–326 (2015).
- Nader, K., Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. **406**, 722–726 (2000).
- Blundell, J., Kouser, M. & Powell, C. M. Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem.* **90**, 28–35 (2008).
- Lee, J. L., Milton, A. L. & Everitt, B. J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci.* **26**, 10051–10056 (2006).
- Debiec, J. & LeDoux, J. E. Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. *Ann NY Acad Sci.* **1071**, 521–524 (2006).
- Kindt, M., Soeter, M. & Vervliet, B. Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nat Neurosci.* **12**, 256–8 (2009).
- Brunet, A. *et al.* Trauma reactivation under the influence of propranolol decreases posttraumatic stress symptoms and disorder: 3 open-label trials. *J Clin Psychopharmacol.* **31**, 547–50 (2011).
- Corlett, P. R. *et al.* Ketamine effects on memory reconsolidation favor a learning model of delusions. *PLoS One.* **8**, e65088 (2013).
- Wang, S. H., de Oliveira Alvares, L. & Nader, K. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci.* **12**, 905–12 (2009).
- Nader, K. & Einarsson, E. O. Memory reconsolidation: an update. *Ann NY Acad Sci.* **1191**, 27–41 (2010).
- Suzuki, A. *et al.* Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* **24**, 4787–4795 (2004).
- Frankland, P. W. *et al.* Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning & Memory.* **13**, 451–457 (2006).
- Fitzgerald, P. J., Seemann, J. R. & Maren, S. Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain Res Bull.* **105**, 46–60 (2014).
- Fulgoni, V. L. 3rd, Keast, D. R. & Lieberman, H. R. Trends in intake and sources of caffeine in the diets of US adults: 2001–2010. *Am J Clin Nutr.* **101**, 1081–7 (2015).
- McLellan, T. M., Caldwell, J. A. & Lieberman, H. R. A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neurosci. Biobehav Rev.* **71**, 294–312 (2016).
- Dall'Igna, O. P. *et al.* Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol.* **203**, 241–245 (2007).
- Kaster, M. P. *et al.* Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **112**, 7833–7838 (2015).
- Ribeiro, J. A. & Sebastião, A. M. Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis.* **20**, 3–15 (2010).
- Corodimas, K. P., Pruitt, J. C. & Stieg, J. M. Acute exposure to caffeine selectively disrupts context conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **152**, 376–82 (2000).
- Dubroqua, S., Low, S. R., Yee, B. K. & Singer, P. Caffeine impairs the acquisition and retention, but not the consolidation of Pavlovian conditioned freezing in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. **232**, 721–31 (2015).
- Kopf, S. R., Melani, A., Pedata, F. & Pepeu, G. Adenosine and memory storage: effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. **146**, 214–9 (1999).
- Angelucci, M. E. *et al.* The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Eur J Pharmacol.* **373**, 135–40 (1999).
- Simões, A. P. *et al.* Adenosine A2A Receptors in the Amygdala Control Synaptic Plasticity and Contextual Fear Memory. *Neuropsychopharmacology*. **41**, 2862–2871 (2016).
- Sousa, V. C. *et al.* Regulation of Hippocampal Cannabinoid CB1 Receptor Actions by Adenosine A1 Receptors and Chronic Caffeine Administration: Implications for the Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol on Spatial Memory. *Neuropsychopharmacology*. **36**, 472–487 (2011).
- Brockwell, N. T., Eikelboom, R. & Beninger, R. J. Caffeine-induced place and taste conditioning: production of dose-dependent preference and aversion. *Pharmacol Biochem Behav.* **38**, 513–7 (1991).
- Solinas, M. *et al.* Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci.* **22**, 6321–4 (2002).
- Tang, M., Kuribara, H. & Falk, J. L. Anxiolytic effect of caffeine and caffeine-clonazepam interaction: evaluation by NaCl solution intake. *Pharmacol Biochem Behav.* **32**, 773–6 (1989).
- Sweeney, P., Levack, R., Watters, J., Xu, Z. & Yang, Y. Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behaviors. *Appetite.* **101**, 171–7 (2016).
- Baldwin, H. A., Johnston, A. L. & File, S. E. Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol.* **159**, 211–5 (1989).
- Bhattacharya, S. K., Satyan, K. S. & Chakrabarti, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol.* **11**, 219–24 (1997).
- Pedraza, L. K. *et al.* The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus.* **26**, 362–71 (2016).
- Blanchard, R. J. & Blanchard, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Compar Physiol Psychol.* **68**, 129–113 (1969).
- Honsberger, M. J., Taylor, J. R. & Corlett, P. R. Memories reactivated under ketamine are subsequently stronger: A potential pre-clinical behavioral model of psychosis. *Schizophr Res.* **164**, 227–33 (2015).
- de Oliveira Alvares, L., Pasqualini Genro, B., Diehl, F., Molina, V. A. & Quillfeldt, J. A. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience.* **154**, 1648–1655 (2008).
- de Oliveira Alvares, L. *et al.* Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience.* **244**, 42–48 (2013).
- de Oliveira Alvares, L. *et al.* Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus.* **22**, 1092–1095 (2012).
- Maren, S., De Oca, B. & Fanselow, M. S. Sex differences in hippocampal long term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Res.* **661**, 25–34 (1994).
- Bangasser, D. A. & Valentino, R. J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Front Neuroendocrinol.* **35**, 303–19 (2014).
- Crestani, A. P. *et al.* Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Sci. Rep.* **5**, 13633 (2015).

42. Bedingfield, J. B., King, D. A. & Holloway, F. A. Cocaine and caffeine: conditioned place preference, locomotor activity, and additivity. *Pharmacol Biochem Behav.* **61**, 291–6 (1998).
43. Milekic, M. H. & Alberini, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron.* **36**, 521–5 (2002).
44. Jiang, L. *et al.* Inhibition of Rac1 activity in the hippocampus impaired extinction of contextual fear. *Neuropharmacology.* **109**, 216–222 (2016).
45. Golub, Y., Mauch, C. P., Dahlhoff, M. & Wotjak, C. T. Consequences of extinction training on associative and non-associative fear in a mouse model of Posttraumatic Stress Disorder (PTSD). *Behav Brain Res.* **205**, 544–549 (2009).
46. Poole, R. L., Braak, D. & Gould, T. J. Concentration- and age-dependent effects of chronic caffeine on contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* **298**, 69–77 (2016).
47. Atkinson, J. & Enslen, M. Self-administration of caffeine by the rat. *Arzneimittelforschung.* **26**, 2059–61 (1976).
48. Myers, K. P. & Izbic, E. V. Reinforcing and aversive effects of caffeine measured by flavor preference conditioning in caffeine-naive and caffeine acclimated rats. *Physiol Behav.* **88**, 585–96 (2006).
49. Kunin, D., Gaskin, S., Rogan, F., Smith, B. R. & Amit, Z. Caffeine promotes ethanol drinking in rats. *Examination using a limited-access free choice paradigm.* *Alcohol.* **21**, 271–7 (2000).
50. Schenk, S., Valadez, A., Horger, B. A., Snow, S. & Wellman, P. J. Interactions between caffeine and cocaine in tests of self-administration. *Behav Pharmacol.* **5**, 153–158 (1994).
51. Sheppard, A. B., Gross, S. C., Pavelka, S. A., Hall, M. J. & Palmatier, M. I. Caffeine increases the motivation to obtain non-drug reinforcers in rats. *Drug Alcohol Depend.* **124**, 216–22 (2012).
52. Fredholm, B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. & Zvartan, E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Rev.* **51**, 83–133 (1999).
53. Borota, D. *et al.* Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. *Nat Neurosci.* **17**, 201–203 (2014).
54. Pearce, J. M. & Dickinson, A. Pavlovian counterconditioning: changing the suppressive properties of shock by association with food. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* **1**, 170–7 (1975).
55. Richardson, R., Riccio, D. C., Jamis, M., Cabosky, J. & Skoczen, T. Modification of reactivated memory through “counterconditioning”. *Am J Psychol.* **95**, 67–84 (1982).
56. Baldwin, J. D. & Baldwin, J. I. Behavior principles in everyday life (4th edition). (Prentice Hall, 2001).
57. Paunović, N. Prolonged exposure counterconditioning as a treatment for chronic posttraumatic stress disorder. *J Anxiety Disord.* **17**, 479–99 (2003).
58. Bouton, M. E. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull.* **114**, 80–99 (1993).
59. Lee, J. L. C., Nader, K. & Schiller, D. An Update on Memory Reconsolidation Updating. *Trends Cogn Sci.* **21**, 531–545 (2017).
60. Olshavsky, M. E. *et al.* Updating appetitive memory during reconsolidation window: critical role of cue directed behavior and amygdala central nucleus. *Front Behav Neurosci.* **7**, 186 (2013).
61. Goltseker, K., Bolotin, L. & Barak, S. Counterconditioning During Reconsolidation Prevents Relapse of Cocaine Memories. *Neuropsychopharmacology.* **42**, 716–726 (2017).
62. Stafford, J. M., Maughan, D. K., Ilioi, E. C. & Lattal, K. M. Exposure to a fearful context during periods of memory plasticity impairs extinction via hyperactivation of frontal-amygdalar circuits. *Learn Mem.* **20**, 156–163 (2013).
63. Merlo, E., Milton, A. L., Goozée, Z. Y., Theobald, D. E. & Everitt, B. J. Reconsolidation and Extinction Are Dissociable and Mutually Exclusive Processes: Behavioral and Molecular Evidence. *The Journal of Neuroscience.* **34**, 2422–2431 (2014).
64. Haubrich, J. *et al.* Enhancement of extinction memory by pharmacological and behavioral interventions targeted to its reactivation. *Scientific Reports.* **7**, 10960 (2017).
65. de la Fuente, V., Freudenthal, R. & Romano, A. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J Neurosci.* **31**, 5562–5573 (2011).
66. Morena, M. *et al.* Enhancing Endocannabinoid Neurotransmission Augments The Efficacy of Extinction Training and Ameliorates Traumatic Stress-Induced Behavioral Alterations in Rats. *Neuropsychopharmacology.* **43**, 1284–1296 (2017).
67. Sachser, R. M., Crestani, A. P. & Quillfeldt, J. A. Mello e Souza, T. & de Oliveira Alvares, L. The cannabinoid system in the retrosplenial cortex modulates fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction. *Learning & Memory.* **22**, 584–588 (2015).
68. Abraham, A. D., Neve, K. A. & Lattal, K. M. Activation of D1/5 Dopamine Receptors: A Common Mechanism for Enhancing Extinction of Fear and Reward-Seeking Behaviors. *Neuropsychopharmacology.* **41**, 2072–2081 (2016).
69. Plendl, W. & Wotjak, C. T. Dissociation of within and between-session extinction of conditioned fear. *Journal of Neuroscience.* **30**, 4990–4998 (2010).
70. Gräff, J. *et al.* Epigenetic Priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell.* **156**, 261–276 (2014).
71. Clem, R. & Huganir, R. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science.* **330**, 1108–12 (2010).
72. Ina, M. C., Muravieva, E. V. & Alberini, C. M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* **31**, 1635–1643 (2011).
73. Pickens, C. L., Golden, S. A., Adams-Deutsch, T., Nair, S. G. & Shaham, Y. Long lasting incubation of conditioned fear in rats. *Biol Psychiatry.* **65**, 881–6 (2009).
74. Delorenzi, A. *et al.* Memory beyond expression. *J Physiol Paris.* **108**, 307–322 (2014).

Acknowledgements

we would like to thank Zelma Regina for her competent and kind technical assistance. All the authors declare having no other source of compensation besides primary institution and federal funding. This research was supported by the Brazilian government agencies PNPd/CNPq and MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (process number 440413/2014–1).

Author Contributions

L.K.P. and L.D.O.A. designed the study L.K.P., F.N.L. and R.O.S. performed the experiments and analyzed the data. L.K.P., R.O.S. and L.d.O.A. wrote the manuscript. All authors have reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

3.2 “Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down systems consolidation”. Artigo Publicado na revista *Translational Psychiatry*

ARTICLE

Open Access

Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down systems consolidation

Lizeth K. Pedraza^{1,2}, Rodrigo O. Sierra^{2,3}, Marcelo Giachero⁴, Walquiria Nunes-Souza², Fernanda N. Lotz³ and Lucas de Oliveira Alvares^{1,2}

Abstract

Fear memory overgeneralization contributes to the genesis and persistence of anxiety disorders and is a central hallmark in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder (PTSD). Recent findings suggest that fear generalization is closely related to hippocampal dependency during retrieval. The selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine has been used as a first-line treatment for PTSD; however, how it exerts its therapeutic effect remains a matter of debate. Here, using contextual fear conditioning in rats, we show that chronic fluoxetine treatment prevents fear generalization and enhances subsequent extinction. Moreover, fluoxetine treatment after extinction prevents spontaneous recovery. The mechanism through which fluoxetine affects generalization and extinction seems to be through the postponement of systems consolidation, thereby maintaining hippocampal involvement during retrieval. Such an effect relies on a remodeling of dendritic spines in the hippocampus, as well as the number of mature, mushroom-type spines promoted by fluoxetine treatment. In order to further investigate whether fear generalization is a potential predictor of extinction effectiveness, we categorized a large naive population according to their generalization rate. We found that discriminator rats showed a better extinction profile compared to generalizers, suggesting that the generalization rate predicts extinction effectiveness. Hence, we propose that the therapeutic strategy of choice should take into account the extension of memory generalization, in which therapies based on extinction could induce a better outcome in patients who present less fear overgeneralization. These results open new avenues for the development of interventions that prevent fear generalization by maintaining memory dependency of the hippocampus.

Introduction

Memory generalization allows animals to extend behavioral repertoires to similar situations, contributing to cognitive flexibility. Although generalization can be considered a highly adaptive response, overgeneralization of fear memories contributes to pathological states such as post-traumatic stress disorder (PTSD). In fact, fear overgeneralization is considered a hallmark of the diagnostic

Correspondence: Lizeth K. Pedraza (pedraza.lk@hotmail.com) or Lucas Oliveira Alvares (lucas.alvares@ufrgs.br)

¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, Biosciences Institute, Porto Alegre 91.501-970, Brazil

²Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90.046-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article.

These authors contributed equally: Lizeth K. Pedraza, Rodrigo O. Sierra

© The Author(s) 2019



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

criteria for PTSD^{1,2} Accordingly, these patients are unable to restrict fear expression to appropriate predictors, causing fear and avoidance in response to harmless stimuli that are not directly related to trauma³.

Behavioral therapies and pharmacological treatments are the most common interventions to attenuate these pathological memories⁴. In exposure extinction-based therapies, traumatic reminders are repeatedly presented in a safe environment, leading to a progressive reduction in fear expression. However, extinction does not erase the original memory but induces new learning that transiently inhibits fear expression. Thus fear memory eventually re-emerges by the passage of time (spontaneous recovery)^{5,6}.

Fluoxetine and citalopram are well-known selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs) antidepressants used as a first-line treatment for adult PTSD⁷. In the past decade, the mechanisms underlying the clinical improvement associated with fluoxetine have been thoroughly investigated^{8,9}. It has been shown that fluoxetine induces neurogenesis, synaptic plasticity, and dendritic spine remodeling^{10–12}. Indeed, the mood-improving effects of fluoxetine depend on dendritic spine remodeling in the hippocampus¹². An interesting study has shown that 3 weeks of fluoxetine treatment combined with extinction training induces an enduring reduction in the conditioned fear response and prevents spontaneous recovery¹³. Interestingly, this behavioral outcome coincided with increase in synaptic plasticity in amygdala GABAergic neurons that control fear expression¹³. Importantly, other SSRIs such as citalopram have shown the opposite effect, disrupting acquisition and retention of fear extinction¹⁴.

Surprisingly, few studies have been conducted to explore the effects of SSRIs on fear generalization¹⁵. Recently, we showed that fear generalization is closely related to hippocampal dependency during retrieval^{16,17}; we found that this structure is crucial to orchestrate the reconstruction of detailed memories^{16–18}. Environmental factors, such as sequential learning and training intensity, can accelerate hippocampal independency and memory generalization^{17,19,20}. Evidence from animal studies shows that retrieval of recent contextual fear memory induces higher hippocampal activation than remote memories²¹. In contrast, several areas of the medial prefrontal cortex (mPFC) are more activated during retrieval of remote memories²². As opposed to the hippocampus, these cortical structures seem to be essential for the expression of fear generalized memories^{23,24}. Thus the transition from hippocampus dependence to hippocampus independence renders memories into a more schematic, generalized state^{25,26} (for a comprehensive review of these systems consolidation models, see refs. ^{27,28}).

Here we tested the effects of chronic treatment with the SSRI fluoxetine and citalopram on contextual fear

memory generalization and subsequent performance during fear extinction. Additionally, we explored the close relationship between memory discrimination and fear extinction in naive animals, as a potential predictor of extinction outcome. Our results are discussed in light of the observation that systems consolidation is an important player in the pathophysiology of PTSD and may be a novel approach to be considered for pharmacological and behavioral treatments of fear-related disorders.

Materials and Methods

Subjects

Naive, adult male Wistar rats (270–320 g/3 months) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, 4–5 per cage, under a 12 h light/dark cycle at a constant temperature of 24 °C, with water and food ad libitum. Sample size for each group ($n = 8–15$) was estimated based on previous studies of our laboratory^{16,17,19,20}. Animals were randomly assigned to treatment groups. All experiments were conducted in accordance with local and national guidelines for animal care (Federal Law no 11.794/ 2008), and the project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Stereotaxic surgery and cannulae placement

Rats were anesthetized with intraperitoneally (i.p.) ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally implanted with 22-gauge guide cannulae aimed at dorsal hippocampus (AP -4.0 mm (from bregma), LL ± 3.0 mm, DV -1.6 mm) positioned 1.0 mm above of each structure²⁹. Following a 1-week recovery from surgery, animals were submitted to the behavioral procedures.

Drugs

Fluoxetine hydrochloride and Citalopram hydrobromide (Sigma-Aldrich) were dissolved in 0.9% sterile saline. Both drugs were administered in a dose of 10 mg/kg/ml based on previous studies^{14,30,31} and injected i.p. Chronic treatment consisted of daily administration during 21 days after fear conditioning or extinction protocols depending on the experiment performed.

Muscimol (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Sigma Aldrich) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and bilaterally infused (0.5 $\mu\text{l}/\text{side}$) into dorsal hippocampus 15 min before memory retrieval.

Intracerebral infusion

At the time of infusion, a 27-gauge infusion needle was inserted into the guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the tip of the cannula and aimed at the dorsal hippocampus. A volume of 0.5 μl was bilaterally infused at a slow rate (20 $\mu\text{l}/\text{h}$), and the needle was removed only after waiting for an additional 30 s.

Behavioral procedure

Contextual fear conditioning (CFC)

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box, 25 × 25 cm² with a metallic grid floor. During training, rats were placed in the chamber for 3 min, received 4 footshocks (0.7 mA/2 s) separated by a 30 s interval; 30 s after the last shock, they were returned to their homecages.

Context apparatus

Conditioning context consisted of an illuminated Plexiglas box of 25 × 25 cm², grid floor of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart, and fan background noise. The novel context was a rectangular box 2/3 the size of the conditioning context, smooth floor, vanilla essence, and without fan background noise.

Fear generalization test

Animals were tested for 4 min both in the novel context (Novel) and in the conditioning context (Ctx) without footshocks on days 22 and 23 after training, respectively.

Fear extinction session

Subjects were re-exposed to the training context on day 24 without footshocks for 30 min to induce memory extinction.

Fear extinction and spontaneous recovery test

Animals were tested for 4 min in the conditioning context (Ctx) 24 h and 22 days after the extinction session in order to evaluate early retention and spontaneous recovery response, respectively.

Open field (OF)

The OF chamber consisted of a 50 cm height, 60 × 40 cm² plywood box and a linoleum floor divided into 12 equal rectangles or “sectors.” In addition, floor was divided into two squares, which allowed the definition of central and peripheral areas. The behavior was recorded by video tracking and processed offline. During the 5-min test session, crossings between sectors (locomotor activity) and the time spent in the periphery and center of the apparatus were measured.

Behavioral scoring

Freezing behavior was registered in real time by an experienced observer who was blind to the treatments. Freezing was defined as the absence of all movements, except those related to breathing. In the OF test, the number of crossings was considered a measure of motor performance, while the time spent in the center or periphery of the field was considered anxiolytic or anxiogenic responses induced by the treatment, respectively.

Structural plasticity analysis

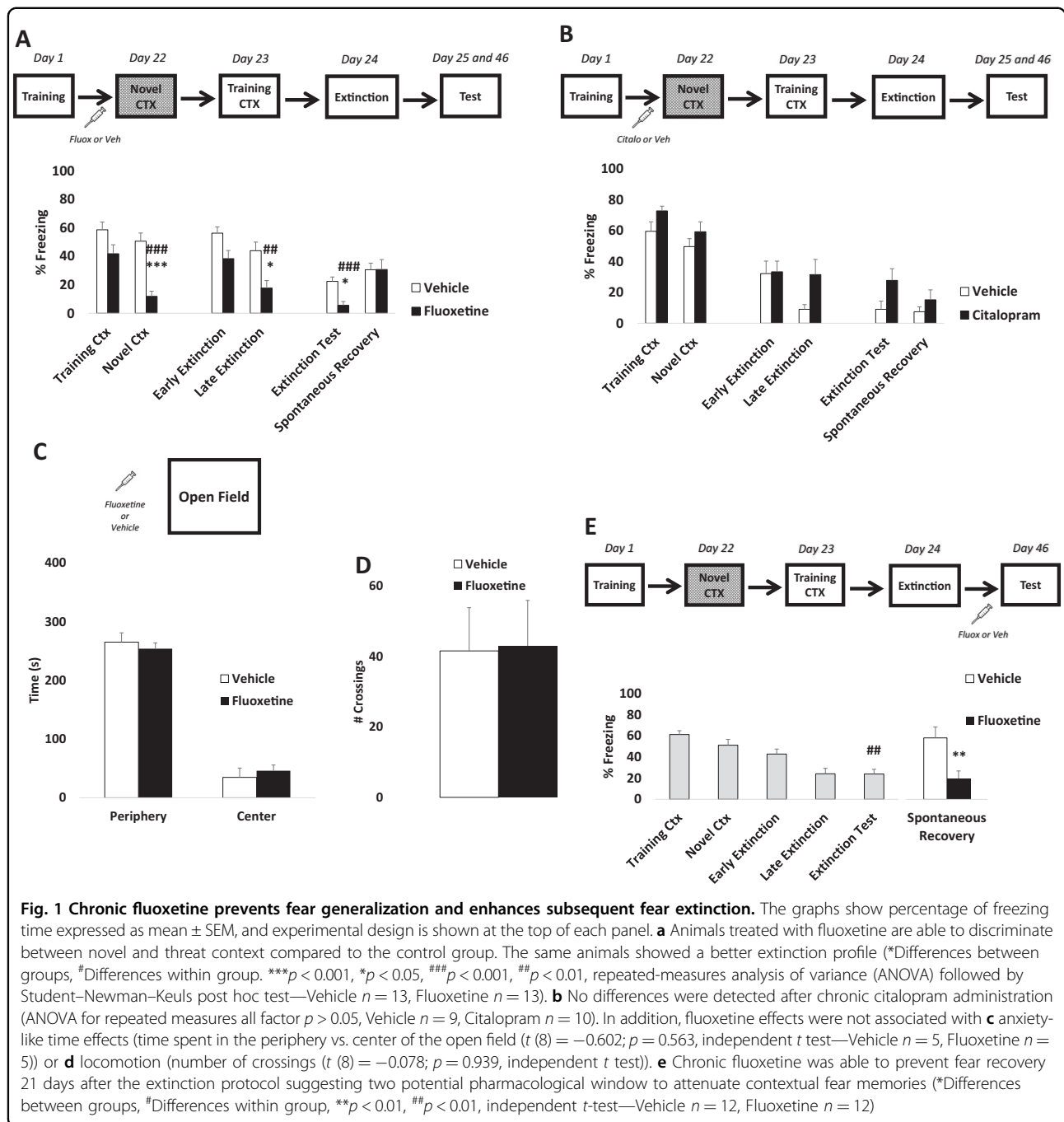
Dendritic spine visualization and analysis was performed as previously reported by other researchers^{32–34}. Concisely, under deep anesthesia (chloral hydrate, 400 mg/kg i.p.), animals were transcardially perfused, first by ice-cold PBS (0.1 M, pH 7.4) and then fixed using ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA) (in 0.1 M PBS, pH 7.4). After the brain was removed and postfixed (4% PFA, 24 h, 4 °C), coronal sections (200-μm thick) containing the dorsal hippocampus were obtained with a vibratome and collected in 0.1% PBS. The CA1 dorsal hippocampus was stained with small droplets (<10 μm) of a saturated solution of the lipophilic dye 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl indocarbocyanine perchlorate (Invitrogen; Carlsbad, CA) in fish oil³⁵ by microinjection via a patch pipette and positive pressure application³⁴. Using a Leica DMI6000 B laser scanning confocal microscope with a ×100× oil immersion from the Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, Florianópolis, Brazil, stacks of labeled dendritic segments were collected. The images were deconvolved using LAS AF Lite software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A theoretical point spread function was used.

The dendritic spine analysis was achieved manually using the ImageJ software. Dendritic protrusions <3 μm in length and contacting with the parent dendrite were employed for the analysis^{33,36,37}. Special consideration was taken to select a single dendritic segment, presumably from different neurons but from CA1 stratum radiatum, in light of the high density of labeled dendrites. Thus, from the z-section projection, both the total number and the number of each particular type of dendritic spine normalized to 10 μm of the dendritic segment length was counted with certainty that each spine was counted only once.

Spine types were classified as previously^{32,38,39}: type I or “stubby”-shaped dendritic spines, type II or “mushroom”-shaped dendritic spines, and type III or “thin”-shaped dendritic spines. Different measurements were taken for each dendritic protrusion in order to classify them, in brief: the length (dimension from the base at the dendrite to the tip of its head, *L*), the diameter of the neck (measured as the maximum neck diameter, *dn*), and the diameter of the head (measured as the maximum head diameter, *dh*)³⁸. Thus individual spines were classified into category based on the specific ratios *L/dn* and *dh/dn*^{32–34,38}.

Histology for cannulae placement

The position of the cannulae was verified at the end of the experiments. The brains were removed and immersed in a fixation solution of 30% sucrose and 4% PFA. Brains were then frozen and sliced (50-μm coronal sections) using a cryostat. Sections were stained with cresyl violet



and subsequently examined to verify the location of the cannulae (Fig. 2a). Statistical analysis considered only animals with correct cannulae placements.

Statistical analysis

After checking for normality (Kolmogorov–Smirnov (KS) test) and homoscedasticity (Levene test), each relevant phase of the experiment (generalization, extinction and test (extinction test and spontaneous recovery) was analyzed by two-way repeated-measures analysis of

variance (ANOVA) with Student–Newman–Keuls (SNK) post hoc test. OF result were analyzed using independent Student's t test. Significance was set at $p < 0.05$. Simple linear regression was used to evaluate the relationship between discrimination index and freezing behavior during the extinction test. Cumulative distribution probabilities for total number, mushroom, stubby, and thin dendritic spines per 10 mm of dendritic segment were compared by KS test. Data were also expressed as median (quartile) and compared by Mann-Whitney U test. $p <$

0.05 was considered statistically significant. For behavioral profile classification, we used the unsupervised learning algorithm expectation-maximization (EM) to divide naive animals between generalizers and discriminators using as input the discrimination index between conditioning and neural context [training ctx/(training ctx + novel ctx)]. This method was used based on previous studies evaluating fear memory discrimination-based populations^{40,41}.

Results

Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction

First, in order to assess the effects of fluoxetine on fear generalization and subsequent extinction, animals were trained in CFC and received daily administration of fluoxetine or its vehicle i.p. for 21 days after training. Twenty-four hours after the last administration, animals were exposed first to a novel context (Novel Ctx) and, on the following day, to the training context (Training Ctx). Twenty-four hours later, animals were submitted to a fear extinction procedure in the training context and memory retrieval was evaluated 24 h and 21 days after extinction (spontaneous recovery). Repeated-measures ANOVA revealed that fluoxetine-treated animals expressed contextual discrimination; less freezing was expressed in the novel context compared to the training context (group \times context interaction ($F_{1,24} = 6.006$, $p = 0.021$; SNK post hoc $p < 0.001$)). Moreover, fluoxetine-treated animals expressed less freezing in the novel context than vehicle-treated animals ($p < 0.001$). Vehicle-treated animals were unable to discriminate between the contexts, expressing fear generalization (training vs. novel context $p > 0.05$; Fig. 1a).

Fluoxetine-treated animals expressed a better extinction profile; less freezing was detected during the last 5 min of fear extinction (late extinction) compared to the control group (group \times time interaction ($F_{1,24} = 0.664$, $p = 0.422$; SNK post hoc $p < 0.05$)). Additionally, fluoxetine enhanced fear extinction during the test performed 24 h after extinction but did not prevent spontaneous recovery (group \times time interaction ($F_{1,24} = 6.573$, $p = 0.017$; SNK post hoc $p < 0.05$). Interestingly, the chronic administration of citalopram, another SSRI, did not prevent fear generalization or alter fear expression (ANOVA for repeated measures all factor $p > 0.05$; Fig. 1b).

These results suggest that chronic fluoxetine (but not citalopram) is able to prevent fear generalization and enhance subsequent extinction. Anxiety-like (time spent in the periphery or center of the OF between groups ($t(8) = -0.602$; $p = 0.563$, independent t test); Fig. 1c) or locomotion (number of crossings ($t(8) = -0.078$; $p = 0.939$, independent t test)) effects were not induced by the treatment (Fig. 1d).

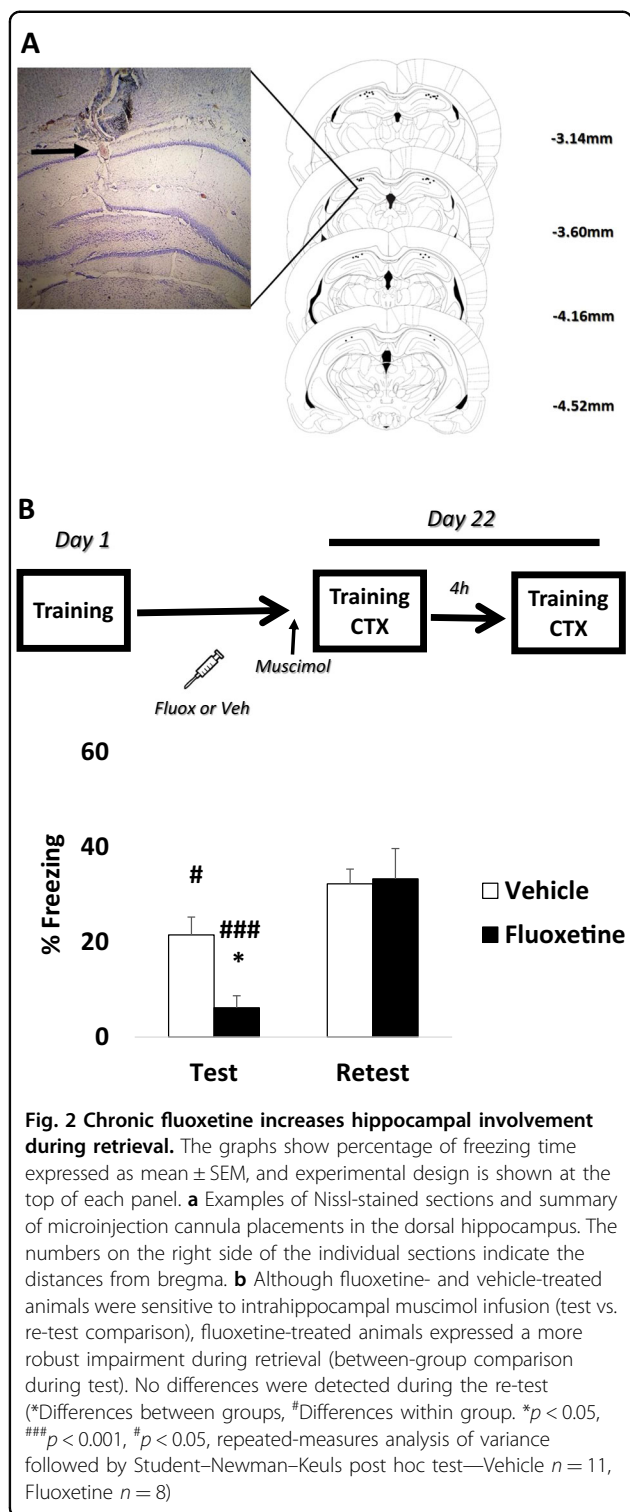
Although fluoxetine enhanced fear extinction, it did not prevent spontaneous recovery. Prevention of fear relapse after extinction is considered a major challenge for pharmacological and exposure-based therapies⁴². Finally, to verify whether fluoxetine treatment after the extinction training would be able to postpone fear re-emergence, we administered fluoxetine after extinction for 21 days until the spontaneous recovery test. Repeated-measures ANOVA revealed that animals were not able to discriminate between the training and novel contexts. Moreover, a significant reduction in freezing levels was detected between early and late extinction and was maintained during the extinction test (time factor ($F_{4,92} = 17.670$, $p < 0.001$; SNK post hoc $p > 0.05$); Fig. 1e).

After that, animals were randomly assigned to two groups and treated with fluoxetine or vehicle. Our results showed that chronic fluoxetine is able to prevent spontaneous recovery ($t(22) = 3.055$, $p = 0.005$; independent t test). This result suggests a dual window of opportunity for pharmacological intervention with fluoxetine to enhance extinction, based on decreasing fear generalization (Fig. 1a) or preventing spontaneous recovery (Fig. 1e).

Chronic fluoxetine maintains hippocampal dependency during retrieval

Previous studies demonstrate that memory precision involves hippocampal processing during retrieval^{17,18}, whereas fear generalization has been associated with an increase in mPFC activity^{23,24} but a decrease in the hippocampus^{17,18}. These results are consistent with the systems memory consolidation hypothesis on progressive trace reorganization over time between hippocampal and cortical structures^{21,43,44}. Since chronic fluoxetine induces memory precision, we reason that this treatment could promote hippocampal dependency as well. To address this issue, animals were treated with fluoxetine and infused intrahippocampally 15 min before the test in the training context with vehicle or muscimol, a selective agonist for GABA-A receptors able to suppress transiently neural activity. Four hours after the test, a drug-free re-test was performed in the same context. If fluoxetine slows down systems consolidation (keeping hippocampal dependency), then we would expect a strong effect in the test under muscimol.

Repeated-measures ANOVA revealed that fluoxetine-treated animals were more sensitive to intrahippocampal muscimol than the control group during the test (group \times time (test vs. re-test) interaction ($F_{1,17} = 5.371$, $p = 0.033$; SNK post hoc $p < 0.05$); Fig. 2b). Thus fear generalization prevented by chronic fluoxetine seems to be strongly associated with hippocampal involvement during retrieval.



Chronic fluoxetine induces hippocampal structural rearrangement

Recent evidence suggests that systems consolidation involves an increase in dendritic spine density in the mPFC over time⁴⁵ together with a reduction in dendritic spines in

the hippocampus⁴⁶. We hypothesize that hippocampal dependency during retrieval is closely related to dendritic spine density and morphology. Animals treated with chronic fluoxetine or vehicle were perfused, and the brains removed for dendritic spine analysis in the dorsal hippocampus. Spine counts were performed on a total of 122 dendritic segments as follows: control ($n = 55$ segments, 1160.50 μm of total dendritic length analyzed, 3 rats), fluoxetine (67 segments, 1234.51 μm , 3 rats) (Fig. 3a).

Analysis of the cumulative probability distributions for the total density of dendritic spines reflected a significant rightward shift, toward higher numbers of dendritic spines in fluoxetine-treated animals compared to the control group ($p < 0.05$; KS test; Fig. 3b). Moreover, the fluoxetine group also showed a higher median (quartiles, total density/10 μm), 19.0 [13.3–21.4], with respect to the control group, 14.5 [12.1–16.4] (Mann–Whitney U test = 1162, $p < 0.001$). Similar to total dendritic spines, a significant rightward shift toward higher numbers of mushroom dendritic spines in the fluoxetine group compared to the control group was observed ($p < 0.05$; KS test; Fig. 3c). In parallel, a higher median (quartiles, mature spines/10 μm) in the fluoxetine group, 7.01 [4.67–8.85], was observed in comparison to the control group, 5.83 [4.38–7.08] (Mann–Whitney U test = 1394, $p < 0.001$). The analysis of stubby dendritic spines revealed no significant difference between the experimental groups ($p > 0.05$; KS test; Fig. 3d). There was a comparable median (quartiles, thin spines/10 μm) between the experimental groups, control 5.98 [4.93–7.90], fluoxetine 6.53 [4.58–9.07] (Mann–Whitney U test = 1394, $p < 0.001$). For thin dendritic spines, a significant rightward shift toward higher numbers of spines in the fluoxetine group compared to the control group was observed ($p < 0.05$; KS test; Fig. 3e). Similarly, a higher median (quartiles, mature spines/10 μm) in the fluoxetine group, 3.89 [2.45–5.22], was observed in comparison to the control group, 2.45 [1.48–3.41] (Mann–Whitney U test = 1043, $p < 0.001$). Our findings suggest that chronic fluoxetine induces a higher density of dendritic spines in the CA1 hippocampal area, indicating a potential mechanism underpinning the maintenance of hippocampal dependency during retrieval and consequently the prevention of memory generalization.

Discrimination between threat and safe context predicts subsequent fear extinction in naive animals

Our first experiment showed that chronic fluoxetine administration prevents generalization and enhances fear extinction. These results suggest that discrimination between the training and the novel context can be considered a potential predictor of the extinction outcome, in which memory generalization would impair fear extinction. To address this possibility, a large number of animals

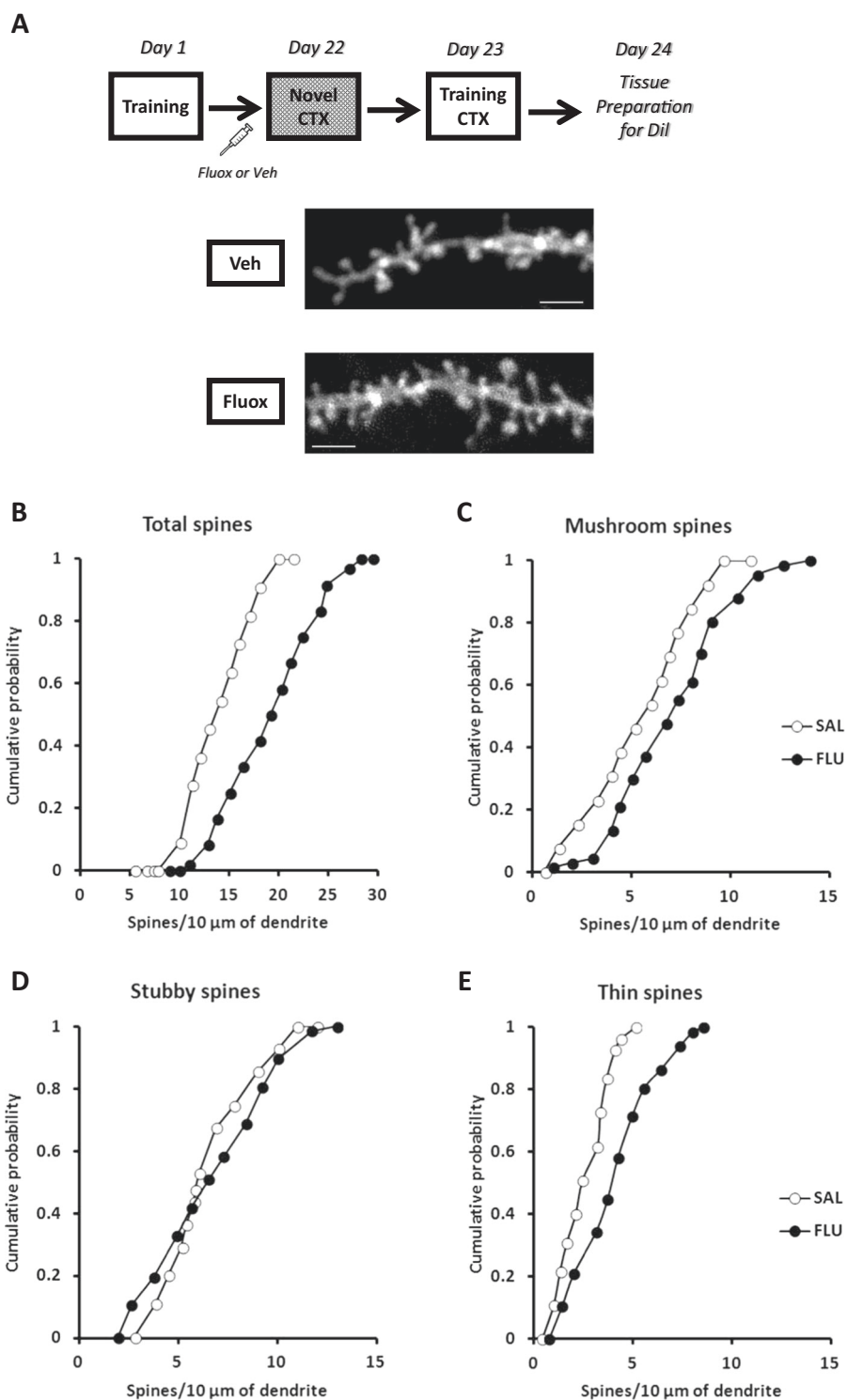
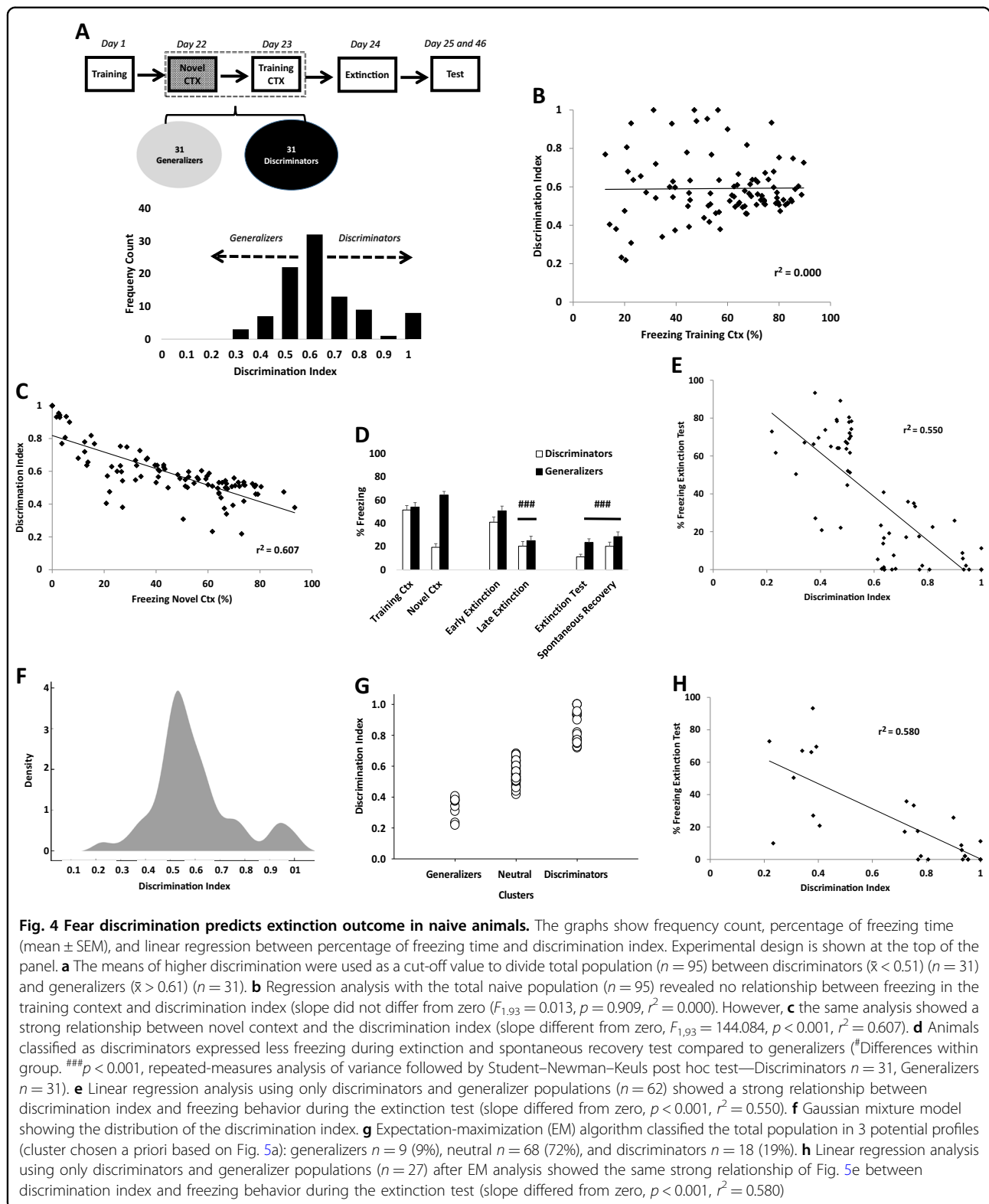


Fig. 3 Chronic fluoxetine induces hippocampal structural rearrangement. The graphs show cumulative probability of the spine density. Experimental design is shown at the top of the panel. **a** Representative examples of apical dendritic segments of CA1 dorsal hippocampal pyramidal neurons (stratum radiatum) selected for quantitative analysis of dendritic spines from animals of each experimental group. Bar scale: 2 μ m. Cumulative frequency of total (**b**), mushroom (**c**), stubby (**d**), and thin (**e**) dendritic spine (Kolmogorov–Smirnov test—Vehicle $n = 55$ segments, Fluoxetine $n = 67$ segments; 3 rats per group)



($n = 95$) were trained and tested in the same conditions as the first experiment, without any pharmacological treatment. First, we calculated a discrimination index [training

ctx/(training ctx + novel ctx)] for each animal in order to determine a frequency distribution (Fig. 4a). This analysis allowed us to identify that the vast majority of animals

have a discrimination ratio between $\bar{x} = 0.51$ and 0.61 ($n = 33$). This range was used as a cut-off value to divide the total population into two specific profile: generalizers ($\bar{x} < 0.51$) and discriminators ($\bar{x} > 0.61$).

A regression analysis conducted on the freezing levels in the training context and the discrimination index revealed that there was no relationship between these factors, since the slope did not differ from zero ($F_{1,93} = 0.013$, $p = 0.909$, $r^2 = 0.000$; Fig. 4b). However, a strong relationship was found between the novel context and the discrimination index (slope different from zero; $F_{1,93} = 144.084$, $p < 0.001$, $r^2 = 0.607$; Fig. 4c). This result suggests that the freezing expressed in the novel context drives fear discrimination.

After analyzing the behavioral profile of the total population, 31 animals were classified as discriminators and 31 as generalizers. As expected, repeated-measures ANOVA revealed higher discrimination and generalization rates (group \times context interaction ($F_{1,60} = 86.420$, $p < 0.001$; SNK post hoc $p < 0.001$). However, both groups expressed the same freezing levels in the training context (Fig. 4d).

Both groups were able to extinguish the fear response (time factor (early vs. late) ($F_{1,60} = 62.435$, $p < 0.001$). However, during the extinction and spontaneous recovery test, discriminators expressed less freezing levels than generalizers (group factor (test vs. spontaneous recovery) ($F_{1,60} = 4.278$, $p < 0.042$). This result suggests that discrimination between the training and the novel context is closely associated with a better extinction profile.

Surprisingly, regression analysis revealed a strong relationship between the discrimination index and freezing behavior during the extinction test (slope different from zero; $F_{1,60} = 73.389$, $p < 0.001$, $r^2 = 0.550$; Fig. 4e).

To further investigate whether these results could be influenced by the data selection method to generate discriminators and generalizers groups, we employed the unsupervised learning algorithm EM in the total population ($n = 95$). This algorithm estimates the maximum likelihood parameters from Gaussian mixture model^{40,41} (Fig. 4f). Number of clusters were chosen a priori based on our previous result (Fig. 4a). This analysis reduced the number of generalizer assigned animals to 9 (9%) and 18 (19%) for discriminators (Fig. 4g). However, even after decreasing the number of animals per group we found the same strong correlation between the discrimination index and freezing behavior during the extinction test (simple linear regression, slope different from zero; $F_{1,25} = 34.581$, $p < 0.001$, $r^2 = 0.580$; Fig. 4h).

Taken together, these results demonstrate, for the first time, that memory discrimination can be considered as a potential predictor of the extinction outcome. Our results were supported by two different methods of behavioral categorization. We conclude that better fear extinction

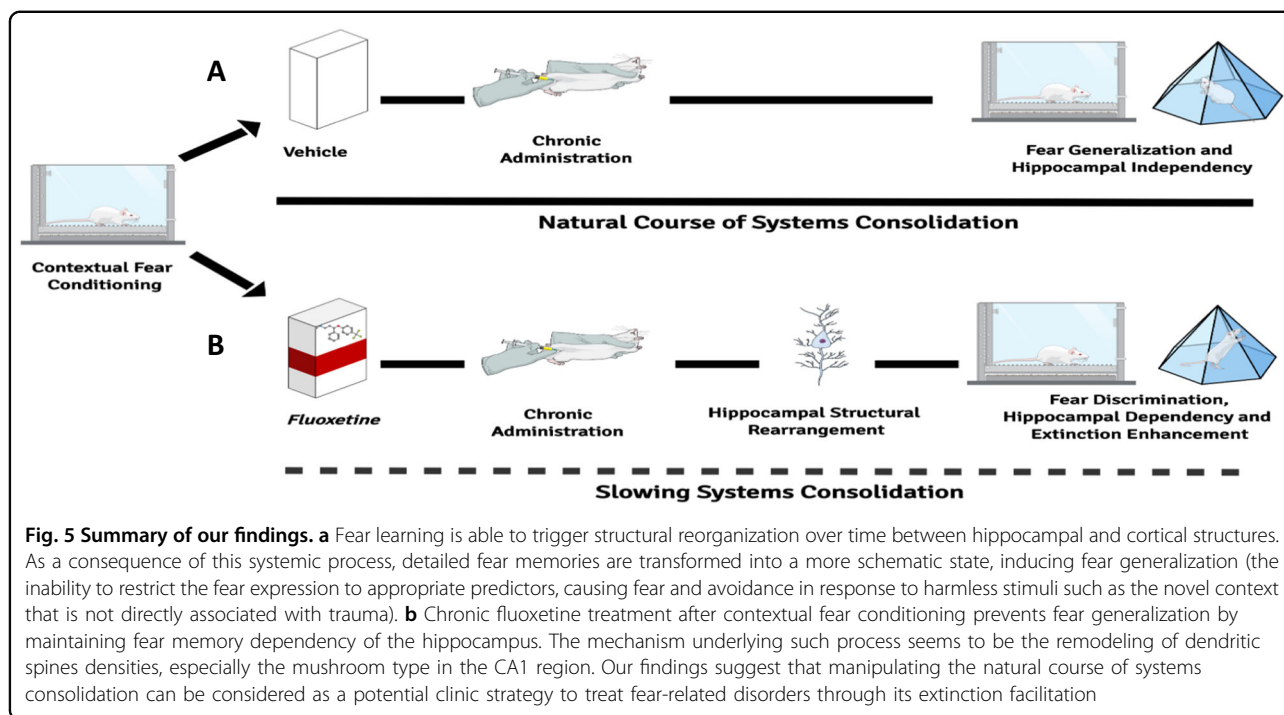
profile can be reached as a natural consequence of better discrimination between threat and safe.

Discussion

The current study showed that chronic fluoxetine administration after training, but not citalopram, prevents fear generalization and enhances subsequent fear extinction (Fig. 1a–b). Although fluoxetine after training did not prevent spontaneous recovery, a persistent fear reduction was reached when fluoxetine was chronically administered after extinction (Fig. 1e). Interestingly, fluoxetine increases hippocampal dependency, indicating that the treatment is able to delay the systems consolidation process (Fig. 2b). This result was accompanied by a higher density of dendritic spines in the CA1 region in animals treated with fluoxetine (Fig. 3a–e). Finally, in a large naive population, animals categorized as good discriminators showed a better extinction profile (similar to fluoxetine-treated animals), indicating that fear discrimination predicts extinction outcome (Fig. 4b–h).

Antidepressant drugs have been used for decades as the first-line pharmacological treatment for PTSD⁴⁷. However, there are several conflicting reports on their efficacy with and without exposure therapies^{48,49}. Our findings show that chronic fluoxetine, but not citalopram, prevents fear generalization and enhances fear extinction. This differential effect between antidepressant drugs of the same class is not entirely new. In fact, Burghardt et al.¹⁴ have shown that chronic citalopram administration impaired the acquisition of fear extinction, an effect closely related to the inhibition of NR2B-NMDA down-regulation in lateral and basal nuclei of the amygdala. These results contrast with the fear reduction enhancement promoted by chronic administration of fluoxetine in similar experimental settings¹³. Moreover, the antidepressant escitalopram is able to attenuate mood and anxiety dysfunction in a rodent PTSD model; however, it is insufficient to revert the impaired fear extinction⁵⁰. Taking together, SSRIs seem to modulate differentially fear-related responses, an observation currently validated in clinical population⁴⁹. Importantly, fluoxetine changes the quality, rather than the strength, of fear memories, since no difference was detected in freezing behavior in the training context, but there was a difference in the novel context.

Prevention of spontaneous recovery after extinction is one of the main challenges of behavioral and pharmacological therapies⁴². In our protocol, post-conditioning chronic fluoxetine was able to enhance extinction of contextual fear memories, as previously reported^{13,51}. Moreover, a persistent fear reduction was achieved when chronic fluoxetine was administered after extinction training. Altogether, these results indicate a dual window of opportunity to avoid fear memory: (i) by enhancing fear



extinction when fluoxetine is administered after conditioning, via slowing of fear generalization, and (ii) by preventing fear recovery after extinction.

A previous study has shown that fear generalization can be prevented by pharmacological treatments targeting glucocorticoid (Metyrapone) and noradrenergic (Propranolol) systems during training¹⁷. Interestingly, in that study, fear discrimination was closely associated with hippocampal involvement during retrieval. Here chronic fluoxetine administration was able to increase hippocampal dependency and prevent fear generalization, suggesting that fluoxetine delays the systems consolidation rate. The transition from hippocampus dependence to hippocampus independence is thought to render memories into a more schematic, generalized state^{25,26}. Additionally, remote memories submitted to this reorganization process seem to be less susceptible to modification or to update^{52,53} and are largely influenced by fear incubation⁵⁴. We suggest that manipulating the systems consolidation rate (i.e., by slowing it down) allows the expansion of the therapeutic window for treating fear-related disorders. This means that preserving hippocampal involvement during retrieval and fear discrimination could be a potential clinical approach to enhance subsequent fear extinction.

The hippocampal dependency induced by chronic fluoxetine was accompanied by a remarkable structural rearrangement in the CA1 region. Remodeling of dendritic spines seems to guide memory reorganization between hippocampal and cortical structures^{46,55–57}.

Recently, it has been shown that an immature engram is formed in the mPFC after training, before the process of systems consolidation occurs over time. This maturation process involves a substantial increase in dendritic spines in the mPFC, a structure previously associated with retrieval of generalized memories^{23,24}, and a decrease in the hippocampus^{45,46}. In our study, fluoxetine treatment modulates remodeling of dendritic spines in the hippocampus, particularly the mature, mushroom type. We assume that the increase in dendritic spines in the hippocampus is one of the mechanisms underpinning the maintenance of hippocampal dependency over time (by slowing down systems consolidation) thus prevent fear generalization and ultimately facilitates extinction. That is, both systems consolidation and memory generalization are controlled by a switch of hippocampal–cortical spine remodeling susceptible to manipulation, which in turn affects subsequent fear extinction (see Fig. 5 for a summary of the findings).

The hypothesis that fear discrimination predicts the extinction outcome was confirmed in subsequent experiments in a large naive population; these studies showed a strong correlation between the discrimination rate and fear extinction using two different methods of behavioral categorization. Indeed, animals classified as good discriminators expressed a similar extinction profile to fluoxetine-treated animals. This result indicates that basal fear discrimination guides fear reduction during/after extinction. Therefore, interventions that keep memory precise and prevent fear generalization would be

a promising therapeutic strategy to enhance fear extinction in PTSD.

Although SSRIs such as fluoxetine have been widely used to treat psychiatric disorders, the mechanisms responsible for the clinical improvements are still a matter of debate^{8,9}. This study shed new light on the neurobiological process involved in the therapeutic mechanisms of fluoxetine. In fact, it has been previously shown that the mood-improving effects of fluoxetine rely on hippocampus remodeling via dendritic spine remodeling¹². In the current study, we confirmed this finding; we observed a spine remodeling induced by chronic fluoxetine treatment and extended those findings by revealing an association between dendritic spine morphology, fear generalization, and the maintenance of hippocampus-dependent memory. However, one remaining question after the experimental setting shown here and in other studies^{13,14} are the molecular and structural difference induced by fluoxetine and citalopram treatment that induce different outcomes in fear conditioning experiments.

In conclusion, we have shown that (i) chronic fluoxetine but not citalopram enhances fear discrimination and subsequent fear extinction; (ii) fluoxetine is effective in preventing fear recovery when administered after extinction training; (iii) fluoxetine slows down systems consolidation; and (iv) fluoxetine increases dendritic spine density in the hippocampus. Finally, we showed, for the first time that (v) individual differences in fear discrimination predict extinction performance. These results offer a new strategy for the treatment of fear-related disorders based on maintaining fear discrimination and hippocampal dependency. Our findings could contribute to explaining variable responses to pharmacological and behavioral interventions.

Acknowledgements

We thank Dr. Yuichi Takeuchi for helpful comments on the manuscript and Zelma Regina for her competent and kind technical assistance. This research was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) grants and Universal-2014 (process number 440413/2014–1).

Author details

¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, Biosciences Institute, Porto Alegre 91.501-970, Brazil. ²Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90.046-900, Brazil. ³Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Biophysics Department, Biosciences Institute, Porto Alegre 91.501-970, Brazil. ⁴Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Authors' contributions

L.K.P. and L.d.O.A. designed the study. L.K.P., R.O.S., F.N.L., W.N.-S., and M.G. performed the experiments and analyzed the data. L.K.P., R.O.S., and L.d.O.A. wrote the manuscript. All authors have reviewed the manuscript.

Compliance with ethical standard

All experiments were performed in accordance to the national animal care legislation and guidelines (Brazilian Law 11.794/2008) and approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 1 September 2018 Revised: 16 November 2018 Accepted: 1 January 2019

Published online: 31 January 2019

References

- Jovanovic, T., Kazama, A., Bachevalier, J. & Davis, M. Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology* **62**, 695–704 (2012).
- Lopresto, D., Schipper, P. & Homberg, J. R. Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Neurosci. Biobehav.* **60**, 31–42 (2016).
- Kaczurkin, A. N. et al. Neural substrates of overgeneralized conditioned fear in PTSD. *Am. J. Psychiatry* **174**, 125–134 (2017).
- Jonas, D. E. et al. *Psychological and Pharmacological Treatments for Adults with Posttraumatic Stress Disorder (PTSD)* (Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville (MD), 2000).
- Archbold, G. E., Bouton, M. E. & Nader, K. Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 1303–1311 (2010).
- Bouton, M. E. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol. Psychiatry* **52**, 976–986 (2002).
- Ravindran, L. N. & Stein, M. B. Pharmacotherapy of PTSD: premises, principles, and priorities. *Brain Res.* **1293**, 24–39 (2009).
- Berton, O. & Nestler, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 137–151 (2006).
- Castrén, E. & Hen, R. Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci.* **36**, 259–267 (2013).
- Santarelli, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805–809 (2003).
- Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F. & Hen, R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J. Neurosci.* **28**, 1374–1384 (2008).
- Bessa, J. M. et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol. Psychiatry* **14**, 764–773 (2009). 739.
- Karpova, N. N. et al. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science* **334**, 1731–1734 (2011).
- Burghardt, N. S., Sigurdsson, T., Gorman, J. M., McEwen, B. S. & LeDoux, J. E. Chronic antidepressant treatment impairs the acquisition of fear extinction. *Biol. Psychiatry* **73**, 1078–1086 (2013).
- McAvoy, K., Russo, C., Kim, S., Rankin, G. & Sahay, A. Fluoxetine induces input-specific hippocampal dendritic spine remodeling along the septo-temporal axis in adulthood and middle age. *Hippocampus* **25**, 1429–1446 (2015).
- de Oliveira Alvares, L. et al. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* **22**, 1092–1095 (2012).
- Pedraza, L. K. et al. The dynamic nature of systems consolidation: stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus* **26**, 362–371 (2016).
- Wiltgen, B. J. et al. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr. Biol.* **20**, 1336–1344 (2010).
- Haubrich, J. et al. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus* **26**, 924–932 (2016).

20. Pedraza, L. K. et al. Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus* **27**, 518–528 (2017).
21. Frankland, P. W., Bontempi, B., Tolton, L. E., Kaczmarek, L. & Silva, A. J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* **304**, 881–883 (2004).
22. Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C. & Jaffard, R. Time dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* **400**, 671–675 (1999).
23. Einarsson, E. Ö., Pors, J. & Nader, K. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology* **40**, 480–487 (2015).
24. Cullen, P. K., Gilman, T. L., Winiecki, P., Riccio, D. C. & Jasnow, A. M. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol. Learn. Mem.* **124**, 19–27 (2015).
25. Moscovitch, M. et al. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J. Anat.* **207**, 35–66 (2005).
26. Winocur, G., Moscovitch, M. & Sekeres, M. Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat. Neurosci.* **10**, 555–557 (2007).
27. Winocur, G. & Moscovitch, M. Memory transformation and systems consolidation. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **17**, 766–780 (2011).
28. Tonegawa, S., Morrissey, M. D. & Kitamura, T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 485–498 (2018).
29. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th edn (Academic Press, San Diego, 2007).
30. Silva, R. C. & Brandão, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **65**, 209–216 (2000).
31. Burghardt, N. S., Bush, D. E., McEwen, B. S. & LeDoux, J. E. Acute selective serotonin reuptake inhibitors increase conditioned fear expression: blockade with a 5-HT(2C) receptor antagonist. *Biol. Psychiatry* **62**, 1111–1118 (2007).
32. Tyler, W. J. & Pozzo-Miller, L. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J. Physiol.* **1**, 497–509 (2003).
33. Calfa, G. et al. HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* **22**, 1493–1500 (2012).
34. Giachero, M., Calfa, G. D. & Molina, V. A. Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. *Learn. Mem.* **20**, 611–616 (2013).
35. Pozzo-Miller, L. D., Inoue, T. & Murphy, D. D. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* **81**, 1404–1411 (1999).
36. Murphy, D. D. & Segal, M. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.* **16**, 4059–4068 (1996).
37. Chapleau, C. A., Larimore, J. L., Theibert, A. & Pozzo-Miller, L. Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. *J. Neurodev. Disord.* **1**, 185–196 (2009).
38. Koh, I. Y., Lindquist, W. B., Zito, K., Nimchinsky, E. A. & Svoboda, K. An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural Comput.* **14**, 1283–1310 (2002).
39. Boda, B. et al. The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J. Neurosci.* **24**, 10816–10825 (2004).
40. Ciochi, S. et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature* **468**, 277–282 (2010).
41. Grosso, A., Santoni, G., Manassero, E., Renna, A. & Sacchetti, B. A neuronal basis for fear discrimination in the lateral amygdala. *Nat. Commun.* **9**, 1214 (2018).
42. Vervliet, B., Craske, M. G. & Hermans, D. Fear extinction and relapse: state of the art. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **9**, 215–248 (2013).
43. Markowitsch, H. J. et al. Searching for the anatomical basis of retrograde amnesia. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* **15**, 947–967 (1993).
44. Teng, E. & Squire, L. R. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* **400**, 675–677 (1999).
45. Kitamura, T. et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science* **356**, 73–78 (2017).
46. Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B. & Ammassari-Teule, M. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J. Neurosci.* **29**, 8206–8214 (2009).
47. Ipser, J. C. & Stein, D. J. Evidence-based pharmacotherapy of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **15**, 825–840 (2012).
48. Hoskins, M. et al. Pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Psychiatry* **206**, 93–100 (2015).
49. Hertzberg, M. A., Feldman, M. E., Beckham, J. C., Kudler, H. S. & Davidson, J. R. Lack of efficacy for fluoxetine in PTSD: a placebo-controlled trial in combat veterans. *Ann. Clin. Psychiatry* **12**, 101–105 (2000).
50. Lin, C. C., Tung, C. S. & Liu, Y. P. Escitalopram reversed the traumatic stress-induced depressed and anxiety-like symptoms but not the deficits of fear memory. *Psychopharmacology (Berl.)* **233**, 1135–1146 (2016).
51. Deschaux, O., Spennato, G., Moreau, J. L. & Garcia, R. Chronic treatment with fluoxetine prevents the return of extinguished auditory-cued conditioned fear. *Psychopharmacology (Berl.)* **215**, 231–237 (2011).
52. Gräff, J. et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell* **156**, 261–276 (2014).
53. Clem, R. & Huganir, R. L. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science* **330**, 1108–1112 (2010).
54. Pickens, C. L., Golden, S. A., Adams-Deutsch, T., Nair, S. G. & Shaham, Y. Long-lasting incubation of conditioned fear in rats. *Biol. Psychiatry* **65**, 881–886 (2009).
55. Lesburgueres, E. et al. Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science* **331**, 924–928 (2011).
56. Vetere, G. et al. Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 8456–8460 (2011).
57. Aceti, M., Vetere, G., Novembre, G., Restivo, L. & Ammassari-Teule, M. Progression of activity and structural changes in the anterior cingulate cortex during remote memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **123**, 67–71 (2015).

3.3 Resultados preliminares: Caracterização eletrofisiológica da generalização da memória em animais em livre movimento e intervenção em circuito fechado para o melhoramento da extinção.

Os resultados aqui demonstrados são preliminares (não publicados), sendo os experimentos realizados na *University of Szeged*, na Hungria, sob supervisão do Dr. Berényi Antal durante um estágio de doutorado.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados nestes experimentos ratos adultos machos da linhagem Long-Evans (220-300g). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os padrões de experimentação animal da União Europeia e do Instituto Nacional para o Uso e Cuidado de Animais Experimentais.

Cirurgia

Os animais foram anestesiados com Isoflurano e cronicamente implantados para registro intra-cortical com eletrodos de tungstênio com diâmetro de 50 μ m (Tungsten 99.95%, California Fine Wire, Grover Beach, CA, USA) inseridos em cânulas guia de 180- μ m de diâmetro (Vita Needle Company, Needham, MA, USA) de diâmetro. Cada cânula guia possui 3 eletrodos com distância de 400 μ m no plano vertical entre as pontas (local de registro). A impedância dos eletrodos varia entre 30–90 k Ω a 1 kHz. O número de eletrodos implantados foi modificado dependendo do tamanho da estrutura. Assim, cada animal foi implantado no córtex pré-frontal medial (6 eletrodos), amígdala central e basolateral (6 eletrodos), hipocampo dorsal (9 eletrodos) e hipocampo ventral (6 eletrodos), completando 28 canais de registro por animal. Em experimentos que implicassem a detecção precisa de eventos hipocâmpais, um *multidrive* contendo 8 cânulas (cada uma com um canal de registro foi implantado para permitir o movimento vertical individual de cada um dos eletrodos).

Os eletrodos foram verticalmente guiados até a estrutura desejada por meio das cânulas e com prévia craniotomia (Figura 5). As pontas das cânulas permaneceram em todos os casos 1mm acima do córtex. Os buracos para cada implante foram fechados com silicone

não condutivo (Dow Corning Corporation, Auburn, MI, USA) e finalmente fixados com acrílico dental (Duracryl™ Plus, Spofa Dental, Jičín, Czech Republic).

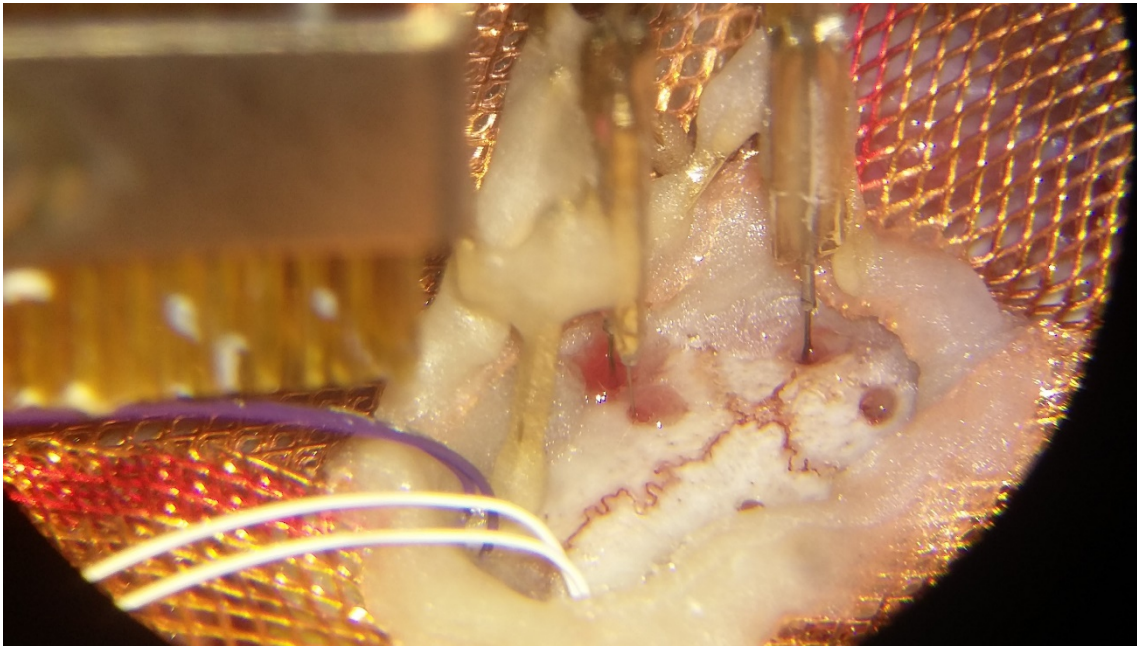


Figura 5: Implante de eletrodos intracranianos. Os eletrodos são guiados até a estrutura alvo por meio de cânulas que permanecem acima do córtex. O processo de fixação é realizado por meio de acrílico dental. Cada cânula possui 3 eletrodos com distância de 400 μm no plano vertical entre os locais de registro.

Dois parafusos em miniatura foram implantados acima do cerebelo como ponto de aterramento e referência. Adicionalmente, 5 parafusos foram posicionados no crânio para manter o implante. Finalmente um *copper mesh* foi fixado ao redor do crânio com acrílico dental onde foram conectados os fios provenientes dos eletrodos de aterramento e referência agindo como uma caixa de Faraday (Figura 6). Esse passo final permitiu proteger os locais de implante assim como diminuir o ruído elétrico do ambiente (Figura 7).



Figura 6: Implante de *copper mesh*. Quatro fragmentos de *copper mesh* são posicionados ao redor do crânio onde os fios de aterramento e referência são conectados. O *copper mesh* ao redor do implante permite diminuir o ruído ambiental durante os registros.



Figura 7: Representação do implante final após cirurgia. Nesta imagem observa-se a caixa de *copper mesh* final junto com os eletrodos implantados e o *headstage* que pode ser conectado ao *Omnetics* após a cirurgia ou somente no início do experimento.

Os animais tiveram 7 dias de recuperação antes da primeira habituação ao sistema de registro que consistia em cabos provenientes de um amplificador (KJE-1001, Amplipex Ltd, Hungary) e um *headstage* em união a um conector *Omnetics*. Em todas as condições de registro, o animal teve livre movimento (Figura 8).



Figura 8: Animal após o implante em livre movimento. O sistema de registro permite o livre movimento do animal nas tarefas comportamentais assim como na caixa moradia. O sistema atualmente consegue o registro contínuo durante 24h até por 4 meses.

Protocolo Comportamental

Condicionamento aversivo ao som: ao longo do experimento os animais foram expostos a três compartimentos diferentes como descrito a seguir.

Contexto A (habituação, teste do condicionamento e teste da extinção): caixa quadrada $52 \times 52 \times 18$ cm, chão liso e paredes com listras brancas e pretas em orientação vertical, com espessura de 1 cm cada uma.

Contexto B (treino): caixa de dimensões $40 \times 30 \times 18$ cm, com grade elétrica, paredes de cor homogênea cinza e textura rugosa.

Contexto C (extinção): caixa quadrada $52 \times 52 \times 18$ cm, chão liso, paredes com quadrados, sem textura e parede frontal transparente.

Habituação (dia 0): Os animais foram expostos a 2 estímulos auditivos diferentes (2.5 ou 7.5 kHz, 85 dB, 30 s). O intervalo entre cada estímulo foi randomizado entre 20 e 120 s. Depois de 2min de habitação no compartimento os estímulos foram apresentados aleatoriamente, sendo no total 5 apresentações do estímulo (CS+) e 5 apresentações do (CS-). Depois de 2min da última apresentação, os animais foram retirados do compartimento e levados para sua caixa moradia.

Treino (dia 1): No dia do condicionamento os animais foram expostos ao mesmo protocolo da habituação no contexto B, no entanto, um dos estímulos, chamado de CS+, foi pareado com um choque nas patas (0.4mA ou 1mA, 2 s). O segundo estímulo, chamado de CS-, não foi pareado com nenhuma consequência aversiva. A frequência escolhida como CS+ foi contrabalanceada ao longo do experimento. O intervalo entre cada estímulo foi randomizado entre 20 e 120 s.

Teste (dias 2 e 3): os animais foram expostos ao contexto A. Um dos estímulos, CS+ ou CS- foi apresentado 5 vezes para avaliar a evocação da memória. No dia seguinte, o mesmo protocolo foi realizado para o estímulo oposto. O intervalo entre cada estímulo foi randomizado entre 20 e 120 s.

Sessão de Extinção (dia 5): os animais foram expostos ao contexto C, onde foi apresentado 20 vezes o estímulo CS+ visando induzir a extinção. O intervalo entre cada estímulo foi randomizado entre 20 e 120 s.

Teste da extinção (dia 6): os animais foram expostos ao contexto A, onde a evocação ao estímulo CS+ foi avaliado por meio da sua apresentação 5 vezes. O intervalo entre cada estímulo foi randomizado entre 20 e 120 s.

Registros eletrofisiológicos

Os registros eletrofisiológicos foram realizados durante as fases do protocolo experimental, assim como na caixa moradia após a habituação e o treino. Os animais foram mantidos individualmente em caixas adaptadas (42 × 38 x 18 cm) para registro contínuo de 24 h com comida e água *ad libitum* em condições de livre movimento. O implante exige que os animais sejam isolados com o intuito de evitar danos no sistema de registro. Nessas condições tem sido possível o monitoramento eletrofisiológico até por 4 meses contínuos (Kozák e Berényi, 2017).

Os registros eletrofisiológicos foram pré-amplificados 400×, multiplexados no *headstage* e armazenados para depois serem digitalizados a 500 Hz (*sampling rate*) para cada canal (KJE-1001, Amplipex, Szeged, Hungary).

Deteção em tempo real de oscilações de alta frequência (ripples) no hipocampo dorsal e estimulação elétrica intracranial

De forma concomitante com os registros eletrofisiológicos, os sinais pré-amplificados foram analisados em tempo real por meio de processador de sinais digitais (RX-8, Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA) e um algoritmo customizado para a detecção de ripples no hipocampo dorsal. O potencial de campo local (do inglês, Local Field Potential, (LFP)) de animais implantados com eletrodos fixos ou por meio de um “*multidrive*” que permitia o movimento de eletrodos de forma individual com o intuito de atingir a camada piramidal, foi “*demultiplexed*” e a densidade de corrente calculada. O sinal escolhido para a detecção em tempo real foi baseado em verificação manual

diretamente nos registros eletrofisiológicos (ver figura 9). O sinal foi submetido a um filtro de passagem corresponde à banda de ripples hipocampais (100-250 Hz), e sinais com frequência maiores ou menores foram eliminados. A detecção da banda de ripples hipocampais foi em tempo real utilizada para gerar uma estimulação elétrica intracranial do fascículo do prosencefalo medial com prévio implante de um eletrodo bipolar. A estimulação consistiu em um trem de 100ms composto de 14 pulsos de 1ms com forma quadrada negativa (140 Hz) a traves de um estimulador (STG4008; Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany). O tempo de estimulação total foi dependente do experimento realizado. Os parâmetros de detecção foram ajustados para cada um dos animais utilizados no experimento considerando a heterogeneidade de amplitude e frequência de ripples dentro e entre animais. Um input digital foi programado para sinalizar a detecção em tempo real do ripple hipocampal que foi utilizado posteriormente para quantificar a expressão de ripples nas sessões experimentais.

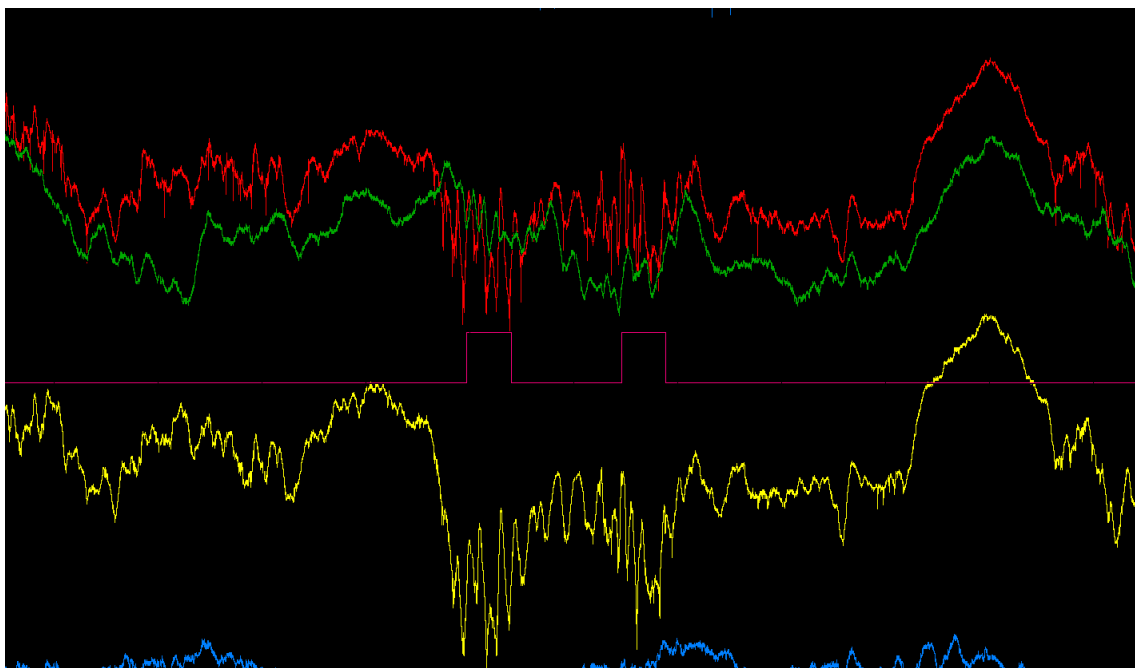


Figura 9. Output do sistema de registro e processamento em tempo real.

Aquí podem ser verificados ripples do hipocampo dorsal na camada piramidal de CA1 (oscilações de alta frequência em vermelho e amarelo). Neste animal em particular, o algoritmo usou o sinal em vermelho para a detecção. A visualização da detecção foi facilitada por um output digital ao sistema de registro (quadrado em rosa) que permitia a verificação manual da detecção. A precisão da detecção foi determinada por

meio uma taxa de falsos positivos e falsos negativos produto da detecção automática e de um experimentador com experiência no reconhecimento de ripples.

Análise *off-line*

Nos registros na caixa moradia, os períodos de sono de movimento ocular dos olhos (REM), sono de ondas lentas (SWS) e vigília foram detectados *off-line* por meio da razão do potencial de campo da banda theta (5–11 Hz) sobre a banda delta (1–4 Hz), junto com eletrodos de eletromiografia implantados no pescoço do animal (EMG). A classificação também foi apoiada em registros de vídeo contínuos do comportamento do animal.

Análise Estatística

Todos os dados aqui apresentados são paramétricos. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov e a homocedasticidade das variâncias por meio do teste de Levene. Os dados são expressos como média + erro padrão (E.P.). As comparações entre grupos experimentais foram realizadas mediante teste t para amostras independentes/pareadas ou com Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA de medidas repetidas), seguida pelo teste de comparações múltiplas Student–Newman–Keuls (SNK). Para todos os experimentos o p foi estabelecido em 0.05.

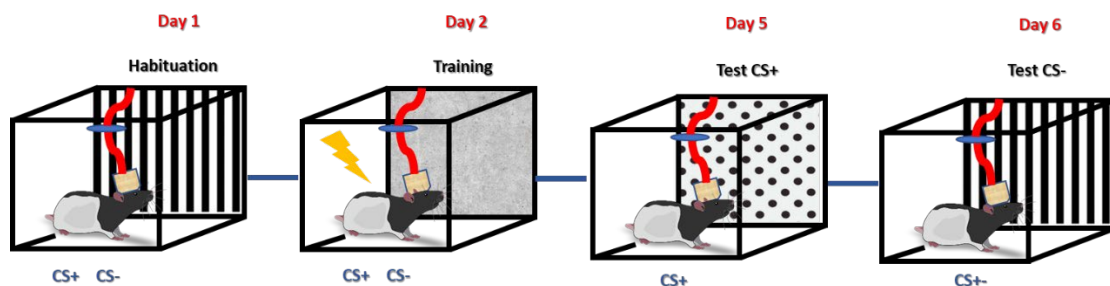
Resultados

Padronização de um protocolo de generalização usando o condicionamento aversivo ao som

A primeira condição para explorar as propriedades eletrofisiológicas de memórias precisas e generalizadas, foi a padronização de um protocolo no laboratório da Hungria, onde o fenômeno não tinha sido investigado anteriormente. Considerando que a generalização é um processo mais rápido em memórias a estímulos discretos em comparação com memórias contextuais (Bundel et al., 2016; Pedraza et al., 2016) e que a qualidade dos registros depende diretamente do tempo do implante (Andersen et al., 2004; Souza et al., 2019) em Aqui, decidimos usar o condicionamento aversivo ao som onde o fenômeno pode ser avaliado 24h após o treino. Os animais foram habituados por meio da exposição a 10 estímulos auditivos de diferentes frequências (2.5 ou 7.5 kHz, 85 dB, 30 s). No treino, um dos estímulos foi escolhido para ser pareado com um choque nas patas de 0.4mA ou 1mA; dito estímulo foi chamado de CS+. O estímulo que não foi

contingente com consequência aversiva nenhuma foi chamado de CS-. Dois dias de teste foram realizados, um para cada som onde o estímulo foi apresentado 5 vezes por sessão. A extinção consistiu na apresentação do CS+ durante 20 vezes. No dia seguinte o teste da extinção foi realizado com a apresentação 5 vezes do CS+. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo para a interação entre as variáveis grupo x sessão (habituação-treino-teste) ($F(2,56)=40.021$, $P<0.001$) e grupo x estímulo (CS+ ou CS-) ($F(2,56)=4.889$, $P<0.001$). O teste post-hoc Student–Newman–Keuls (SNK) mostrou que ambos os grupos apresentam elevados níveis de congelamento durante o teste ao CS+ comparado com o congelamento na habituação ao mesmo estímulo ($P<0.01$) demonstrando que os dois grupos conseguem aprender o condicionamento. No entanto somente o grupo com treino de 1mA apresentou níveis elevados de congelamento durante o CS- no teste quando comparado com o CS- na habituação ($P<0.01$). Ao longo das sessões de treino e teste, o grupo treinado com 1mA mostrou maiores níveis de congelamento em relação ao grupo 0.4mA para ambos os sons ($P<0.01$).

Durante a extinção, ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo só para o fator tempo (extinção inicial-extincao final-teste) ($F(2,28)=3,590$, $P<0,049$). O teste post-hoc Student–Newman–Keuls (SNK) mostrou que o grupo treinado com 1mA apresenta uma diminuição do congelamento no final da extinção comparado com os primeiros ensaios ($P<0.01$), no entanto o congelamento tende a diminuir no teste somente no grupo treinado com 0.4mA ($P=0.052$). Ao longo da sessão de extinção e teste da extinção, o grupo treinado com 1mA mostrou maiores níveis de congelamento comparado com o grupo treinado com 0.4mA ($P<0.05$).



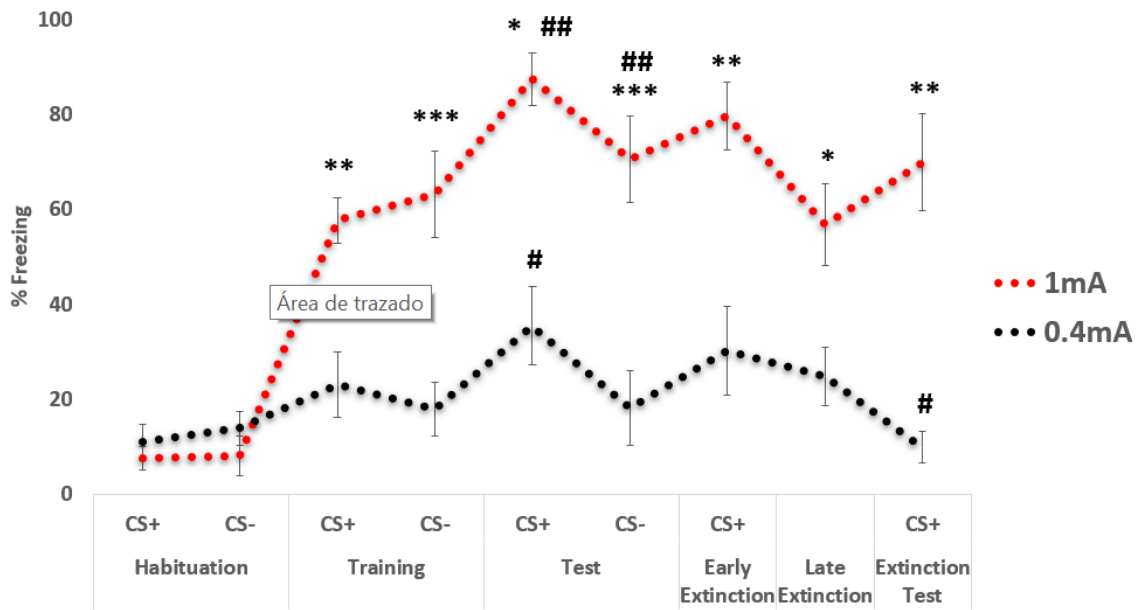


Figura 10: Resumo dos resultados após padronização da generalização no condicionamento aversivo ao som. Em comparação com animais treinados com uma intensidade elevada, animais com 0.4mA apresentam uma quantidade de congelamento diminuída e o estabelecimento de uma extinção efetiva em uma só sessão de extinção de 20 apresentações do CS+. Considerando a elevada taxa de generalização e resistência ao protocolo padrão de extinção, o treino de 1mA se mostrou eficiente para modelar processos de resistência a inibição do medo.

Adicionalmente, com o intuito de validar a generalização ou discriminação em nosso protocolo, foi utilizado o mesmo index como estabelecido no artigo 2, mas considerando o tempo de congelamento para cada estímulo, CS+ e CS-. Aqui, ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo para a interação entre as variáveis grupo x sessão (habituação-treino-teste) ($F(2,28)=8.641, P=0.001$). O teste *post-hoc* Student–Newman–Keuls (SNK) mostrou que animais treinados com 0.4mA conseguem discriminar melhor entre os dois estímulos quando comparados com o grupo treinado com 1mA durante o treino e teste ($P < 0.05$) (Figura 11).

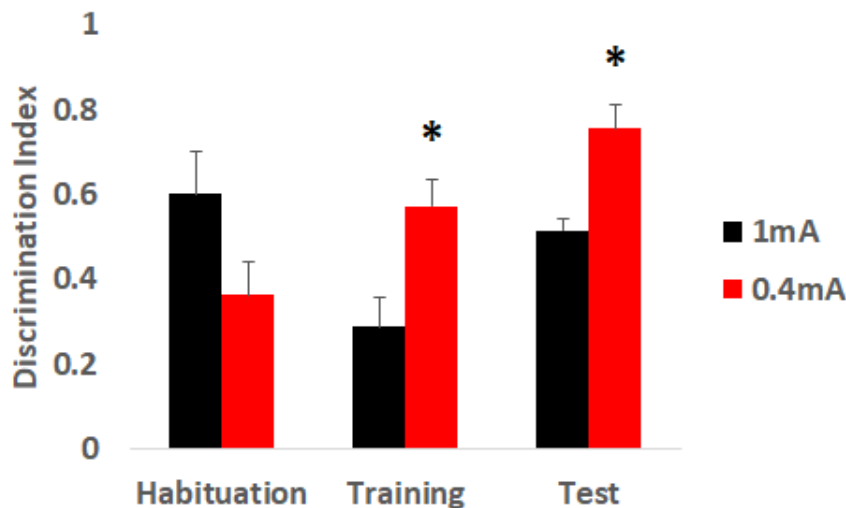
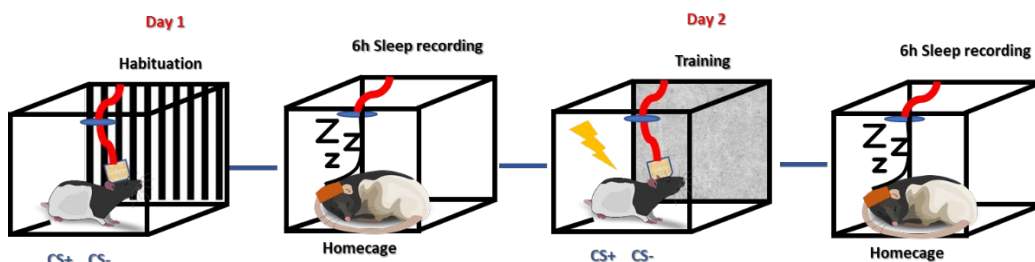


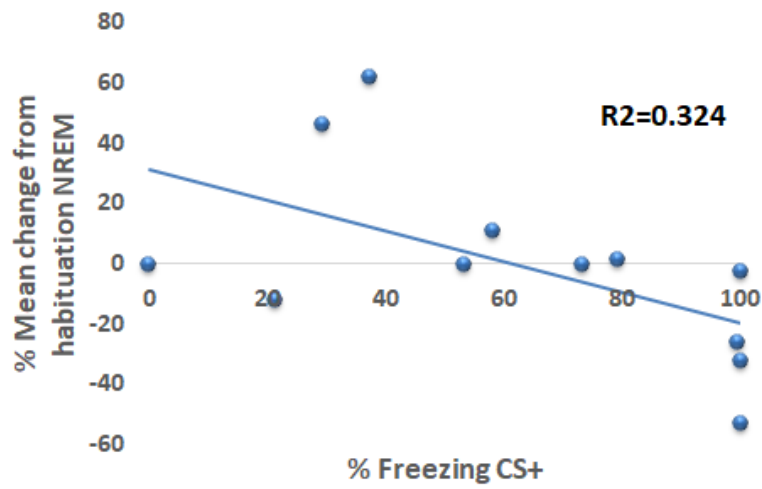
Figura 11: Índice de discriminação entre CS+ e CS-. Animais treinados com o protocolo mais baixo mostraram maior discriminação aos estímulos durante o treino e o teste.

Aumento do tempo em sono não REM após o treino correlaciona com o congelamento ao CS+ e CS- durante o teste, independente da intensidade do treino

Considerando que a arquitetura do sono (Rauchs et al., 2005) assim como eventos eletrofisiológicos como as ondulações de alta frequência (ripples 100-250Hz) no hipocampo, e spindles no córtex, tem sido mostrados como causais no processo de consolidação da memória (Girardeau et al., 2009), foram realizados registros durante 6h após o condicionamento ao som para verificar a incidência de diferentes episódios de sono (REM e não REM) e vigília. Nenhuma diferença na arquitetura do sono foi verificada nos grupos quando comparados no período de sono pós-habituação e pós-treino (dados não demonstrados), no entanto, independente da intensidade do treino, a mudança na incidência do sono não REM entre a habituação e o treino se mostrou correlacionada negativamente com o congelamento ao estímulo CS+ ($F_{1, 10} = 4.814, p < 0.05, r^2 = 0.324$) e CS- ($F_{1, 10} = 4.659, p < 0.05, r^2 = 0.317$) (Figura 12).



(A)



(B)

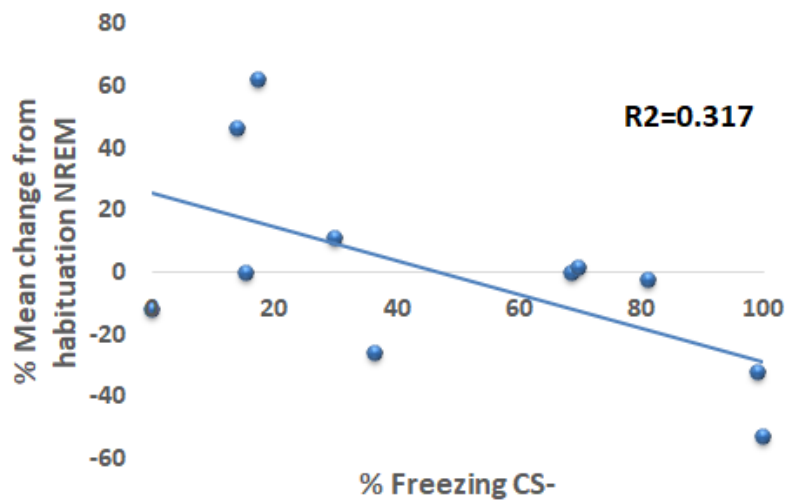


Figura 12: Correlação negativa entre a mudança em sono não REM entre habituação e treino comparada com o congelamento ao estímulo CS+ e CS-. Independente do tipo de estímulo auditivo, animais mostraram que o aumento na porcentagem de tempo em sono não REM entre habituação e o treino se encontra negativamente correlacionado com o congelamento.

A estimulação elétrica em circuito fechado entre a detecção das oscilações de alta frequência (ripples) no hipocampo dorsal e o feixe medial do prosencéfalo facilita a extinção da memória em animais treinados com altas intensidades

Estudos tem sugerido uma relação causal entre os ripples hipocampais e a consolidação da memória (Girardeau et al., 2009). Por outro lado é conhecida a dependência contextual do processamento de extinção (para uma revisão detalhada ver Maren et al., 2013), assim, a expressão reduzida de medo após a exposição prologanda aos estímulos condicionados pode ser favorecida pela reativação no contexto seguro onde ocorreu a extinção (Dunsmoor et al., 2015). Esse cenário tem intensificado a pesquisa em torno dos mecanismos e estratégias que poderiam generalizar o processo de extinção, isto é, manter níveis de medo menores mesmo perante mudanças contextuais (Noble et al., 2019; Craske et al., 2018). Neste experimento sugerimos que, a dependência contextual da extinção engatilha os ripples hipocampais nas sessões posteriores ao treino, sendo possível que a sua manipulação influa diretamente no traço da memória de extinção.

No primeiro experimento testamos o processo de extinção durante uma exposição única que envolvia a apresentação de 20 vezes do CS+ sem a consequência aversiva. Como pode ser observado na figura 13, animais treinados com choques de 0.4mA expressam baixos níveis de freezing atingindo uma extinção significativa 24h após a sessão quando comparado o congelamento com os primeiros 5 tons no dia da extinção ($t(7) = 2.729$; $p = 0.029$, teste t dependente), no entanto animais submetidos ao treino intenso com 1mA não apresentam mudanças ao longo da extinção e teste. Esses resultados sugerem que em comparação com intensidades de treino menores, uma sessão de extinção é insuficiente para induzir extinção em animais condicionados com intensidade de treino elevadas (Figura 13).

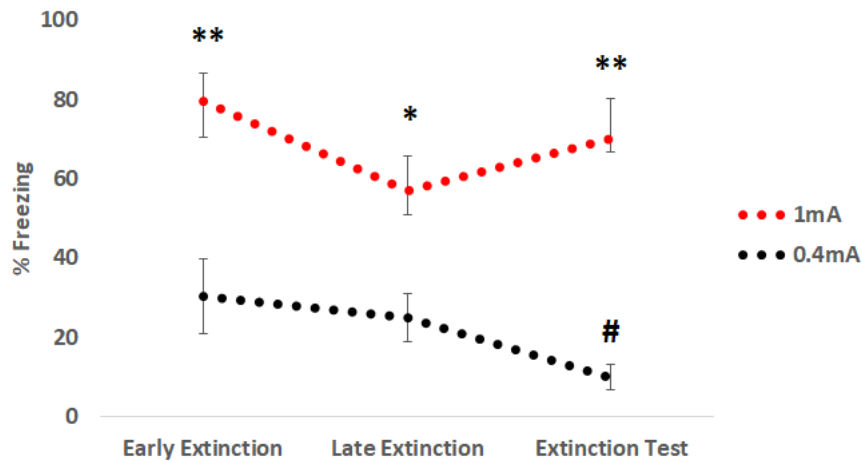


Figura 13. Protocolo de sessão única de extinção (CS+ x 20). Animais treinados com 0.4mA além de apresentarem níveis de congelamento menores, conseguem uma extinção efetiva que foi verificada durante o teste. Animais submetidos ao treinamento intenso (1mA) se mostram resistentes à extinção.

Verificada a resistência à extinção em animais com 1mA, foi estabelecido um critério de remissão como sugerido por Shumake e colaboradores (2018). Em nosso protocolo, animais atingindo 80% de redução de congelamento comparado com aquele apresentado no teste, seriam considerados remitidos e o processo de extinção terminaria. Para essa finalidade, o critério dependeu do congelamento expressado nos primeiros 5 tons de cada sessão de extinção como medida de consolidação da extinção do dia imediatamente anterior. Foi estabelecido um máximo de 7 sessões de extinção para atingir o critério. Cada sessão de extinção consistiu na apresentação de 20 tons (CS+), seguidos de 1 hora de intervenção em circuito fechado ou aberto. Cada detecção de ripples no hipocampo gerou uma estimulação em tempo real de alta precisão de um trem de 100ms composto de 14 pulsos de 1ms com forma quadrada negativa (140 Hz) do feixe medial do prosencéfalo (FPM), o padrão de estimulação foi escolhido considerando experimentos previamente publicados (de Lavilléon et al., 2015) onde o estímulo não afetou a arquitetura do sono ou induzia que o animal acordasse. O FPM foi escolhido pela sua posição estratégica como via comunicante entre a VTA e o núcleo accumbens regulando a transmissão dopaminérgica entre as duas estruturas (Russo e Nestler, 2013). Adicionalmente, a estimulação do FPM tem se mostrado altamente recompensadora em

modelos animais e tem sido usada para modelos de abuso de substâncias (Levy et al., 2007). Considerando que a intervenção em circuito fechado precisa de um controle recebendo a mesma quantidade de estimulação, um grupo de circuito aberto foi utilizado. Nesses animais, o padrão e tempo de estimulação foi intruzido por meio da detecção de ripples do animal em circuito fechado. Assim, animais do circuito aberto receberam estimulação do FPM não concomitante com o ripple hipocampal (Figura 14).

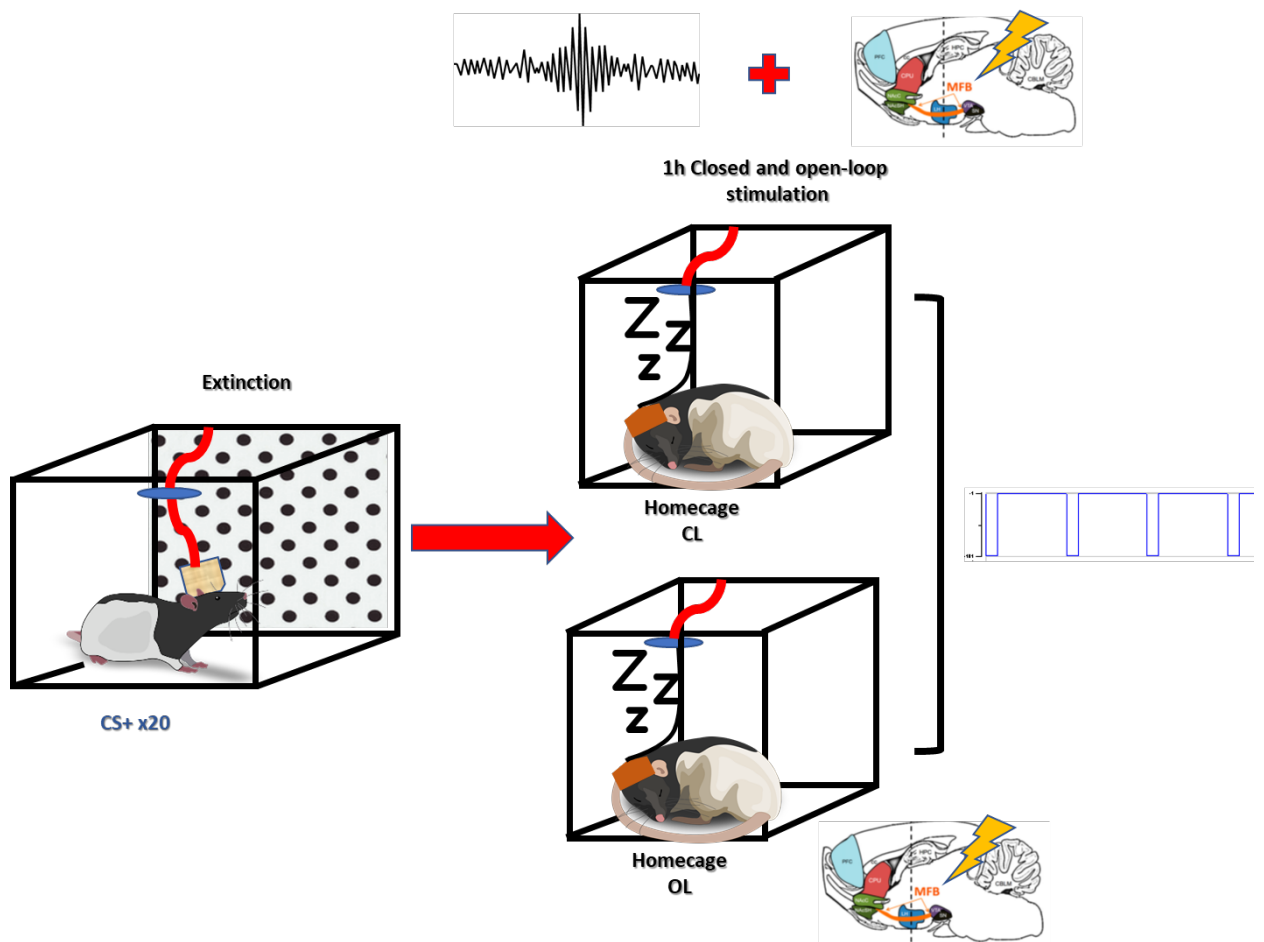


Figura 14. Sistema de estimulação em circuito aberto e fechado. Com o intuito de controlar o tempo e a quantidade de períodos de estimulação, animais foram colocados em paralelo durante os experimentos. Um deles foi chamado de circuito fechado (CL; *closed-loop*) e outro de circuito aberto (OL; *open-loop*). O animal CL recebeu estimulação guiada pela detecção do ripple hipocampal, o mesmo padrão de estimulação foi simultaneamente enviado ao animal OL. Desta forma foi possível controlar que o animal OL recebesse a estimulação não concomitante com o ripple hipocampal.

Nossos resultados mostraram que animais estimulados em circuito fechado atingem mais rapidamente o critério de extinção comparado com animais em circuito aberto ($t(5) = 2.254$; $p = 0.024$, teste t independente) (Figura 15).

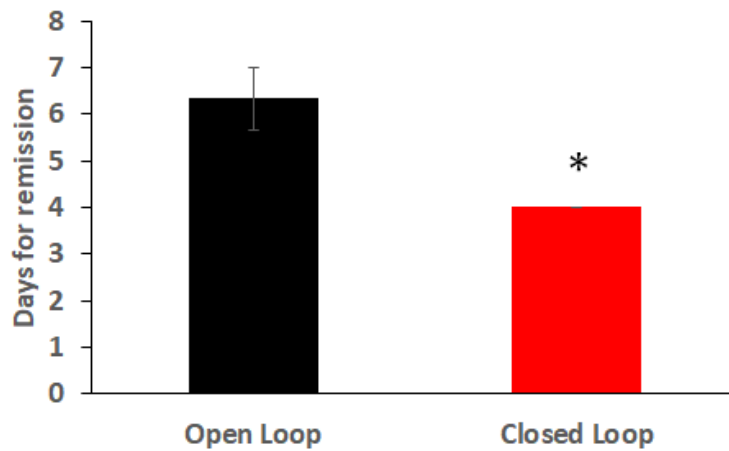


Figura 15. Critério de remissão. Um critério de extinção com sucesso foi estabelecido como o 80% de redução do congelamento comparado com o congelamento mostrado na sessão de teste. Animais estimulados em circuito fechado mostram uma diminuição do congelamento no critério estabelecido entre 3 e 4 dias. No entanto o grupo submetido a estimulação em circuito aberto precisa mais tempo (sessões de extinção) sem atingir uma redução significativa.

Quando os animais atingiram o critério de extinção ou o máximo de sessões que foi determinado, os dois grupos foram expostos a um protocolo de renovação onde um teste de 5 CS+ foi realizado em um contexto com características similares (mas não idênticas) ao contexto de treino. Nossos resultados mostraram que animais submetidos ao protocolo de estimulação em circuito fechado apresentam menores taxas de congelamento comparados com o grupo estimulado em circuito aberto ($t(4) = 5.611$; $p = 0.020$, teste t independente) (Figura 16).

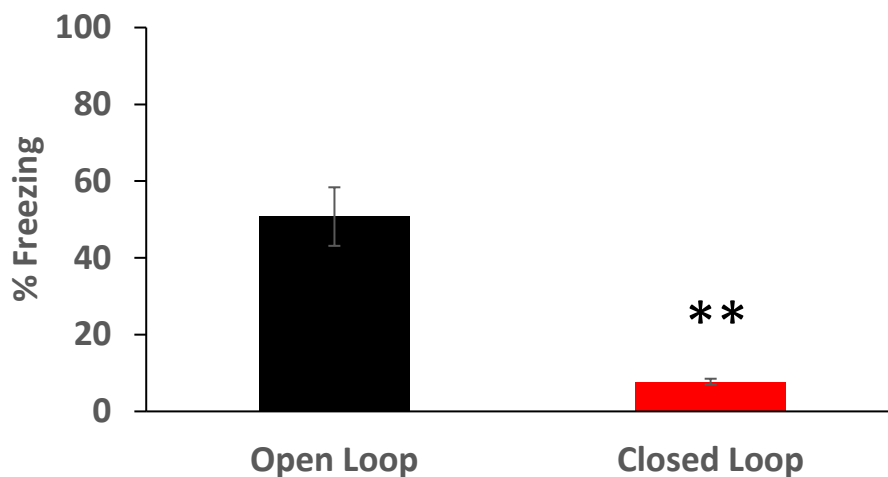
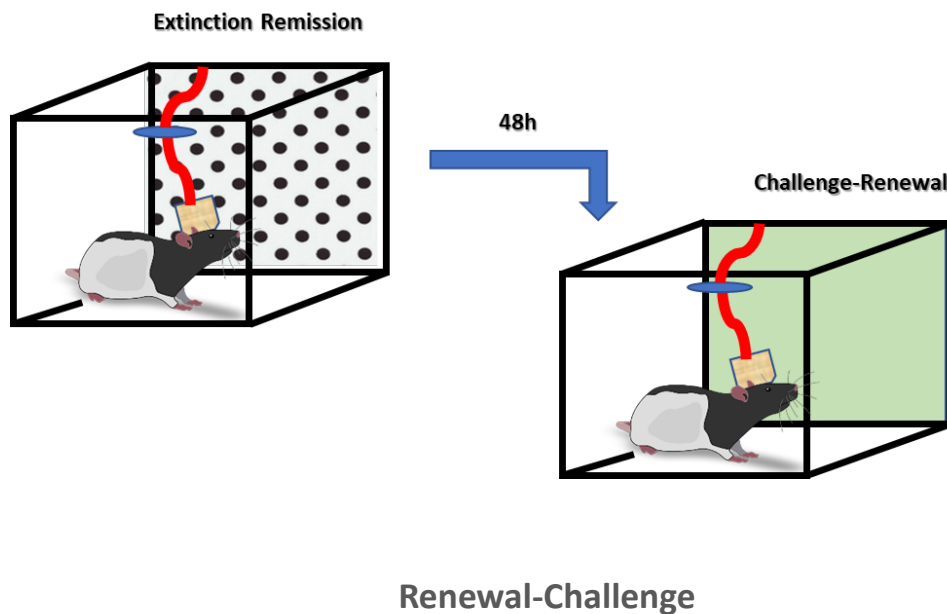


Figura 16. Protocolo de renovação. Animais que atingiram a diminuição de 80% do congelamento inicial foram submetidos ao protocolo de renovação. Animais com estimulação de circuito fechado se mostraram resistentes à recuperação do medo comparados com o grupo que recebeu estimulação em circuito aberto.

A estimulação elétrica do feixe medial do prosencéfalo gera condicionamento de preferência de local

Em um experimento adicional, o condicionamento de preferência de local foi utilizado para avaliar as propriedades reforçadoras da estimulação do FMP. O protocolo foi igual ao utilizado nos experimentos com cafeína mostrados no primeiro manuscrito desta tese. Brevemente, os animais foram submetidos a sessões de estimulação durante 5 dias, duas vezes por dias. Uma das sessões diárias foi associada com estimulação e a seguinte sem

estimulação. A intensidade da estimulação foi seguindo as mesmas condições dos experimentos anteriormente descritos e, de fato, a estimulação durante a tarefa foi guiada pela detecção de ripples hipocampais. Nossos resultados mostraram que a preferência pelo compartimento de estimulação aumentou significativamente comparado com a preferência mostrada ao mesmo comportamento durante a habituação ($t(3) = -5.339$; $p = 0.012$, teste t dependente) (Figura 17).

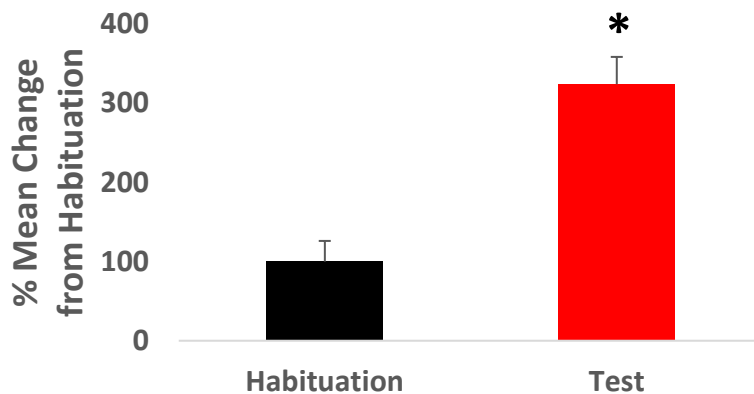


Figura 17. Estimulação do FPM gera condicionamento de preferência de local. O aumento da preferência pelo compartimento subsequentemente estimulado mostrou as propriedades reforçadoras da estimulação do FPM. É importante salientar que a estimulação seguiu os parâmetros de detecção em tempo real aplicada no protocolo de extinção.

A estimulação elétrica em circuito fechado entre a detecção das oscilações de alta frequência (ripples) e o feixe medial do prosencéfalo aumenta a expressão de oscilações de alta frequência (ripples) no hipocampo dorsal

Nossos resultados no melhoramento da extinção assim como durante a renovação, permite hipotetizar que existe uma relação direta entre o ripple hipocampal e o reforço em tempo real por meio da estimulação do FPM, que não pode ser explicado simplesmente pela presença de reforço após cada sessão de extinção. Isto pode ser verificado nos animais em circuito aberto que mesmo recebendo estimulação não mostraram mudanças ao longo do protocolo. Com o intuito de conhecer se a expressão de ripples o alguma das suas características apresenta uma alteração pela estimulação em circuito fechado, animais foram expostos durante 3 dias ao protocolo de registro de ripples em linha base durante 30 min, seguidos de 3h de estimulação em circuito fechado

como anteriormente exposto. Após o período de estimulação o registro continuou durante mais 30 min. Em cada sessão, a expressão de ripples hipocampais foi comparada antes e depois da estimulação. Como poder ver observado na figura 18, 3 de 4 animais apresentam um aumento progressivo na expressão de ripples comparados com a linha base.

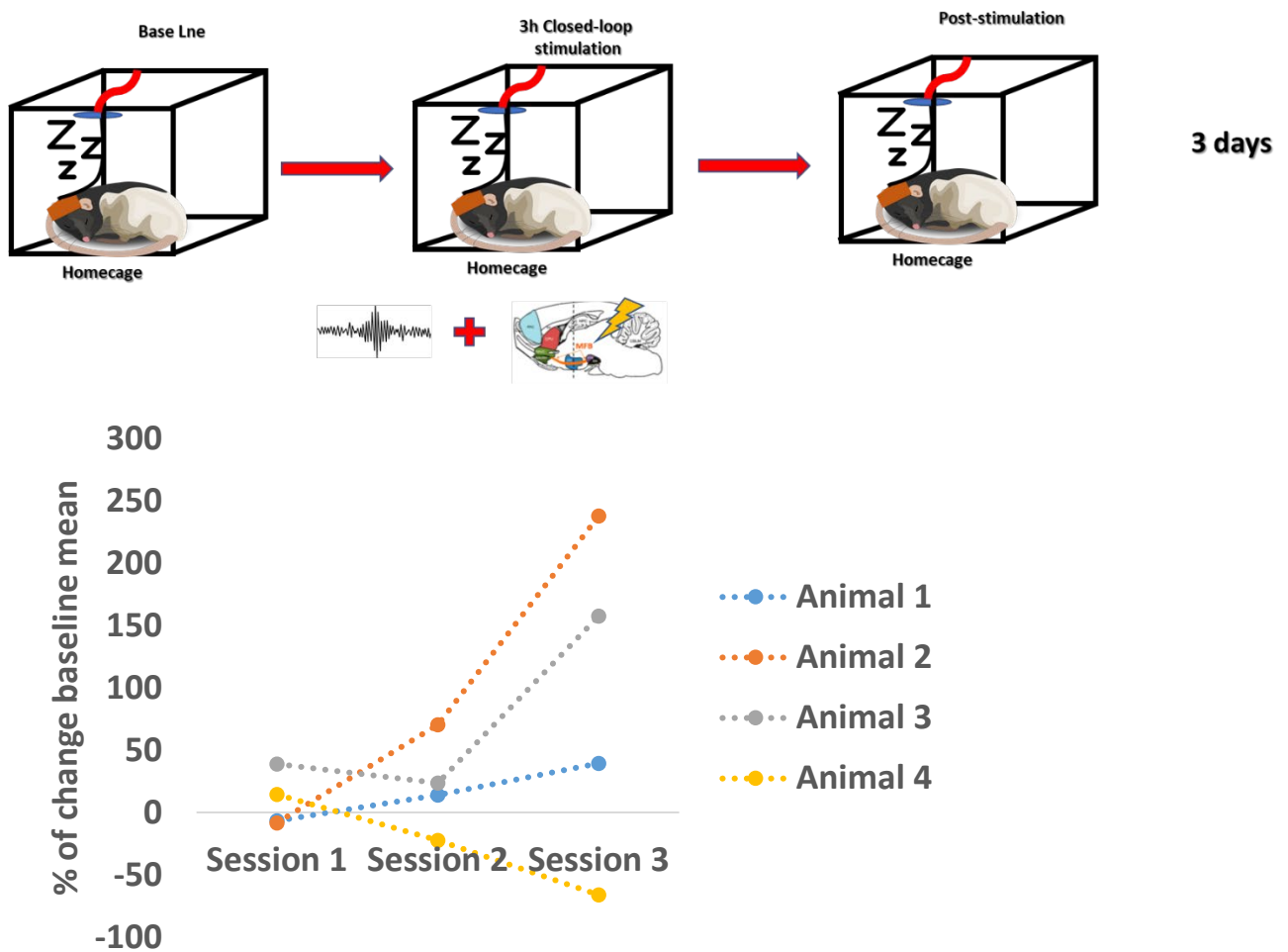


Figura 18. Estimulação em circuito fechado entre ripple hipocampal e FPM. Três dias de estimulação se mostraram efetivos para aumentar a expressão de ripples hipocampais ao longo do tempo comparado com as respectivas linhas de base. O resultado sugere que a estimulação concomitante com a detecção pode afetar diretamente a expressão futura de ripples.

4. Conclusões gerais

4.1 Reativação única vs. Reativação periódica

Um dos fenômenos mais sobressalientes após a série de experimentos aqui demonstrados com cafeína, é a possibilidade de vantagem terapêutica utilizando a reativação periódica da memória. Experimentos prévios do nosso laboratório mostraram efeitos similares quando as sessões de reativação foram realizadas na presença de estímulos apetitivos como chocolate (Haubrich et al., 2015). Nossos resultados não somente confirmam dito fenômeno, mas também oferecem um marco teórico explicativo baseado no contracondicionamento, processo que será abordado mais adiante. É importante salientar que ao longo do manuscrito foi defendida a ideia que nossos resultados foram mediados por processos de reconsolidação, considerando que boa parte dos grupos-controle não expressaram decaimento no congelamento ao longo das reativações (como ocorreu no caso das fêmeas, resultado que pode ser mediado por diferenças sexuais no processamento da consolidação da memória de extinção) (Shvil et al., 2014). Experimentos têm mostrado que memórias muito aversivas (Wang et al., 2009) ou remotas (Frankland et al., 2006) podem ser difíceis de serem prejudicadas por meio da reconsolidação. Nossos resultados abrem a possibilidade que memórias de dita natureza sejam mais facilmente atingidas por tratamentos farmacológicos e comportamentais por meio da reativação periódica. Essas estratégias fazem parte de um novo objetivo em pesquisa básica e clínica, que pretende superar as chamadas condições limitantes que podem diminuir as intervenções baseadas em reconsolidação (Elsey e Kindt, 2017a). A tabela 2 faz um resumo dessas oportunidades e como os nossos resultados podem ser incorporados nelas.

<i>Técnica</i>	<i>Estudo, organismo, tipo de memória, tratamento farmacológico</i>	<i>Objetivo da estratégia</i>
Aumento do tempo de reativação	Sevenster et al. (2014). Humanos. Condicionamento Pavloviano. Propranolol. Suzuki et al. (2004). Camundongos. CAC. Anisomicina. Bustos et al. (2009). Ratos. CAC. Midazolam.	Mesmo que reativações prolongadas podem induzir extinção, algumas memórias parecem iniciar um processo de labilização mediado por reconsolidação.
Aumento do número de reativações	Haubrich et al. (2014). Ratos. CAC. Reforço apetitivo Pedraza et al. (2018). Ratos. CAC. Cafeína	Aumento do número de reativações podem aumentar a chance de modificação da memória por meio de reconsolidação. O decaimento no grupo controle é importante para determinar se o mecanismo é reconsolidação ou extinção.
Facilitar o processo de labilização	Bustos et al. (2010). Ratos. CAC. D-cycloserina + Midazolam. Gazarini et al. (2015). Ratos. CAC. D-cycloserina + clonidina ou cannabidiol.	Fármacos como a DCS podem facilitar a labilização de memórias resistentes ao processo. Adicionar uma intervenção farmacológica ou comportamental concomitante com os tratamentos pode facilitar a atualização da memória Pela reconsolidação.
Incluir predição do erro ou novidade	Winters et al. (2009). Reconhecimento de Objetos. Ratos. MK-801. Sevenster et al. (2013). Condicionamento Pavloviano. Humanos. Propranolol. Alfei et al. (2015). CAC. Ratos. Midazolam.	A falta de coerência entre estímulos presentes no condicionamento ou eventos novos ao redor da reativação podem facilitar a reconsolidação da memória.
Mudanças em doses	Bustos et al. (2009). Ratos. CAC. Midazolam	Doses elevadas do fármaco podem facilitar a inibição da memória. É das opções de maior risco translacionalmente.

Tabela 2. Estratégias visando melhorar os processos de labilização e reconsolidação da memória. Algumas estratégias visando melhorar a reconsolidação têm sido testadas. Entre elas encontramos o aumento do tempo de reativação, aumento do número de reativações, uso de melhoradores farmacológicos do processo de desestabilização, protocolos de predição do erro, novidades adicionadas antes ou durante a reativação e mudança nas doses de tratamentos. Entre essas alternativas, nossos resultados sustentam a ideia de que aumentar o número de reativações pode ser uma estratégia viável para o enfraquecimento de memórias aversivas. É importante salientar que o fato das reativações serem periódicas e não crônicas, aumenta a chance que o processo de reconsolidação seja engatilhado e não a extinção. Modificado de Elsey e Kindt, (2017a).

Como exposto na tabela 2, a ideia de aumentar o número de reativações favorece a possibilidade de modificar a memória, o que pode parecer uma estratégia óbvia (Elsey e Kindt, 2017a). No entanto, acreditamos que existem outros fatores que não são tão óbvios com o protocolo de reativação periódica. Alvares L de O e colaboradores (2012)

mostraram que a reativação periódica mantém a precisão da memória e a dependência hipocampal, fato que foi verificado pela administração pré-teste de muscimol no hipocampo dorsal, onde animais reativados foram mais suscetíveis ao tratamento que aqueles não reativados. Por outro lado, os resultados aqui mostrados com fluoxetina sugerem uma estreita relação entre a dependência hipocampal, a generalização e a possibilidade de atenuar memórias aversivas. Poderiam nossos resultados ser influenciados pela manutenção da dependência hipocampal? Poderia a cafeína interagir de alguma forma com dita variável? Considerando-se que a dependência hipocampal não foi avaliada diretamente no experimento com cafeína, mas sim com fluoxetina (21 dias após o treino a memória se mostrou menos dependente do hipocampo), podemos dizer que a cafeína pode agir independentemente deste mecanismo. De fato, um dos resultados mais significativos foi que a cafeína se mostrou efetiva mesmo em memórias remotas. A única condição que não atingiu a diferença estatística (mas sim uma clara tendência) foi durante um treino de alta intensidade.

Um experimento interessante para futuras pesquisas é verificar se a fluoxetina pode reverter a generalização de memórias que já se expressam de forma generalizada, bem como se o tratamento poderia facilitar a extinção quando iniciado tardiamente (a condição mais comum na prática clínica, para um exemplo ver Wintermann GB et al., 2017). No entanto, nossos resultados com cafeína mostraram ser muito promissores em uma grande variedade de condições, o que nos leva a estimar que, sob algumas condições, pode gerar melhores efeitos na redução do medo, ao ser comparado com a farmacologia clássica para o TEPT.

Por outro lado, a função biológica da reconsolidação tem sido associada com a possibilidade de atualização do traço mnemônico, assim como seu fortalecimento (Lee, 2008; 2009; 2010). No caso da atualização, há evidências que introduzir novas variáveis durante a reativação pode induzir dito processo, enquanto manter as condições originais do treino favorece o fortalecimento (de Oliveira Alvares et al., 2013). Isso significa que as condições de reativação devem ser contempladas para evitar o fortalecimento do traço aversivo. De fato, o fortalecimento de memórias declarativas em humanos tem sido mostrado com protocolos semelhantes de labilização/reconsolidação (Forcato et al., 2011). Uma possibilidade potencial para que esse caso não ocorra durante as reativações

com cafeína é o bloqueio da evocação, assim como a interação com o potencial efeito reforçador e ansiolítico da cafeína, verificado em nossos experimentos.

O tratamento pré-reativação aqui utilizado mostrou o efeito da cafeína prejudicando a evocação da memória, um resultado anteriormente descrito por Dubroqua et al. (2015), mas que ainda tem um mecanismo pouco claro. Uma possibilidade foi oferecida por Simões e colaboradores (2016) sugerindo que a administração repetida de cafeína poderia levar a diminuição de receptores adenosinérgicos do tipo A2AR. Os resultados se apoiam no efeito atingido pela redução induzida desses receptores na amígdala basolateral pela inibição do RNA na tradução do receptor, gerando um déficit na consolidação e evocação da memória.

O fenômeno na evocação foi robusto e detectado ao longo das reativações, bem como independente de possíveis efeitos motores induzidos pela cafeína, considerando que no campo aberto nenhuma alteração com a dose aqui utilizada foi verificada.

Uma possível hipótese é que a cafeína, ao prejudicar a evocação, atua como uma interferência que modifica gradualmente a memória por meio da reconsolidação. A pergunta que surge é: como a memória pode mudar sem uma adequada evocação? Resultados em carangueijos (*Chasmagnathus*) têm mostrado que de fato a reconsolidação pode ocorrer na ausência de evocação. Barreiro e colaboradores (2013) mostraram que a administração dos antagonistas dos receptores NMDA (APV) pode prejudicar a expressão sem interferir na estabilidade da memória ao longo prazo, em condições onde a evocação não induz processos de reconsolidação. Também, o antagonista de receptores AMPA, CNQX, pode interferir na expressão da memória sem interferir na reconsolidação. Estes e outros resultados foram compilados em um artigo de revisão, que sugere a independência da evocação dos processos de plasticidade decorrentes da reconsolidação (Delorenzi et al., 2014). Assim, é possível concluir que a cafeína, mesmo interferindo na evocação da memória, pode permitir o processo de reconsolidação que ao longo do tempo reduz a expressão da resposta aversiva. É importante salientar que nossos resultados não oferecem uma prova definitiva que o processo atingido pela cafeína seja a reconsolidação, no entanto acreditamos que nas condições experimentais utilizadas, pode ser a explicação mais plausível.

4.2 A cafeína e seus efeitos na memória

Os efeitos da cafeína na memória têm sido amplamente estudados, no entanto consideramos o nosso estudo (pelo menos até o momento da elaboração deste documento) como o primeiro avaliando o efeito da substância em diferentes protocolos de reativação da memória. De forma geral, pode ser concluído que o consumo de cafeína em doses moderadas, seja ele agudo ou crônico, se encontra associado com uma melhora no desempenho em tarefas de memória (Childs e de Wit, 2006; Bonnet et al., 2005; Schmitt et al., 2003). Em animais, o panorama é bastante similar, onde doses moderadas podem melhorar o desempenho na consolidação e evocação de memórias emocionais, espaciais e de reconhecimento (Cestari e Castellano, 1996; Angelucci et al., 1999; 2002; Hauber e Bareiss, 2001; Prediger e Takahashi, 2005). Também é possível afirmar que o aumento da dose de cafeína, entre 30 e 100mg/kg, tem um efeito deletério na aquisição (Zarrindast e Shafaghi, 1994) e evocação (Angelucci et al., 1999) da esquiiva inibitória e o mesmo perfil pode ser verificado no CAC (Corodimas et al., 2000). O perfil não específico da cafeína, como antagonista adenosinérgico, dificulta a possibilidade de determinar se os efeitos atingidos em humanos e animais podem ser mediados por receptores A1 ou A2A (Fredholm BB et al., 1999). Além disso, têm sido identificadas outras interações da cafeína, por exemplo, na liberação intracelular de cálcio, além de interações com o receptor GABA_A assim como com receptores dopaminérgicos D2 e inibição de fosfodiesterases (Kaplan, 1989; Simola et al., 2008; Yu et al., 2009). Mesmo que resultados recentes sugerem que o efeito da cafeína na memória poderia ser principalmente mediado pela sua interação com receptores A2A (Simões et al., 2016), dissociar os efeitos da cafeína dos seus alvos secundários assim como efeitos não mnemônicos limita algumas conclusões.

Ao longo desta tese, a conceitualização do TEPT tem sido focada a uma possível falha do sistema que permite a aquisição, consolidação e manutenção da memória, o que origina comportamentos patológicos como o medo persistente e a generalização da resposta condicionada. No entanto, nossos resultados com cafeína sugerem que além dos possíveis efeitos mnemônicos da substância, efeitos na ansiedade e no sistema de recompensa poderiam ser importantes para a redução do medo que foi aqui atingida. Dessa forma, dedicaremos uma parte considerável desta discussão a explorar como esses outros efeitos poderiam interagir com a reativação para mudar a valência aversiva da memória.

4.3 O contracondicionamento e os estados endógenos induzidos farmacologicamente

Classicamente o contracondicionamento tem sido utilizado como uma técnica comportamental ativa quando comparado com a extinção (Meulders et al., 2015). No contracondicionamento, os estímulos condicionados são pareados com novos estímulos incondicionados de valência oposta aos inicialmente apresentados no aprendizado (Bulganin et al., 2014). O procedimento tem por objetivo mudar o significado inicial do aprendizado e, desta forma, tem sido proposto como coadjuvante para facilitar a reconsolidação (Richardson et al., 1982; Goltseker et al., 2017; Das et al., 2015) e a extinção (Heinsbroek et al., 2018). Isoladamente, o contracondicionamento se mostra eficaz na redução de medo em roedores como tratamento alternativo à extinção (Kang et al., 2018), no entanto, alguns estudos sugerem que pode ser menos efetivo do que a extinção na manutenção da supressão do medo a longo prazo (Holmes et al., 2016). A interação de estados endógenos induzidos comportamentalmente (como aqueles decorrentes da dessensibilização sistemática usado em terapia) (Richardson et al., 1982) ou farmacologicamente tem um conhecimento teórico bem estruturado na pesquisa básica. De fato, um fenômeno que exemplifica dito processo é a dependência de estado endógena. Na consolidação, estados endógenos ou neuro-humorais, presentes durante o treino ou o pós-treino, podem ser incorporados como elementos ativos do traço mnemônico e influenciar a sua futura expressão. Esses estados possuem um papel biológico fundamental, conferindo a carga emocional de algumas memórias que devem ser bem consolidadas e disponíveis permanentemente para o organismo (Izquierdo I, 2011). Sem dúvida, a atividade da amígdala é essencial para essa modulação. Por exemplo, sinapses colinérgicas (Van der Zee e Luiten, 1999), transmissão β -adrenérgica (Dalmaz et al., 1993; Kroes et al., 2010), assim como fibras que liberam β -endorfina sobre as sinapses noradrenérgicas nos circuitos locais da amígdala (Izquierdo e Netto, 1985; McGaugh et al., 1986), medeiam a consolidação de informações aversivas influenciando níveis de atenção, ansiedade e percepção de perigo ambiental. A dependência de estado se manifesta no fato de que um organismo pode lembrar melhor de uma informação quando existe uma reconstrução na evocação do estado endógeno no qual essa informação foi codificada (Overton, 1978). Farmacologicamente, a dependência de estado pode ser atingida por meio da administração da mesma substância durante a aquisição e a consolidação da memória e antes da evocação (Shiigi e Kaneto, 1990).

Algumas substâncias como morfina (Shiigi e Kaneto, 1990), nicotina (Peters e McGee, 1982), etanol (Rezayof et al., 2008), lítio (Zarrindast et al., 2007), midazolam (Sanday et al., 2012) e inclusive cafeína (Kelemen e Creeley, 2003), podem gerar dependência de estado. Ao longo dos experimentos aqui mostrados, foi contemplada a possibilidade de um fenômeno de dependência de estado. Nessas condições, a cafeína poderia induzir baixos níveis de congelamento enquanto seu efeito estivesse presente. Embora o tratamento só tenha sido iniciado durante a primeira reativação, longe da janela de consolidação, experimentos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que a dependência de estado pode ser estabelecida durante a reconsolidação (Sierra et al., 2013). Como pode ser visto nos resultados desta tese, a comparação dos resultados de grupos testados sob efeito da cafeína com grupos testados sem prévia administração foram fundamentais para encontrar a resposta demonstrando que a cafeína não gera dependência de estado. No teste final, a administração de cafeína foi suspensa e os animais, livres da substância, expressaram níveis de congelamento ainda baixos. Se um fenômeno de dependência de estado tivesse ocorrido, esperaríamos que testes sem administração da cafeína levariam a elevados níveis de congelamento.

Considerando que a dependência de estado não foi o caso, a seguinte hipótese se fundamentou em um estado neuro-humoral induzido pela cafeína, que mudou a valência emocional da memória, enfraquecendo-a ao longo do tempo. Como estímulos apetitivos tinham mostrado efeitos similares (Haubrich et al., 2015) e o padrão com cafeína foi a diminuição do congelamento, surgiu a possibilidade que o tratamento tivesse algum efeito ansiolítico ou reforçador, que quando apresentado durante as reativações competisse com a saliência aversiva dos estímulos presentes. Essa hipótese tem sido testada e o processo de contracondicionamento entre estímulos apetitivos e aversivos se mostrou diretamente associada com estruturas mediando a predição de erro como a BLA e o núcleo accumbens (Nasser e McNally, 2013). A hipótese de um efeito endógeno, não estado-dependente, foi favorecida por evidências mostrando que a administração de cafeína pode aumentar níveis de glutamato e dopamina no Nucleus Accumbens Shell (Solinas et al., 2002) e a sua possibilidade de gerar preferência condicionada de local de forma dose-dependente (Brockwell et al., 1991).

4.4 Cafeína como substância terapêutica a partir dos seus efeitos ansiolíticos e reforçadores

Algumas considerações anatômicas e moleculares podem ajudar a entender o possível efeito benéfico da cafeína. Por exemplo, os receptores adenosinérgicos do tipo 2A (A2A) se encontram altamente expressos em estruturas como o hipocampo, o córtex pré-frontal e amígdala (Cunha et al., 1994; Pandolfo et al., 2013; Simões et al., 2016), todas elas fundamentais para a regulação emocional e de estados de ânimo. No caso do hipocampo, a concentração de receptores A1 é particularmente elevada comparada com outras estruturas (Schwarzschild et al., 2006). Para as conclusões apresentadas nesta tese, o papel de receptores adenosinérgicos como moduladores de outros sistemas de neurotransmissão é essencial. Por exemplo, receptores A2A encontram-se altamente concentrados pós-sinapticamente em regiões principalmente dopaminérgicas como o núcleo accumbens (DeMet e Chicz-DeMet, 2002; Rebola et al., 2005). De fato, a co-localização desses receptores tem mostrado também interação funcional (Beggiato et al., 2014). Receptores D2 e A2A assim como D1 e A1 convergem na mesma via de sinalização envolvendo MAPK e CREB e receptores D1 (Fuxe et al., 2003; Beggiato et al., 2014). Assim, antagonistas específicos de receptores A2A tem sido propostos como terapêuticamente viáveis no aprimoramento de tratamentos dopaminérgicos de doenças como o Parkinson (Hung e Schwarzschild, 2014), bem como a cafeína propriamente dita já tem sido proposta para a mesma finalidade (Prediger, 2010).

As interações entre os dois sistemas parecem promissoras também em algumas situações associadas com estado de ânimo e motivação. Salamone e Correa (2009) mostraram que antagonistas de receptores D2 podem reduzir o esforço de animais para realizar tarefas motivadas por comida, sem mudar o apetite do animal, porém, reestabelecendo a motivação por comida por meio da administração sistêmica ou intra-accumbens de antagonistas de receptores A2A. Em humanos, o consumo de 10mg de cafeína ao dia em uma análise epidemiológica de grande escala foi associada com redução no risco de depressão (Smith, 2009). Resultados semelhantes têm sido encontrados em mulheres sem diagnóstico prévio de depressão, em doses que superam os 550mg ao dia (Lucas et al., 2011). De forma interessante, no mesmo estudo foi possível observar que o consumo de cafeína inferior a 100mg diários está correlacionado com maior probabilidade de

sintomatologia depressiva. É importante salientar que, assim como em animais, os benefícios do consumo de cafeína se mostram dose-dependentes em humanos. Por exemplo, Kawachi e colaboradores (1996) demonstraram que o consumo moderado de cafeína está associado com menor risco de suicídio, no entanto elevadas doses (750mg ao dia) pode favorecer a possibilidade de suicídio.

O fato de a cafeína ser consumida de forma generalizada tem permitido realizar alguns estudos dos quais se despreendem hipóteses bastante interessantes. Por exemplo, alguns resultados mostram que pessoas com diagnóstico de doença psiquiátrica possuem uma disposição maior ao consumo diário de cafeína, em comparação com pessoas sem diagnóstico (Leibenluft et al., 1993; Rihs et al., 1996). Essa tendência parece ser ainda mais evidente em pacientes com depressão (Leibenluft et al., 1993; Whalen et al., 2008). Esses resultados suscitam a hipótese de que o consumo de cafeína poderia ser uma estratégia de auto-medicação que, de alguma forma, contribui com a estabilização do estado de ânimo ou alerta em algumas populações clínicas (López-Cruz L et al., 2018). Recentemente Szopa e colaboradores (2016) mostraram que doses de cafeína em 10, 20 e 50mg/kg têm efeito antidepressivo no modelo de nado forçado sem efeitos na locomoção. De forma aguda, a mesma dose de 20mg/kg diminui comportamentos ansiosos no campo aberto em roedores (Sweeney P et al., 2016). Quando administrada a dose de 40mg/kg, a cafeína induz ansiedade em tarefas de interação social e no labirinto em cruz elevado (Baldwin et al., 1989). Doses baixas de cafeína (3.0mg/kg) induzem condicionamento de preferência de local, mas doses superando os 30mg/kg induzem aversão condicionada (Brockwell et al., 1991). Como foi sustentado em nosso manuscrito, sugerimos que doses baixas de cafeína e não superiores a 30mg/kg, em roedores, podem ter um efeito ansiolítico e antidepressivo, quando administradas de forma aguda ou crônica, respetivamente. Dessa forma, a dose de 20mg/kg foi escolhida em nosso estudo para estudar a interação dos efeitos supracitados em diferentes protocolos de reativação da memória. Nossos resultados replicaram estudos mostrando o efeito ansiolítico dessa dose e estenderam o alcance de doses que podem conseguir indução de preferência de local, que como objeto final, têm a finalidade de testar o efeito reforçador da substância.

Considerando-se, por fim, as evidências de que a cafeína interfere com processos mnemônicos (Borota et al., 2014), emocionais e motivacionais, fica difícil concluir qual

deles pode ser responsável pelos resultados deste estudo ou se todos convergem para o efeito final. No entanto, após a verificação dos efeitos ansiolíticos e reforçadores da cafeína, decorrente desta pesquisa e defendido no presente texto, inclinamos a balança para o lado dos efeitos secundários (que terminam modificando a valência emocional), possivelmente por meio de um condicionamento durante as sessões de reativação, contribuindo assim para o enfraquecimento da memória aversiva.

4.5 Existe uma relação entre a cafeína e a fluoxetina na atenuação de memórias aversivas?

Esta discussão tem por objetivo resumir nossos achados usando dois agentes diferentes. De fato, grande parte da discussão acerca da cafeína pode dar-se por concluída, para agora focar os esforços em entender e interpretar os resultados com fluoxetina. Nessa transição, entre substâncias com mecanismos de ação tão diferentes, podemos nos perguntar: existe alguma relação entre cafeína e fluoxetina?

Como foi mencionado anteriormente, o consumo de cafeína parece associado com a presença de sintomas de doenças psiquiátricas. Worthington e colaboradores (1996) encontraram que o consumo basal de cafeína foi um preditor positivo da resposta ao tratamento com fluoxetina (20mg/dia) em pacientes diagnosticados com depressão. A relação se mostrou independente do grau de severidade da sintomatologia. Em animais, doses de 10, 20 (a dose usada em nosso estudo) e 50mg/kg têm efeito antidepressivo no modelo de nado forçado sem afetar a locomoção (Szopa A et al., 2016). No mesmo trabalho foi constatado que uma dose de 5mg/kg de cafeína pode melhorar a ação antidepressiva de uma considerável quantidade de substâncias como imipramina (15 mg/kg), desipramina (10 mg/kg), fluoxetina (5 mg/kg), paroxetina (0.5 mg/kg), escitalopram (2 mg/kg) e reboxetina (2.5 mg/kg). De fato, a abstinência induzida por cafeína pode mudar o efeito terapêutico dos antidepressivos (Szopa et al., 2017).

Mesmo com um limitado conhecimento sobre a forma que podem interagir os dois sistemas e se o sistema dopaminérgico poderia estar implicado, resulta interessante que a cafeína seja um modulador da ação de antidepressivos como a fluoxetina. Os dois fármacos mostraram efeitos significativos, com diferentes estratégias, para a atenuação de memórias aversivas. Se a cafeína concomitante com a farmacologia clássica pode ser

uma ferramenta eficaz no tratamento de transtornos associados ao trauma, comparado com seu uso individual, deve ser investigado futuramente.

4.6 Fluoxetina como modulador da generalização e dependência hipocampal e seus efeitos na subsequente extinção da memória

Evidências experimentais acerca dos efeitos da fluoxetina na generalização de memórias aversivas são escassos na literatura. Pamplona e colaboradores (2011) mostraram, em um modelo animal de TEPT, que o tratamento crônico com fluoxetina pode reverter parcialmente a generalização entre estímulos em um modelo de condicionamento aversivo ao odor. Por outro lado, McAvoy e colaboradores (2015) demonstraram que a administração crônica de fluoxetina (18mg/kg/dia) mantém a precisão de memórias contextuais em animais de meia idade, efeito simultâneo ao remodelamento de espinhos dendríticos nas fibras musgosas do hipocampo dorsal e ventral. Nossos resultados replicaram esse fenômeno e estabeleceram sua relação funcional com a subsequente extinção da memória. Em efeito, um dos resultados mais significativos desta tese foi constatar que a qualidade da memória, isto é, sua expressão como generalizada ou precisa pode influenciar diretamente na taxa de extinção. Além da fluoxetina, estudos do nosso laboratório demonstraram que a manutenção da precisão pode ser mantida por: vias farmacológicas utilizando o inibidor da síntese de adrenocorticosteroides como a metirapona ou o bloqueador de receptores β -adrenérgicos, propranolol (Pedraza et al., 2016), assim como por vias comportamentais utilizando a reativação periódica da memória (Alvares L de O et al., 2012). Todos os tratamentos acima mencionados, não somente mantêm a precisão, como também favorecem a dependência hipocampal. Uma série de experimentos realizados em nosso laboratório nos últimos 3 anos tem levado à hipótese de que existe uma estreita relação entre precisão e dependência hipocampal, hipótese que tem forte apoio pelos resultados de outros grupos (Wiltgen et al., 2010). É tentador afirmar que nessa relação possa ser incorporada a extinção, no entanto sugerimos que uma adequada base experimental inclui replicar os experimentos acima mencionados, assim como incluir condições experimentais onde generalização e dependência hipocampal não estejam relacionadas. Já é possível antecipar que algumas memórias, como aquelas formadas por eventos traumáticos em humanos e modelos animais, mesmo dependentes do hipocampo são difíceis de extinguir (Muigg et al., 2008; Long VA e Fanselow MS, 2012; Corley et al., 2012). Além disso, Lynch e colaboradores (2017)

mostraram que a administração do antagonista de receptores GABAB(1a), o CGP 36216, intra-cerebroventricular ou localmente no hipocampo dorsal, hipocampo ventral ou córtex cingulado anterior induz generalização contextual no CAC em 24h (resultado difícil de ser associado com a aceleração da independência hipocampal numa janela tão reduzida de tempo). Ao mesmo tempo, continua sendo tentador pensar em dita relação quando verificado que as memórias remotas (de fato as submetidas a incubação do medo) (Poulos et al., 2016) são as mais resistentes à supressão, seja por extinção (Pickens et al., 2009) ou reconsolidação (Frankland et al., 2006; Hoffman NA et al., 2015), bem como possivelmente independentes do hipocampo (Frankland e Bontempi, 2004). Além disso, considerando-se que a dependência hipocampal possa ser altamente sensível à intensidade do treino ou aversividade da experiência (Pedraza et al., 2016; 2017), a independência hipocampal poderia ser acelerada em memórias traumáticas, sendo elas mais rapidamente generalizadas e mais difíceis de serem extinguidas. Recentemente, Khalaf e colaboradores (2018) usando técnicas quimiogénicas mostraram que memórias remotas (após 1 mês de treino) precisam dos neurônios do giro denteado ativos durante o aprendizado, para atingir uma apropriada extinção. O envolvimento hipocampal nesse tipo de memórias remotas não é surpreendente, considerando que as condições do treino podem mudar essa dependência. Assim, tem sido verificado que memórias com intensidades de treino baixo (0.4mA) podem permanecer precisas e dependentes do hipocampo até por 40 dias (Pedraza et al., 2016). No mesmo experimento de Khalaf e colaboradores (2018), o silenciamento dos neurônios utilizados durante a codificação da memória prejudica o processo de extinção, apoiando a ideia que o envolvimento do hipocampo pode de fato ser essencial para atingir a extinção. Adicionalmente, Silva e colaboradores (2018), usando imunohistoquímica para c-fos após a extinção de memórias remotas, encontraram maior atividade do córtex pré-lobulocaudal, núcleo talâmico reuniens e as regiões ventrais CA1 e CA3 do hipocampo, regiões presumidamente associadas com a atenuação da resposta de medo. Resulta necessário contemplar no termo “dependência hipocapal” que o hipocampo não é uma estrutura homogênea e suas partes dorsais e ventrais têm diferenças funcionais e anatômicas (Yoon e Otto, 2007). A dependência hipocampal como estudada em nosso laboratório e por outros grupos (Alvares L de O et al., 2012; Pedraza et al., 2016; 2017; Wiltgen et al., 2010; Nakazawa et al., 2016) tem sido restrita ao hipocampo dorsal. No entanto, o silenciamento por meio de optogenética da região CA1 do hipocampo ventral prejudica a evocação de memórias aversivas ao contexto e sincroniza a atividade da amígdala e do córtex pré-frontal medial

durante a expressão do medo (Kim e Cho, 2017). Essa via tem sido associada com a inibição ativa de memórias aversivas e conseqüentemente com o surgimento de respostas como o renewal (ou renovação) após a extinção (Wang et al., 2016; Jin e Maren, 2015; Marek et al., 2018).

Considerando que em humanos, a generalização do medo tem sido positivamente correlacionada com os sintomas de TEPT (Kaczurkin et al., 2017) nossos resultados sugerem que inibir o processo de generalização pode trazer benefício para a extinção da memória. A estreita relação entre generalização e dependência hipocampal (uma possível exceção pode ser vista em Kitamura et al., 2012), leva a propor que um tratamento que atue em algum desses processos pode ser a causa suficiente para melhorar a atenuação de respostas aversivas. Como mencionado anteriormente, algumas condições experimentais devem ser testadas para esclarecer essa possibilidade, por exemplo, avaliar a extinção de memórias generalizadas, mas dependentes do hipocampo. Nesse último caso, Gazarini e colaboradores (2014) mostraram que a administração do antagonista $\alpha 2$ -adrenérgico yohimbina após a aquisição do CAC, induz a formação de uma memória basalmente generalizada e resistente a extinção. Nessa condição podem ser avaliadas 1) se a dependência hipocampal muda em memórias formadas já generalizadas, 2) se é possível recuperar a discriminação e conseqüentemente melhorar a extinção, e finalmente se 3) se uma recuperação transitória da generalização implicaria também um aumento da atividade hipocampal. Em memórias remotas o ponto 3 foi verificado por Einarsson e colaboradores (2015), mostrando que a reativação de uma memória após 30 dias da sua formação pode recuperar a sensibilidade ao muscimol intra-hipocampal transitoriamente durante a 6h seguidas à reativação. No entanto, nesse caso foi uma memória previamente dependente do hipocampo e precisa, contrastando com a condição reportada por Gazarini e colaboradores (2014).

4.7 Por que a fluoxetina funcionou e não o citalopram?

Experimentos prévios com citalopram demonstraram que a sua administração crônica poderia prejudicar a aquisição da extinção (Burghardt et al., 2013). Esses resultados assim como os nossos poderiam ser fundamentais para entender porque diferentes antidepressivos (mesmo com mecanismos de ação semelhantes) podem ter resultados terapêuticos heterogêneos. De fato, tem sido sugerido que a associação de farmacoterapia

(no caso imipramina) com psicoterapia poderia ter poucas vantagens em comparação com a monoterapia (Barlow et al., 2000; van Balkom et al., 1998). Inclusive, a medicação poderia interferir diretamente com o resultado de intervenções cognitivo-comportamentais (Joss et al., 2003; Otto et al., 2005). Tanto o citalopram como a fluoxetina compartilham o mecanismo de ação como inibidores seletivos da recaptação de 5-HT. As diferenças entre fármacos da mesma categoria são baseadas na sua seletividade assim como sua potência no bloqueio da recaptação. Assim, estudos *in vitro* têm mostrado que a paroxetina é o antidepressivo mais potente quanto à inibição da recaptação de 5-HT comparado com a fluoxetina e o citalopram (De Jonghe e Swinkels, 1997). Por outro lado, fármacos como a fluoxetina podem ter um efeito antagonista em receptores 5-HT_{2c}. Esses receptores parecem mediar as respostas de ansiedade iniciais no tratamento com fluoxetina por meio de uma comunicação que envolve o núcleo da rafe dorsal, ativando o Bed Nucleus of the Stria Terminalis (BNST) por meio dos receptores 5-HT_{2c} onde é liberado o fator de liberação de corticotropinas, inativando assim uma via Gabaérgica entre o BNST e o VTA e o Hipotalamo lateral (Marcinkiewicz et al., 2016). Diferenças nestes mecanismos de ação secundários poderiam explicar diferentes resultados terapêuticos na prática farmacológica, assim como diferenças individuais na tolerabilidade e aderência ao tratamento (Serna et al., 2010). Como mencionado na introdução desta tese, a variabilidade intrínseca ao tratamento com antidepressivos faz da farmacologia clássica um sistema de tentativa e erro onde dose, tipo de fármaco e a associação entre fármacos devem ser ajustados continuamente, guiados pelo auto-relato do paciente. Além disso, pode ser esperado que o próprio quadro clínico do paciente piore como consequência do tratamento, um evento comum no início do tratamento com antidepressivos verificada em humanos e modelos animais (Birkett et al., 2011; Nutt, 2005), assim como pode haver interferência em outras intervenções farmacológicas e comportamentais (Barlow et al., 2000). Por exemplo, foi verificado que o efeito promotor da neurogênese induzida pela administração de fluoxetina pode ser prevenida pela administração concomitante de benzodiazepinas (Sun et al., 2013). No entanto, a combinação de benzodiazepínicos com antidepressivos é comum nas primeiras fases do tratamento clínico de algumas patologias (Davidson, 2010).

4.8 O efeito de descontinuidade do tratamento

Um das perguntas que surge é por que após a diminuição da generalização e a facilitação da extinção com fluoxetina, a resposta de medo é recuperada. Um estudo similar ao nosso mostrou que a fluoxetina pode mudar permanentemente a memória quando combinada com extinção e evita a renovação e a reinstalação da resposta de medo (Karpova et al., 2011). No mesmo estudo, o tratamento com fluoxetina se manteve ativo em todas as fases do experimento, contrastando com o nosso protocolo, que retira a fluoxetina após a extinção, e avalia a recuperação espontânea 21 dias após a retirada. Uma interpretação para esses resultados é que a retirada do fármaco pode degradar parcialmente as vantagens como ele atingido durante o procedimento. De fato, em condições clínicas, o efeito de retirada ou descontinuação do tratamento tem sido reportado. Neste sentido, recentemente uma meta-análise recente mostrou que as taxas de recaída, após a descontinuação com antidepressivos em TEPT e TOC, ocorre em quase 16,4% dos casos, durante o ano seguinte à retirada (Batelaan et al., 2017). O mesmo texto sugere que a própria natureza crônica dos transtornos de ansiedade pode demandar tratamentos de longo prazo, que considerem fatores como a recaída, efeitos adversos e preferências do paciente. No entanto, estudos com outras patologias, como a depressão, demonstram que as taxas de recaída em episódios depressivos não são beneficiadas de forma significativa pela manutenção do tratamento com fluoxetina ao longo prazo (Gueorguieva et al., 2017). Contudo, estudos focados no TEPT concluem que a manutenção do tratamento com fármacos como sertralina podem diminuir as taxas de recaída quando comparados com placebo (Davidson et al., 2001; 2006). Nossos resultados evidenciam que a redução da generalização e a facilitação e a manutenção da extinção, podem se beneficiar do tratamento com fluoxetina sem interrupção. Mesmo que nosso estudo não contemple um grupo com tratamento constante durante os 42 dias de procedimento, o fato de a fluoxetina inibir a recuperação espontânea só quando administrada depois da extinção permite pensar na possibilidade de que um tratamento sem interrupção, ao longo do nosso protocolo, poderia trazer benefícios na atenuação da resposta aversiva. Seria interessante, ao mesmo tempo, avaliar os possíveis efeitos adversos do tratamento crônico com fluoxetina como a disfunção sexual reportada em humanos e modelos animais (Sukoff Rizzo et al., 2009; Khazaie et al., 2015).

A remodelação dendrítica no hipocampo dorsal (principalmente nos espinhos de tipo cogumelo) encontrada em nossos resultados, faz parte de um grupo de mudanças

induzidas pela administração de alguns antidepressivos que vão desde o aumento da neurogênese no hipocampo (McAvoy et al., 2015) ao aumento da expressão de BDNF (Baj et al., 2012) e remodelação de interneurônios GABAérgicos em estruturas-chave para o controle emocional como a BLA (Karpova et al., 2011) e o córtex pré-frontal (Guidotti et al., 2012). Estudos futuros podem estabelecer a relação entre esses marcadores e o efeito comportamental de descontinuidade no tratamento. Podem as mudanças estruturais e moleculares induzidas pelos antidepressivos serem revertidas com a descontinuidade do tratamento? Nossos resultados na inibição da recuperação espontânea podem ser associados também ao remodelamento dentríptico hipocampal? A memória poderia se tornar precisa nessas condições? Sob a perspectiva translacional, acreditamos que essas perguntas abrem um próspero campo de pesquisa para os próximos anos na conceitualização da generalização de respostas aversivas e sua influência na redução do medo e da ansiedade por vias comportamentais e farmacológicas.

4.9 Seria a consolidação sistêmica da memória um alvo terapêutico?

Se a generalização da memória se encontra diretamente relacionada com a dependência hipocampal e como mostrado em nossos resultados, a taxa de generalização poderia influenciar o processo de extinção, hipotetizamos um possível vínculo entre o fenômeno da consolidação sistêmica e como a extinção se desenvolve. Neste raciocínio a primeira pergunta que é possível plantear com esse raciocínio é se existe alguma relação entre a atividade hipocampal e a extinção. Devemos começar dizendo que classicamente a extinção possui um componente altamente contextual (Bouton e Bolles, 1979a), fato que pressupõe que o hipocampo será necessário durante a aquisição da extinção seja a memória dependente do hipocampo ou não. Estudos em neuroimagem demonstraram que déficits na extinção em pacientes com TEPT se encontram associados com disfunção na conectividade no circuito hipocampo-córtex pré-frontal-amígdala, particularmente na evocação de dicas previamente extinguidas (aquí, a atividade entre hipocampo e córtex pré-frontal, se encontra hipoativa (Garfinkel et al., 2014; Milad et al., 2009). Estudos em animais nos permitem estabelecer que de fato, durante a evocação de memórias remotas, estruturas hipocampais parecem ser menos necessárias; No entanto, estruturas corticais tem um papel fundamental na evocação das mesmas (Frankland et al., 2006; Pedraza et al., 2016; 2017). No entanto, o fato do córtex ser importante para a evocação não exclui que o hipocampo participe de alguma forma seja durante a evocação ou em possíveis

processos subsequentes a esta. Por exemplo, Ishikawa e colaboradores (2016) encontraram que uma reativação longa de uma memória remota engatilha temporariamente o hipocampo. Fármacos como a memantina (que aumenta a neurogênese hipocampal) promove o esquecimento do traço de memória (Akers et al., 2014). Assim, a consolidação sistêmica se mostra como um processo onde o córtex ganha uma função relevante na evocação, mas o envolvimento hipocampal pode ser dependente das condições de reativação. Sob este panorama, uma conclusão plausível é de que o hipocampo não é condição fundamental para a evocação de memórias remotas, no entanto, o hipocampo aporta informação espacial e contextual necessária para a representação do traço de memória.

Os resultados recentes de Khalaf e colaboradores (2018) proporcionam uma boa base para se pensar que o hipocampo atue como agente facilitador do processo de extinção. Neste sentido, o fato da inibição das células recrutadas durante a aquisição da memória aversiva prejudique a extinção, sugere que a reativação do engrama da memória de medo pode facilitar ao mesmo tempo a sua atenuação. Parece não ser só causalidade, que memórias remotas sejam mais difíceis de serem atenuadas (Frankland et al., 2006) e ao mesmo tempo ser principalmente hipocampo-independentes para a sua evocação como acontece no CAC. Um recente estudo avaliando expressão de c-fos em diferentes estruturas produto da extinção de memórias remotas contextuais encontrou que a redução da resposta aversiva se encontra associada com aumento de dito marcador no córtex pré-límbico, BLA, o núcleo reuniens, e as regiões CA1 e CA3 do hipocampo ventral (Silva et al., 2018). O estudo conclui que mesmo existindo um circuito responsivo ao protocolo de extinção, a intervenção não reverte as mudanças produto do condicionamento. Ao mesmo tempo, não foi possível verificar o envolvimento do hipocampo dorsal durante a extinção de memórias remotas. São poucos estudos sugerindo explicitamente a relação entre o envolvimento hipocampal dorsal e o resultado da extinção, no entanto, algumas evidências podem ser citadas. Por exemplo, tarefas envolvendo o hipocampo como o campo aberto facilita a extinção quando a precedem ou antecedem curtamente no tempo a sessão de extinção (de Carvalho Myskiw et al., 2014; Wang et al., 2016), um efeito que tem sido associado com atividade de receptores β -adrenergicos no hipocampo e vias PKA-CREB (Liu et al., 2015).

Por outro lado, o aumento na expressão de mediadores de processos epigenéticos como as metiltransferases no giro denteado do hipocampo dorsal, aumenta a expressão de c-fos

durante a extinção de memórias contextuais e previne a renovação da resposta aversiva em memórias remotas (Gong e Zhou, 2018). A diminuição de cinases como a ERK5 que medeia a neurogênese hipocampal, prejudica a consolidação de memórias contextuais aversivas (e sua subsequente extinção), além de prejuízos sobre a flexibilidade cognitiva em tarefas espaciais como o labirinto aquático de Morris (Pan et al., 2012). A indução de neurogênese hipocampal tem se proposto como um dos mecanismos principais do efeito terapêutico dos antidepressivos. Essa perspectiva que abandona parcialmente a hipótese monoaminérgica da depressão para se focar em mudanças plásticas em circuitos encefálicos, tem levado a propor conceitos como o *iPlasticity* (acrônimo do inglês de *Antidepressants induce juvenile-like plasticity*) (Figura 19); este conceito é fundamentado na capacidade de alguns antidepressivos como a fluoxetina de renovar a capacidade neuroplástica do encéfalo no estado adulto a níveis comparáveis com os demonstrados em períodos críticos da puberdade, permitindo assim, uma melhor assimilação de aprendizados adaptativos como a extinção (Umemori et al., 2018).

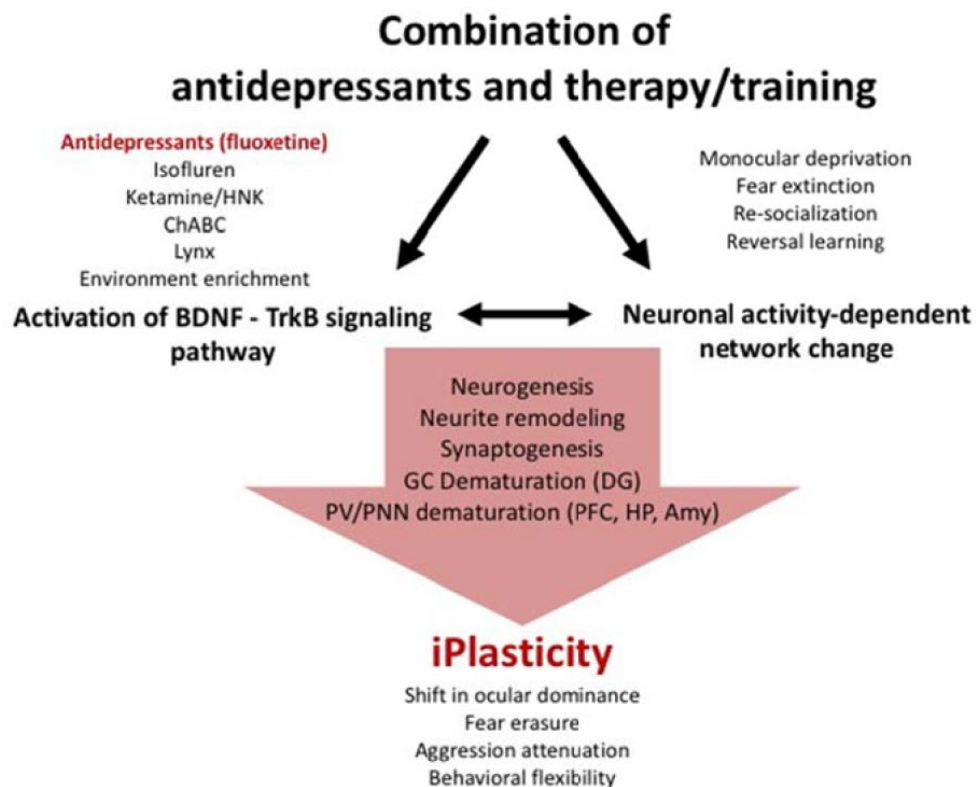


Figura 19. Modelo iPlasticity (Antidepressants induce juvenile-like plasticity). O iPlasticity é um modelo que sintetiza avanços recentes ao redor da plasticidade induzida por antidepressivos como a fluoxetina no encéfalo adulto, comparável ao encéfalo na

puberdade. Dentro dos possíveis fármacos, não somente se contemplam os antidepressivos clássicos, mas também substâncias como a Cetamina com um comprovado e rápido efeito antidepressivo. Utilizar esses fármacos permite que intervenções terapêuticas como a extinção sejam melhor assimiladas por meio de processos como neurogênese e remodelação dendrítica de estruturas chave para o processamento emocional. Sendo assim, o tratamento conjunto entre farmacologia e psicoterapia poderia contribuir para redução do medo e ansiedade, flexibilidade cognitiva e atenuação de respostas de agressividade dentre outros múltiplos comportamentos altamente adaptativos. Figura tomada de Umemori e colaboradores (2018).

Mesmo que são várias as evidências mostrando a capacidade de antidepressivos para aumentar a flexibilidade cognitiva e com ela a possibilidade de se adaptar melhor a mudanças ambientais (Rantamäki et al., 2007; Vetencourt et al., 2008; Castrén e Hen, 2013; Karpova et al., 2011, Mikics et al., 2017), nossos resultados confirmam essa possibilidade, e a possibilidade de evitar a generalização. De fato nosso estudo, é o segundo em mostrar que o citalopram não pode ser comparado aos efeitos da fluoxetina na extinção de memórias aversivas. A diferença do estudo de Burghardt e colaboradores (2013), não foram identificados em nossos resultados efeitos significativos que mostre indicações de que o tratamento pode prejudicar nosso protocolo, no entanto, acreditamos que é necessário continuar explorando os efeitos do citalopram na generalização da memória e com ele, seus efeitos na morfologia do hipocampo. É preciso lembrar que outra substância, muito similar ao citalopram, o escitalopram tem se mostrado efetivo corrigindo o fenótipo de animais submetidos a modelos de TEPT (Lin et al., 2016), bem como em humanos facilitando a extinção em indivíduos saudáveis (Bui et al., 2013). Assim o panorama se mostra altamente complexo e aumenta a necessidade de protocolos mais precisos para a seleção do tratamento na prática clínica.

Nossos resultados sugerem que a consolidação sistêmica é um alvo terapêutico assim como sua estreita relação com a generalização da memória. Essa conclusão não só se desprende do trabalho aqui apresentado com fluoxetina, mas também de estudos prévios do nosso laboratório mostrando que a manipulação desse processo com outros fármacos como o propranolol e a metirapona podem mudar a dependência hipocampal e com ela o surgimento de respostas não adaptativas como a generalização (Pedraza et al., 2016). Estudos futuros deverão explorar principalmente exceções como citado anteriormente

onde generalização e dependência hipocampal não estejam correlacionados em memórias aversivas contextuais, assim como o perfil na morfologia hipocampal e neogênese induzida por diferentes fármacos antidepressivos que expliquem os resultados verificados no comportamento.

4.10 Caminhando para uma psiquiatria de precisão.

A introdução desta tese teve uma grande ênfase nas limitações do tratamento farmacológico e comportamental seguindo um esquema de tentativa e erro. Na psiquiatria e na psicologia clínica quando analisada exclusivamente em sua prática, se encontra limitada e poderíamos dizer atrasada em comparação com o tratamento de outras especialidades médicas. Mas também é verdade que a psicopatologia é um fenômeno altamente complexo que desde uma perspectiva básica está atingindo avanços consideráveis. No caso da depressão, por exemplo, um estudo demonstrou a capacidade de prever estados de ânimo por meio de algoritmos de aprendizado de máquina em pacientes com múltiplos eletrodos implantados no encéfalo como parte do tratamento de epilepsia refrataria (Sani et al., 2018). O modelo foi construído para cada paciente (n=9), onde o estado de ânimo foi avaliado através do teste de estado de ânimo imediato (*Immediate Mood Scaler*) concomitante com a análise do poder espectral no momento do teste em regiões do sistema límbico. Desta forma, o modelo baseado só na atividade eletrofisiológica podia prever o possível estado de ânimo do paciente num momento particular. Pouco tempo depois, um artigo do mesmo grupo mostrou que, o modelo permitia selecionar a área de intervenção e avaliar o resultado da estimulação elétrica profunda com o intuito de mudar estados de depressão aguda de forma específica e sob demanda (Rao et al., 2018).

Estudos anteriores já tinham demonstrado que aproximações parecidas poderiam prever se um paciente será responsivo ou não ao tratamento com ISRS (Iosifescu et al., 2009). Em nosso manuscrito com fluoxetina defendemos que as características individuais devem ser consideradas na seleção do tratamento, assim como a taxa de generalização da memória que pode prever a efetividade de intervenções como a extinção.

Um potencial problema surge quando se discute qual seria o critério ou como defini-los para separar generalizadores de discriminadores. Duas estratégias foram utilizadas em

nosso trabalho. A primeira foi uma seleção manual baseada só na distribuição normal da população e considerando de forma arbitrária os extremos como pertencentes a um grupo em particular. Como foi observado, mesmo com um resultado robusto, esse tipo de seleção não é totalmente objetiva. Considerando um método mais padronizado que consiga ser replicado em outros laboratórios decidimos usar um modelo de aprendizado de máquina não supervisionado chamado de “Algoritmo de Maximização da Expectativa” (em inglês, *expectation–maximization (EM) algorithm*). De forma geral, o algoritmo tem a capacidade estatística para estimar parâmetros em um grande volume de dados assim como elementos comuns aos dados em questão, o qual se fundamenta em uma análise de máxima verosimilhança ou probabilidade (Grosso et al., 2018). A verosimilhança permite calcular a probabilidade dos dados gerarem os resultados obtidos assim como agrupar dados em conjuntos. Um dos requisitos fundamentais deste algoritmo é que existem variáveis latentes nos dados, podendo elas serem ocultas ou deduzidas por observação.

Em nossa análise, ditas variáveis foram estabelecidas *a priori*, ou seja, o número de conjuntos ou *clusters* que poderiam ser formados a partir dos dados ingressados foi baseada em observação, isto é, que os dados poderiam agrupar populações neutras, generalizadoras e discriminadoras. Mesmo que os conjuntos são definidos de forma pré-determinada, a seleção de dados individuais a cada conjunto é não supervisionada e definida inteiramente pelo algoritmo. O algoritmo deve começar com a estimativa de um vetor inicial onde a agrupação subsequente dependerá da proximidade do dado com o vetor. Cada estimativa de um novo dado pertencente a um conjunto muda imediatamente a densidade dos padrões nesse vetor. Esse procedimento deve realizar-se até que a classificação total dos dados seja realizada (Figura 20).

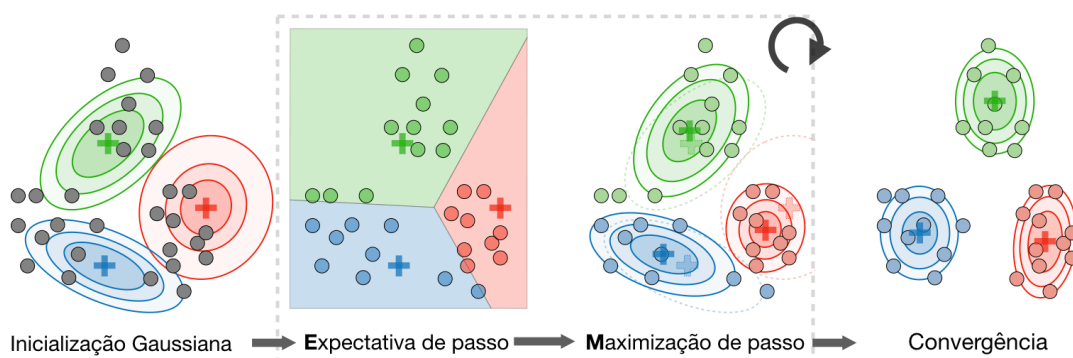


Figura 20. Algoritmo de Maximização da Expectativa. O algoritmo permite de forma não supervisionada a agrupação de dados individuais em conjuntos ou clusters. O número

de conjuntos pode ser formado pelo algoritmo, se as características que compõem os dados são ocultas, ou podem ser selecionados *a priori* se existe um conhecimento prévio da estrutura dos dados. Este algoritmo permite gerar limites de máximos e mínimos onde um dado pode ser colocado em relação a um vetor central. Dependendo da análise, o centróide pode usar a distância euclidiana ao quadrado para determinar distâncias respeito a outros centróides e conseqüentemente o limite entre conjuntos.

A aplicação destes algoritmos assim como outros de aprendizado automático podem ser gerados por meio de ferramentas de programação pr;/desenhadas implementadas em linguagens como MATLAB e Python, mas também estão disponíveis em entornos visuais mais simples como nos programas Orange e Weka.

A implementação do algoritmo permitiu em nossos resultados excluir a influência de métodos de seleção arbitrários e confirmar a veracidade dos nossos dados. É importante salientar que o algoritmo fez uma redução de 42% para os animais classificados como discriminadores e de 71% para animais classificados como generalizadores, restringindo consideravelmente o número de indivíduos para a análise posterior. Mesmo assim, os mesmos resultados foram encontrados, mostrando que critérios mais objetivos de classificação mantém as relações reportadas entre discriminação e a subseqüente extinção.

Essa última aproximação usando aprendizado de máquina não supervisionado teve por objetivo aplicar, parcialmente, um método de hipótese guiadas por resultados (Vu et al., 2018), tendência que está começando a tomar força na literatura e contrasta com o método clássico de hipóteses *a priori* guiando desenhos experimentais. Outro exemplo desta perspectiva foi recentemente demonstrada por Shumake e colaboradores (2018) que, por meio de uma regressão logística de grandes populações, foi possível estabelecer um critério objetivo para remissão após a extinção, isto é, um valor que representasse uma redução da resposta aversiva com sucesso após a intervenção. No mesmo trabalho foi possível identificar subgrupos que mostram diferentes perfis de extinção dependendo do congelamento mostrado inicialmente antes do protocolo. Em nosso caso, preferimos usar a palavra “parcialmente” pois, como mencionado, escolher o número de grupos possíveis em nossa população influencia a elaboração dos conjuntos. Acreditamos que um experimento potencialmente interessante para seguir com nosso trabalho é determinar o

perfil de generalização e aplicar fluoxetina ou outros antidepressivos para avaliar a resposta dependendo deste fenótipo antes da intervenção.

Quando falamos de psiquiatria de precisão, como os métodos de pesquisa básica e clínica que procuram entender e individualizar o tratamento de cada paciente, mas também tentando identificar fatores comuns entre psicopatologias (Widge et al., 2017), necessariamente devemos assumir que cada indivíduo pode reagir de formas diferentes à estímulos ambientais similares. No caso de modelos animais parece claro que, se uma população de animais submetidos ao mesmo protocolo experimental, em condições moradia similares, com as mesmas condições ambientais e manipulações padrão ao longo do experimento podem reagir diferente ao mesmo estímulo estressor (em nosso caso diferentes taxas de generalização da resposta aversiva), mostrar perfis de extinção variados (como no caso de Shumake e colaboradores (2018) ou ser classificados como resistentes ou vulneráveis ao desenvolvimento de comportamentos associados com depressão (ver Hultman et al., 2018), significa que como acontece em humanos, modelos animais de transtornos psiquiátricos devem contemplar que estados de animo, medo e ansiedade, assim como habilidades cognitivas complexas, estão inexoravelmente regidas por fatores individuais que devem ser estudados.

Desta forma, propomos algumas perguntas que podem exemplificar nosso ponto de vista: Poderia a fluoxetina reverter a generalização em animais com tendência a esse comportamento?; teria o tratamento com fluoxetina um melhor desempenho em animais classificados como discriminadores em relação aos generalizadores?; seria possível que algum fármaco (seja fluoxetina ou outro diferente) com efeito antidepressivo se adequasse melhor ao perfil de indivíduos generalizadores?, indivíduos classificados como generalizadores poderiam mostrar mudanças basais na morfologia hipocampal?. Todas as perguntas anteriormente mencionadas podem ser respondidas quando contemplada a variável individual em resposta a estímulos ambientais similares. Ainda, podemos lançar outras pergunta de importância clínica: Se indivíduos reagem diferente ao mesmo estímulo em condições experimentais controladas, então como podem ser explicadas essas diferenças?

4.20 Intervenções sob demanda em pesquisa básica e clínica

A estimulação elétrica profunda tem se mostrado significativamente efetiva para transtornos de tipo motor como o Parkinson e a distonia (Ponce e Lozano, 2010), no entanto, esta área ainda é muito nova quando o assunto é populações psiquiátricas (Cleary et al., 2015). A estimulação profunda se encontra aprovada pela FDA somente para casos refratários de TOC e depressão, no entanto seu sucesso parece menor comparado com outro tipo de doenças neurológicas (Graat et al., 2017). Uma possível explicação é a natureza cognitiva (patognomônica) da própria doença psiquiátrica, isto é, a diferença de transtornos neurológicos, doenças psiquiátricas carecem de marcadores objetivos, confiáveis e replicáveis que permitam guiar um tratamento preciso (Herman e Widge, 2019), um ponto discutido ao longo desta tese que também permite entender porque a psicofarmacologia e a psicoterapia (mesmo que heterogêneos em seu mecanismos de ação e efeitos adversos), continuam sendo o tratamento padrão-ouro na psiquiatria e psicologia clínica. Assim, a implementação de tratamentos baseados em estimulação elétrica, seja ela invasiva ou não, seguem o mesmo caminho de baixa precisão. Por exemplo, intervenções com eletrodos profundos devem superar algumas limitações técnicas e fisiológicas como a necessidade de mudar o implante e fonte elétrica do dispositivo, a degradação do material dos eletrodos, assim como reações de gliose que podem diminuir a intensidade e conseqüentemente a efetividade da estimulação (Jorfi et al., 2014). No caso de transtornos psiquiátricos, algumas outras preocupações devem ser propostas e estudadas, como o efeito adverso na cognição com a estimulação contínua em circuito aberto.

Nossos resultados preliminares mostrando um sistema de estimulação sob demanda por meio da detecção de ripples hipocámpais, abre um caminho para estratégias de estimulação elétrica guiadas exclusivamente por marcadores neurofisiológicos associados com a patologia em particular. Por exemplo, Wu e colaboradores (2018) mostraram que a detecção em tempo real de aumento de poder na banda delta no núcleo accumbens, prediz comportamentos de compulsão por comida palatável em camundongos. O mesmo marcador foi utilizado para gerar uma estimulação na mesma região que além de inibir o aumento do poder espectral nesta banda, inibe também o comportamento compulsivo. O estudo é um dos poucos exemplos de sucesso na utilização de marcadores específicos

para o tratamento de comportamentos não adaptativos considerados de interesse clínico em psiquiatria. O caráter sistêmico das doenças neuropsiquiátricas faz que ditos marcadores sejam ainda mais difíceis de serem encontrados. Até hoje, o futuro da estimulação elétrica invasiva e não invasiva sob demanda em psiquiatria se encontra principalmente no plano teórico com pouca evidência sólida (Widge et al., 2018). Em nossos experimentos, decidimos focar nossos esforços em utilizar um marcador generalizável e amplamente estudado para melhorar processos cognitivos decorrentes da extinção. Neste sentido, a escolha de ripples hipocampais se mostra historicamente respaldada por grandes evidências mostrando seu papel nos processos de consolidação de memórias hipocampo dependentes, mas também recentemente em tarefas motoras (Cousins et al., 2016) e não dependentes do hipocampo (Sawangjit et al., 2018). A grande dependência contextual da extinção (Bouton e Bolles, 1979b) permitiu também que o ripple hipocampal fosse um candidato adequado como possível mecanismo associado com a consolidação de cada sessão de extinção. Nossos resultados mostraram que a estimulação precisa em circuito fechado entre o ripple hipocampal e o sistema de reforço do encéfalo pode melhorar a extinção de memórias emocionais fortes que compartilham características com as demonstradas em condições clínicas no TEPT como a generalização e a resistência à extinção (Maren et al., 2013). É necessário salientar que o efeito aqui mostrado vai além de um estímulo apetitivo próximo à sessão de extinção, conclusão favorecida pela ausência de efeito em animais estimulados em circuito aberto.

Concluimos que mesmo sendo preliminares, nossos resultados sugerem que o conteúdo emocional da memória pode ser modulado pela manipulação do estado interno do animal no preciso momento que o ripple hipocampal surge, ripple que hipotetizamos, tem uma relação direta com a prévia experiência de extinção do animal. Maingret e colaboradores (2016) mostraram que na sessão de sono imediatamente seguinte a uma sessão de aprendizado (se o treinamento foi suficientemente significativo para gerar um traço de memória) aumenta significativamente a coerência entre ripples hipocampais, spindles corticais e ondas delta, sugerindo que experiências de aprendizado e a consolidação da memória se encontram estreitamente relacionados com ditos marcadores. O aumento na expressão de ripples induzida pelas sessões de estimulação indicam que existe a possibilidade que a expressão deste marcador seja sensível de condicionamento, isto é, por meio de emparelhamento de uma determinada atividade neuronal com reforço, aumenta a probabilidade de ocorrência desta atividade. Uma proposta nunca mostrada

com ripples hipocampais mas que constitui as bases das pesquisas em interfases cérebro-maquina (Lebedev e Nicolelis, 2017) e com muitas evidências utilizando potenciais de campo (Hernández-González et al., 2017) como neurônios individuais (Athalye et al., 2017). Uma versão ainda mais prática deste conceito pode ser verificada em alguns tipos de neurofeedback que procuram o controle voluntário de oscilações ou atividade encefálica como estratégia no tratamento transtornos psiquiátricos (Herwig et al., 2019).

Devemos enfatizar que estudos futuros devem ser realizados para determinar se o mesmo protocolo pode influenciar a consolidação e a manutenção de memórias não emocionais como aquelas provenientes da localização de objetos ou tarefas apetitivas. Estudar estes mecanismos sobre o esquecimento também pode ser muito útil sob a perspectiva translacional (para uma revisão das bases neurais do esquecimento, ver (Medina, 2018; Davis e Zhong, 2017; Sachser et al., 2017)).

O caminho para uma psiquiatria e psicologia clínica de precisão ainda parece longo, no entanto aos poucos estamos gerando uma importante aproximação transdiagnóstica, isto é, não somente na pesquisa básica, mas também nas intervenções clínicas cognitivo-comportamentais. Esta ideia nos permite focar na recuperação funcional dos pacientes muito além dos critérios diagnósticos e de remissão estabelecidos pelos sistemas clássicos de classificação como o DSM (Roy-Byrne, 2017). Na pesquisa, o estudo de fatores individuais tem se apoiado em novos métodos de análise como o aprendizado supervisionado e não supervisionado que permitem extrair informações dos dados baseados só em sua estrutura e prever respostas futuras considerando o desempenho do animal em prévias sessões experimentais (Wallis, 2018; Hultman et al., 2018; Zhao et al., 2018; Liang et al., 2018; Carlson et al., 2017; Schaich et al., 2017; Rich e Wallis, 2016; Nieh et al., 2015). Os mesmos métodos de análise são e serão possivelmente os que permitam intervenções de estimulação sob demanda com suficiente precisão para iniciar a mudança, abandonando gradualmente a estimulação em circuito aberto atualmente disponível.

Estes avanços supradescritos aliados com marcos teóricos focados na psicopatologia como um fenômeno multifatorial, altamente susceptível a comorbidades, com fronteiras difusas e altamente dependentes de fatores individuais parece ser o caminho a seguir para abandonar progressivamente o sistema de tentativa e erro que aqui tem sido questionado.

E que tem sido utilizado utilizado pela psiquiatria e psicologia clínica clássica. Portanto, entendemos que o propósito central da psiquiatria de precisão é auxiliar pacientes sob uma perspectiva individual considerando seus antecedentes clinicamente relevantes e suas possíveis comorbidades que ocorrem devido este dinamismo entre as múltiplas fronteiras difusas e dependentes de fatores plenamente subjetivos.

5. Limitações e perspectivas futuras

5.1 Experimentos com cafeína

Uma limitação evidente nestes experimentos foi a ausência de um estudo de curva resposta completo. Como foi sugerido durante a revisão por pares, uma dose alternativa foi utilizada com o intuito de mostrar a dose na qual a cafeína teria efeito na locomoção (Ver anexo 1). A dose de 20mg/kg como explicado no texto foi escolhida visando um potencial efeito ansiolítico previamente publicado, assim como estudar se a mesma dose poderia estabelecer algum tipo de preferência ou aversão condicionada. Futuros estudos devem incluir uma dose de cafeína com um perfil totalmente oposto, assim como doses menores com o intuito de determinar a dose mínima mantendo o efeito na redução da resposta aversiva. Também, é possível dizer que mesmo significativo, o efeito no condicionamento de preferência de local não foi tão robusto, fato que apoia a ideia de incluir mais doses neste protocolo.

Nossos resultados e interpretações sobre a reconsolidação, estão principalmente fundamentados em estudos prévios do nosso laboratório mostrando que os tempos de reativação utilizados podem desencadear processos de labilização/reconsolidação da memória, no entanto o estudo carece de uma manipulação sistêmica ou local que revertesse o efeito da cafeína, por exemplo, com a administração de um inibidor de síntese de proteína após cada reativação periódica. Essa preocupação foi evidente para nossos revisores, tão logo, não descartamos a possibilidade que o efeito seja em parte por extinção. Mesmo assim, foi defendida a hipótese da reconsolidação considerando que a reativação periódica foi insuficiente para induzir extinção em todos os protocolos testados. Contudo, ao longo do texto, focamos no efeito comportamental que emerge da reativação periódica concomitante com o tratamento de cafeína que abre potenciais aplicações práticas muito além de um marco teórico específico.

O efeito da cafeína na extinção e na reconsolidação, assim como estudos utilizando antagonistas específicos de receptores adenosinérgicos são essenciais para desvendar os mecanismos que permitem a atenuação progressiva da memória de medo.

5.2 Experimentos com Fluoxetina

Uma limitação evidente do nosso estudo foi utilizar dois fármacos diferentes (fluoxetina e citalopram) embora tenhamos estudado a morfologia hipocampal apenas utilizando fluoxetina. Neste caso, nossa hipótese é de que o citalopram não promoveria efeitos nos espinhos dendríticos. Tivemos consciência deste problema desde o início do trabalho, mas limitações técnicas e logísticas com nossos colaboradores obrigaram a focar nossos esforços na fluoxetina onde foi verificado o efeito facilitatório. Acreditamos que a resposta sobre a diferença entre fluoxetina e citalopram poderia ser encontrada na indução indução diferencial de morfologia hipocampal por cada um desses fármacos.

Por outro lado, os efeitos antidepressivos se encontram associados com a neurogênese hipocampal. Nosso estudo carece desta evidência e pode ser uma variável importante conhecendo que a neurogênese no hipocampo contribui a processos de separação de padrões (Frankland et al., 2013) que por sua vez tem sido identificado como mediador na generalização da memória (Rudy e O'Reilly, 1999). A neurogênese no giro denteado também possui papel central sobre o esquecimento (Akers et al., 2014). Em nosso último experimento, quando dividimos generalizadores e discriminadores, uma análise subsequente da morfologia hipocampal e neurogênese desses animais selecionados poderia fornecer um melhor entendimento sobre as diferenças entre esses fenótipos.

Finalmente, mesmo que pode ser inferido pelo nosso desenho experimental assim como por outros estudos, poderia ser interessante manter o tratamento ao longo de todo o experimento (tratamento contínuo desde o condicionamento até a recuperação espontânea). No entanto, considerando que Karpova e colaboradores (2011) mantém a fluoxetina durante o período de intervenção, nossos resultados foram valiosos para mostrar que o efeito de retirada ou descontinuação do fármaco poderia limitar o efeito terapêutico da fluoxetina.

6. Conclusões finais

Os experimentos aqui demonstrados abordaram dois mecanismos farmacológicos para a atenuação de respostas aversivas, o primeiro utilizando uma substância amplamente consumida e de fácil acesso como a cafeína e o segundo, por meio de uma ferramenta farmacológica clássica utilizada no tratamento de várias psicopatologias entre elas os transtornos relacionados ao trauma e a depressão, a fluoxetina. As duas substâncias se mostraram efetivas em diminuir a resposta de medo por meio de estratégias comportamentais diferentes (reativação periódica e extinção através da inibição da generalização) e abrem a possibilidade para que substâncias naturais sejam contempladas no tratamento clínico em interação ou não com a farmacologia convencional. Tentamos utilizar métodos de análise que permitissem diminuir a influência das hipóteses *a priori*, do pesquisador, assim como foi coletada ampla evidência que esses métodos e em geral aqueles provenientes da inteligência artificial, podem abrir caminho para uma ciência básica onde se contemplem fatores individuais assim como uma futura intervenção clínica com forte ênfase no marco transdiagnóstico aqui discutido (psiquiatria de precisão). Uma primeira aproximação, em nosso conhecimento inédita, foi mostrada aqui por meio da estimulação de alta precisão sob demanda em circuitos de reforço guiados por marcadores mnemônicos. Estratégias deste tipo construirão a uma psiquiatria e psicologia clínica cada vez mais objetiva e com mais precisão, devido a que a heterogeneidade clínica dos transtornos psiquiátricos sugere que os tratamentos consigam ser adaptados de forma personalizada.

7. Referências

- Abraham HD, Aldridge AM, Gogia P. 1996. The psychopharmacology of hallucinogens. *Neuropsychopharmacology*. 14(4):285-98.
- Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De Cristofaro A, Hsiang HL, Wheeler AL, Guskjolen A, Niibori Y, Shoji H, Ohira K, Richards BA, Miyakawa T, Josselyn SA, Frankland PW. 2014. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*. 344(6184):598-602. doi: 10.1126/science.1248903.
- Albasser MM, Dumont JR, Amin E, Holmes JD, Horne MR, Pearce JM, Aggleton JP. 2013. Association rules for rat spatial learning: the importance of the hippocampus for binding item identity with item location. *Hippocampus*. 23(12), 1162-78.
- Al-Kaysi AM, Al-Ani A, Loo CK, Powell TY, Martin DM, Breakspear M, Boonstra TW. 2017. Predicting tDCS treatment outcomes of patients with major depressive disorder using automated EEG classification. *J Affect Disord*. 208:597-603. doi: 10.1016/j.jad.2016.10.021.
- Al Rahim M, Rimando AM, Silistreli K, El-Alfy AT. 2013. Anxiolytic action of pterostilbene: involvement of hippocampal ERK phosphorylation. *Planta Med*. 79(9):723-30. doi: 10.1055/s-0032-1328553.
- Alvares L de O, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*. 22(5):1092-5. doi: 10.1002/hipo.20983.
- American Psychiatric Association (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed., Text Revision). Washington, DC: Author.
- American Psychiatric Association. 2013 *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.

- Andersen RA, Burdick JW, Musallam S, Scherberger H, Pesaran B, Meeker D, Corneil BD, Fineman I, Nenadic Z, Braunchaud E, Cham JG, Greger B, Tai YC, Mojarradi MM. 2004. Recording Advances for Neural Prosthetics. Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE IMBS. 7:5352-5.
- Angelucci ME, Cesário C, Hiroi RH, Rosalen PL, Da Cunha C. 2002. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Braz J Med Biol Res.* 35(10):1201-8.
- Angelucci ME, Vital MA, Cesário C, Zadusky CR, Rosalen PL, Da Cunha C. 1999. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *Eur J Pharmacol.* 373(2-3):135-40.
- Asher GN, Gerkin J, Gaynes BN. 2017. Complementary Therapies for Mental Health Disorders. 10.1016/j.mcna.2017.04.004.
- Asok A, Kandel ER, Rayman JB. 2019. The Neurobiology of Fear Generalization. *Frontiers in behavioral neuroscience.* 12, 329. doi:10.3389/fnbeh.2018.00329.
- Athalye VR, Ganguly K, Costa RM, Carmena JM. 2017. Emergence of Coordinated Neural Dynamics Underlies Neuroprosthetic Learning and Skillful Control. *Neuron.* 93(4):955-970.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.016.
- Auber A, Tedesco V, Jones CE, Monfils MH, Chiamulera C. 2013. Post-retrieval extinction as reconsolidation interference: methodological issues or boundary conditions?. *Psychopharmacology (Berl).* 226(4):631-47. doi: 10.1007/s00213-013-3004-1.
- Bach DR, Tzovara A, Vunder J. 2018. Blocking human fear memory with the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline. *Mol Psychiatry.* 23(7):1584-1589. doi: 10.1038/mp.2017.65.
- Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L, Mallei A, Sartori CR, Sciancalepore M, Tardito D, Langone F, Popoli M, Tongiorgi E. 2012. Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further

evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology*. 37(7):1600-11. doi: 10.1038/npp.2012.5.

Bagley J, Moghaddam B. 1997. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience*. 77(1):65-73.

Baker KD, McNally GP², Richardson R. 2018. d-Cycloserine facilitates fear extinction in adolescent rats and differentially affects medial and lateral prefrontal cortex activation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 86:262-269. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.06.007.

Bakker A, van Balkom AJ, van Dyck R. 2000. Selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of panic disorder and agoraphobia. *Int Clin Psychopharmacol*. 15; 2:S25-30.

Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, et al. 2014. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*. 28: 403e39.

Baldwin HA, Johnston AL, File SE. 1989. Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol*. 159(2):211-5.

Barlow DH, Gorman JM, Shear MK, Woods SW. 2000. Cognitive-behavioral therapy, imipramine, or their combination for panic disorder: A randomized controlled trial. *JAMA*. 283(19):2529-36.

Barreiro KA, Suárez LD, Lynch VM, Molina VA, Delorenzi A. 2013. Memory expression is independent of memory labilization/reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 106:283-91. doi: 10.1016/j.nlm.2013.10.006.

Batelaan NM, Bosman RC, Muntingh A, Scholten WD, Huijbregts KM, van Balkom AJLM. 2017. Risk of relapse after antidepressant discontinuation in anxiety disorders, obsessive-compulsive disorder, and post-traumatic stress disorder: systematic review and meta-analysis of relapse

prevention trials. *BMJ*. 358:j3927. doi: 10.1136/bmj.j3927.

Bauer EP, LeDoux JE, Nader K. 2001. Fear conditioning and LTP in the lateral amygdala are sensitive to the same stimulus contingencies. *Nat Neurosci*. 4(7):687-8.

Beggiato S, Antonelli T, Tomasini MC, Borelli AC, Agnati LF, Tanganelli S, Fuxe K, Ferraro L. 2014. Adenosine A2A-D2 receptor-receptor interactions in putative heteromers in the regulation of the striato-pallidal gaba pathway: possible relevance for parkinson's disease and its treatment. *Curr Protein Pept Sci*. 15(7):673-80.

Behrens TEJ, Muller TH, Whittington JCR, Baram AB, Kurth-Nelson Z. 2018. What Is a Cognitive Map? Organizing Knowledge for Flexible Behavior. *Neuron*. 100(2):490-509.

Belouin SJ, Henningfield JE. 2018. Psychedelics: Where we are now, why we got here, what we must do. *Neuropharmacology* 2018 Feb 21. pii: S0028-3908(18)30075-3. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.02.018.

Ben Mamou C, Gamache K, Nader K. 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci*. 9:1237–1239, doi:10.1038/nn1778, pmid:16998481.

Berger W, Mendlowicz M, Marques-Portella C, et al. Pharmacologic alternatives to antidepressants in posttraumatic stress disorder: a systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych*. 2009;33:169-180.

Bergeron R, Ravindran AV, Chaput Y, et al. 2002. Sertraline and fluoxetine treatment of obsessive-compulsive disorder: results of a double-blind, 6-month treatment study. *J Clin Psychopharmacol*. 22:148-154.

Berton O, Nestler EJ. 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat*

Rev Neurosci 7(2):137-51. doi: 10.1038/nrn1846.

Besnard A, Sahay A. 2016. Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization, and Stress. *Neuropsychopharmacology*. 41(1):24-44. doi: 10.1038/npp.2015.167.

Bhattacharya SK, Satyan KS, Chakrabarti A. 1997. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol*. 11(3):219-24.

Birkett MA, Shinday NM, Kessler EJ, Meyer JS, Ritchie S, Rowlett JK. 2011. Acute anxiogenic-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors are attenuated by the benzodiazepine diazepam in BALB/c mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 98(4):544-51. doi: 10.1016/j.pbb.2011.03.006.

Bocchio M, Nabavi S, Capogna M. 2017. Synaptic Plasticity, Engrams, and Network Oscillations in Amygdala Circuits for Storage and Retrieval of Emotional Memories. *Neuron*. 94(4):731-743. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.022.

Boehnlein JK, Kinzie JD. 2007. Pharmacologic reduction of CNS noradrenergic activity in PTSD: the case for clonidine and prazosin. *J Psychiatr Pract*. 13(2):72-8.

Bogenschutz MP, Ross S. 2018. Therapeutic Applications of Classic Hallucinogens. *Curr Top Behav Neurosci* 36:361-391. doi: 10.1007/7854_2016_464.

Bonnet MH, Balkin TJ, Dinges DF, Roehrs T, Rogers NL, Wesensten NJ; Sleep Deprivation and Stimulant Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. 2005. The use of stimulants to modify performance during sleep loss: a review by the sleep deprivation and Stimulant Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *Sleep*. 28(9):1163-87.

Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*. 400(6745):671-5.

Borota D, Murray E, Keceli G, Chang A, Watabe JM, Ly M, Toscano JP, Yassa MA. 2014. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in

- humans. *Nat Neurosci.* 17(2):201-3. doi: 10.1038/nn.3623.
- Bouton ME. 2002. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry.* 52(10):976-86.
- Bouton ME, Bolles RC. 1979a. Role of conditioned contextual stimuli in reinstatement of extinguished fear. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 5(4):368-78.
- Bouton ME, Bolles RC. 1979b. Contextual Control of the Extinction of Conditioned Fear. *Learn Motiv.* 10:445-466.
- Bouton ME, Vurbic D, Woods AM. 2008. D-cycloserine facilitates context-specific fear extinction learning. *Neurobiol Learn Mem.* 90(3):504-10. doi: 10.1016/j.nlm.2008.07.003.
- Brewin CR, Dalgleish T, Joseph S. 1996. A dual representation theory of posttraumatic stress disorder. *Psychol Rev.* 103(4):670-86.
- Brewin CR, Holmes EA. 2003. Psychological theories of posttraumatic stress disorder. *Clin Psychol Rev.* 23(3):339-76.
- Brockwell NT, Eikelboom R, Beninger RJ. 1991. Caffeine-induced place and taste conditioning: production of dose-dependent preference and aversion. *Pharmacol Biochem Behav.* 38(3):513-7.
- Brown TE, Wilson AR, Cocking DL, Sorg BA. 2009. Inhibition of matrix metalloproteinase activity disrupts reconsolidation but not consolidation of a fear memory. *Neurobiol Learn Mem.* 91(1):66-72. doi: 10.1016/j.nlm.2008.09.003.
- Bruder GE, Sedoruk JP, Stewart JW, McGrath PJ, Quitkin FM, Tenke CE. 2008. Electroencephalographic alpha measures predict therapeutic response to a selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant: pre- and post-treatment findings. *Biol Psychiatry.* 63(12):1171-7.

- Brunet A, Orr SP, Tremblay J, Robertson K, Nader K, Pitman RK. 2008. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res.* 42(6):503-6.
- Brunet A, Saumier D, Liu A, Streiner DL, Tremblay J, Pitman RK. 2018. Reduction of PTSD Symptoms With Pre-Reactivation Propranolol Therapy: A Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry.* 175(5):427-433. doi: 10.1176/appi.ajp.2017.17050481.
- Bui E, Orr SP, Jacoby RJ, Keshaviah A, LeBlanc NJ, Milad MR, Pollack MH, Simon NM. 2013. Two weeks of pretreatment with escitalopram facilitates extinction learning in healthy individuals. *Hum Psychopharmacol.* 28(5):447-56. doi: 10.1002/hup.2330.
- Bulganin L, Bach DR, Wittmann BC. 2014. Prior fear conditioning and reward learning interact in fear and reward networks. *Frontiers in behavioral neuroscience.* 8, 67. doi:10.3389/fnbeh.2014.00067
- Bunge, M. 1960. *La ciencia. Su método y su filosofía.* Cap. I y II. Bs. As. Siglo XX.
- Burghardt NS, Bush DE, McEwen BS, LeDoux JE. 2007. Acute selective serotonin reuptake inhibitors increase conditioned fear expression: blockade with a 5-HT(2C) receptor antagonist. *Biol Psychiatry.* 62(10):1111-8.
- Burghardt NS, Sigurdsson T, Gorman JM, McEwen BS, LeDoux JE. 2013. Chronic antidepressant treatment impairs the acquisition of fear extinction. *Biol Psychiatry.* 2013 Jun 1;73(11):1078-86. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.10.012.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology.* 34:446–457.

- Buzsáki, 2009. Rhythms of the Brain. Oxford University Press.
- Bzdok D, Altman N, Krzywinski M. 2018. Statistics versus machine learning. *Nature Methods*. 15, 233.
- Bzdok D, Meyer-Lindenberg A. 2018. Machine Learning for Precision Psychiatry: Opportunities and Challenges. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 3(3):223-230. doi: 10.1016/j.bpsc.2017.11.007.
- Cambiaghi M, Grosso A, Likhtik E, Mazziotti R, Concina G, Renna A, Sacco T, Gordon JA, Sacchetti B. 2016. Higher-Order Sensory Cortex Drives Basolateral Amygdala Activity during the Recall of Remote, but Not Recently Learned Fearful Memories. *J Neurosci*. 36(5):1647-59. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2351-15.2016.
- Campbell AM, Park CR, Zoladz PR, Muñoz C, Fleshner M, Diamond DM. 2008. Pre-training administration of tianeptine, but not propranolol, protects hippocampus-dependent memory from being impaired by predator stress. *Eur Neuropsychopharmacol*. 18(2):87-98.
- Cappelletti S, Piacentino D, Sani G, Aromatario M. 2015. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Curr Neuropharmacol*. 13(1):71-88. doi: 10.2174/1570159X13666141210215655.
- Cardounel A, Regelson W, Kalimi M. 1999. Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. *Proc Soc Exp Biol Med*. 222(2):145-9.
- Carlson D, David LK, Gallagher NM, Vu MT, Shirley M, Hultman R, Wang J, Burrus C, McClung CA, Kumar S, Carin L, Mague SD, Dzirasa K. 2017. Dynamically Timed Stimulation of Corticolimbic Circuitry Activates a Stress-Compensatory Pathway. *Biol Psychiatry*. 82(12):904-913. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.06.008.
- Casagrande MA, Haubrich J, Pedraza LK, Popik B, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares

- L. 2018. Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiol Learn Mem.* 150:42-47. doi: 10.1016/j.nlm.2018.03.002.
- Casey BJ, Craddock N, Cuthbert BN, Hyman SE, Lee FS, Ressler KJ. 2013. DSM-5 and RDoC: progress in psychiatry research?. *Nat Rev Neurosci* 14(11):810-4. doi: 10.1038/nrn3621.
- Caspi A, Houts RM, Belsky DW, Goldman-Mellor SJ, Harrington H, Israel S, Meier MH, Ramrakha S, Shalev I, Poulton R, Moffitt TE. 2014. The p Factor: One General Psychopathology Factor in the Structure of Psychiatric Disorders? *Clin Psychol Sci.* 2(2):119-137.
- Cassini LF, Flavell CR, Amaral OB, Lee JLC. 2017. On the transition from reconsolidation to extinction of contextual fear memories. *Learn Mem.* 24:392–399
- Castrén E. 2013. Neuronal network plasticity and recovery from depression. *JAMA Psychiatry* 70(9):983-9. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.1.
- Castrén E, Hen R. 2013. Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci.* 36(5):259-67. doi: 10.1016/j.tins.2012.12.010.
- Cestari V, Castellano C. 1996. Caffeine and cocaine interaction on memory consolidation in mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 331(1):94-104.
- Chang C, Berke JD, Maren S. 2010. Single-unit activity in the medial prefrontal cortex during immediate and delayed extinction of fear in rats. *PLoS One.* 5:e11971. doi:10.1371/journal.pone.0011971
- Chan WY, Leung HT, Westbrook RF, McNally GP. 2010. Effects of recent exposure to a conditioned stimulus on extinction of Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem.* 17(10):512-21. doi: 10.1101/lm.1912510.

- Chen S, Cai D, Pearce K, Sun PY, Roberts AC, Glanzman DL. 2014. Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia*. *Elife*. 3:e03896. doi: 10.7554/eLife.03896.
- Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS. 2006. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*. 314(5796):140-3.
- Childs E, de Wit H. 2006. Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. *Psychopharmacology (Berl)*. 185(4):514-23.
- Cleary DR, Ozpinar A, Raslan AM, Ko AL. 2015. Deep brain stimulation for psychiatric disorders: where we are now. *Neurosurg Focus*. 38(6):E2. doi: 10.3171/2015.3.FOCUS1546.
- Clem RL, Huganir RL. 2010. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science*. 330(6007):1108-12. doi: 10.1126/science.1195298.
- Cogan ES, Shapses MA, Robinson TE, Tronson NC. 2018. Disrupting reconsolidation: memory erasure or blunting of emotional/motivational value?. *Neuropsychopharmacology*. doi: 10.1038/s41386-018-0082-0.
- Concina G, Cambiaghi M, Renna A, Sacchetti B. 2018. Coherent Activity between the Prelimbic and Auditory Cortex in the Slow-Gamma Band Underlies Fear Discrimination. *J Neurosci*. 38(39):8313-8328. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0540-18.2018.
- Corley MJ, Caruso MJ, Takahashi LK. 2012. Stress-induced enhancement of fear conditioning and sensitization facilitates extinction-resistant and habituation-resistant fear behaviors in a novel animal model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav*. 105(2):408-16. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.08.037.

- Costanzi M, Cannas S, Sarauli D, Rossi-Arnaud C, Cestari V. 2011. Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learn Mem.* 18(8):508-18. doi: 10.1101/lm.2175811.
- Corkin S. 2013. *Permanent Present Tense. The unforgettable life of the amnesic patient, H.M.* 1st edition. New York: Basic books.
- Corodimas KP, Pruitt JC, Stieg JM. 2000. Acute exposure to caffeine selectively disrupts context conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 152(4):376-82.
- Cousins JN, El-Dereby W, Parkes LM, Hennies N, Lewis PA. 2016. Cued Reactivation of Motor Learning during Sleep Leads to Overnight Changes in Functional Brain Activity and Connectivity. *PLoS Biol.* 14(5):e1002451. doi: 10.1371/journal.pbio.1002451.
- Craske MG, Hermans D, Vervliet B. 2018. State-of-the-art and future directions for extinction as a translational model for fear and anxiety. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 373(1742). pii: 20170025. doi: 10.1098/rstb.2017.0025.
- Craske MG, Stein MB, Eley TC, Milad MR, Holmes A, Rapee RM, Wittchen HU. 2017. Anxiety disorders. *Nat Rev Dis Primers* 3:17100. doi: 10.1038/nrdp.2017.100.
- Crestani AP, Boos FZ, Haubrich J, Sierra RO, Santana F, Molina J, Cassini L, De Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2015. Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Scientific Reports.* (5):13633.
- Crown WH, Finkelstein S, Berndt ER, et al. 2002. The impact of treatment-resistant depression on health care utilization and costs. *Journal of Clinical Psychiatry.* 63:963–971.

- Cryan JF, Mombereau C. 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*. 9:326–357.
- Crystal J, Glanzman DL. 2013. A biological perspective on memory. *Current Biology*. 23; 17,09. doi:10.1016/j.cub.2013.07.082.
- Cullen PK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC, Jasnow AM. 2015. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol Learn Mem*. 124:19-27. doi: 10.1016/j.nlm.2015.07.001.
- Cunha RA, Johansson B, van der Ploeg I, Sebastião AM, Ribeiro JA, Fredholm BB. 1994. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. *Brain Res*. 649(1-2):208-16.
- Cuthbert BN, Insel TR. 2013. Toward the future of psychiatric diagnosis: the seven pillars of RDoC. *BMC Med*. 11:126. doi: 10.1186/1741-7015-11-126.
- Cyr M, Landry M, Di Paolo T. 2000. Modulation by estrogen-receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 23(1):69-78.
- Dalmaz C, Introini-Collison IB, McGaugh JL. 1993. Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage. *Behav Brain Res*. 58(1-2):167-74.
- Das RK, Lawn W, Kamboj SK. 2015. Rewriting the valuation and salience of alcohol-related stimuli via memory reconsolidation. *Transl Psychiatry*. 5:e645. doi: 10.1038/tp.2015.132.
- Davidson JR. 2006. Pharmacologic treatment of acute and chronic stress following trauma: 2006. *J Clin Psychiatry*. 67 Suppl 2:34-9.

- Davidson JR. 2010. Major depressive disorder treatment guidelines in America and Europe. *J Clin Psychiatry*. 71 Suppl E1:e04. doi: 10.4088/JCP.9058se1c.04gry.
- Davidson J, Kudler H, Smith R, Mahorney SL, Lipper S, Hammett E, Saunders WB, Cavenar JO Jr. 1990. Treatment of posttraumatic stress disorder with amitriptyline and placebo. *Arch Gen Psychiatry*. 47(3):259-66.
- Davidson J, Pearlstein T, Lonnberg P, Brady KT, Rothbaum B, Bell J, Maddock R, Hegel MT, Farfel G. 2001. Efficacy of sertraline in preventing relapse of posttraumatic stress disorder: results of a 28-week double-blind, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry*. 158(12):1974-81.
- Davinson GC. 1968. Systematic desensitization as a counterconditioning process. *Journal of Abnormal Psychology*. 73, 91-99.
- Davis P, Zaki Y, Maguire J, Reijmers LG. 2017. Cellular and oscillatory substrates of fear extinction learning. *Nat Neurosci*. 20(11):1624-1633. doi: 10.1038/nn.4651.
- Davis RL, Zhong Y. 2017. The Biology of Forgetting-A Perspective. *Neuron*. 95(3):490-503. doi: 10.1016/j.neuron.2017.05.039.
- DeBattista C, Kinrys G, Hoffman D, Goldstein C, Zajecka J, Kocsis J, Teicher M, Potkin S, Preda A, Multani G, Brandt L, Schiller M, Iosifescu D, Fava M. 2011. The use of referenced-EEG (rEEG) in assisting medication selection for the treatment of depression. *J Psychiatr Res*. 45(1):64-75. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.05.009.
- Debiec J, Ledoux JE. 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience*. 129: 267–272.
- De Bundel D, Zussy C, Espallergues J, Gerfen CR, Girault JA, Valjent E. 2016. Dopamine D2 receptors gate generalization of conditioned threat responses

through mTORC1 signaling in the extended amygdala. *Mol Psychiatry*. 21(11):1545-1553. doi: 10.1038/mp.2015.210.

de Carvalho Myskiw J, Furini CR, Benetti F, Izquierdo I. 2014. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(12):4572-7. doi: 10.1073/pnas.1400423111.

de Jonghe F, Swinkels J. 1997. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. Relevance of Differences in Their Pharmacological and Clinical Profiles. *CNS Drugs*. 7: 452.

de Lavilléon G, Lacroix MM, Rondi-Reig L, Benchenane K. 2015. Explicit memory creation during sleep demonstrates a causal role of place cells in navigation. *Nat Neurosci*. 18(4):493-5. doi: 10.1038/nn.3970.

Delorenzi A, Maza FJ, Suárez LD, Barreiro K, Molina VA, Stehberg J. 2014. Memory beyond expression. *J Physiol Paris*. 108(4-6):307-22. doi: 10.1016/j.jphysparis.2014.07.002.

Delprato DJ, Jackson DE. 1973. Counterconditioning and exposure-only in the treatment of specific (conditioned suppression) and generalized fear in rats. *Behavior Research & Therapy*, 11, 453-461.

DeMet EM, Chicz-DeMet A. 2002. Localization of adenosine A2A-receptors in rat brain with [3H]ZM-241385. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 366(5):478-81.

De Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. 244:42-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.005.

Deslauriers J, Toth M, Der-Avakian A, Risbrough VB. 2018. Current Status of Animal Models of Posttraumatic

Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation. *Biol Psychiatry*. 83(10):895-907. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.11.019.

Desmedt A, Marighetto A, Piazza PV. 2015. Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder. *Biol Psychiatry* 78(5):290-7. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.06.017.

Detweiler MB, Pagadala B, Candelario J, Boyle JS, Detweiler JG, Lutgens BW. 2016. Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder Nightmares at a Veterans Affairs Medical Center. *J Clin Med*. 5(12). pii: E117. doi: 10.3390/jcm5120117.

Deschaux O, Spennato G, Moreau JL, Garcia R. 2011. Chronic treatment with fluoxetine prevents the return of extinguished auditory-cued conditioned fear. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 May;215(2):231-7. doi: 10.1007/s00213-010-2134-y.

Deschaux O, Zheng X, Lavigne J, Nachon O, Cleren C, Moreau JL, Garcia R. 2013. Post-extinction fluoxetine treatment prevents stress-induced reemergence of extinguished fear. *Psychopharmacology (Berl)*. 225(1):209-16. doi: 10.1007/s00213-012-2806-x.

Diamond DM, Fleshner M. 1999. Constraints on the DHEAS-induced enhancement of hippocampal function: Non-linear dose-response functions and stress-DHEAS interactions. Kalimi M, Regelson W, editors. *Dehydroepiandrosterone (DHEA): Biochemical, Physiological and Clinical Aspects*. 1999; II:261–270.

Diamond DM, Fleshner M, Rose OM. 1999. The enhancement of hippocampal primed burst potentiation by dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) is blocked by psychological stress. *Stress*. 3:107–121.

Dias BG, Ressler KJ. 2014. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci*. 17(1):89-96. doi: 10.1038/nn.3594.

- Dias GP, Bevilaqua MC, da Luz AC, et al. 2014. Hippocampal biomarkers of fear memory in an animal model of generalized anxiety disorder. *Behav Brain Res* 263:34–45.
- Dragicevic N, Delic V, Cao C, Copes N, Lin X, Mamcarz M, Wang L, Arendash GW, Bradshaw PC. 2012. Caffeine increases mitochondrial function and blocks melatonin signaling to mitochondria in Alzheimer's mice and cells. *Neuropharmacology* 63(8):1368-79. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.08.018.
- Dubroqua S, Low SR, Yee BK, Singer P. 2015. Caffeine impairs the acquisition and retention, but not the consolidation of Pavlovian conditioned freezing in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 232(4):721-31. doi: 10.1007/s00213-014-3703-2.
- Dunsmoor JE, Niv Y, Daw N, Phelps EA. 2015. Rethinking Extinction. *Neuron*. 88(1):47-63. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.028.
- Dunsmoor JE, Paz R. 2015. Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. *Biol Psychiatry*. 78(5):336-43. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.04.010.
- Dymond S, Dunsmoor JE, Vervliet B, Roche B, Hermans D. 2015. Fear Generalization in Humans: Systematic Review and Implications for Anxiety Disorder Research. *Behavior Therapy*. 46(5): (561).
- Einarsson EÖ, Pors J, Nader K. 2015. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology*. 40(2):480-7. doi: 10.1038/npp.2014.197.
- Elsley JWB, Kindt M. 2017a. Breaking boundaries: optimizing reconsolidation-based interventions for strong and old memories. *Learn Mem*. 24(9):472-479. doi: 10.1101/lm.044156.116.
- Elsley JWB, Kindt M. 2017b. Tackling maladaptive memories through reconsolidation:

From neural to clinical science. *Neurobiol Learn Mem.* 142(Pt A):108-117. doi: 10.1016/j.nlm.2017.03.007.

Elsey JWB, Van Ast VA, Kindt M. 2018. Human memory reconsolidation: A guiding framework and critical review of the evidence. *Psychol Bull.* 144(8):797-848. doi: 10.1037/bul0000152.

Esmaily H, Sahebkar A, Iranshahi M, Ganjali S, Mohammadi A, Ferns G, Ghayour-Mobarhan M. 2015. An investigation of the effects of curcumin on anxiety and depression in obese individuals: A randomized controlled trial. *Chin J Integr Med.* 21(5):332-8. doi: 10.1007/s11655-015-2160-z.

Espejo PJ, Ortiz V, Martijena ID, Molina VA. 2016. Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex. *Neuropharmacology.* 109:349-356. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.06.033.

Fanselow MS. 1998. Pavlovian conditioning, negative feedback, and blocking: mechanisms that regulate association formation. *Neuron.* 20:625–627.

Farzaei MH, Rahimi R, Nikfar S, Abdollahi M. 2018. Effect of resveratrol on cognitive and memory performance and mood: A meta-analysis of 225 patients. *Pharmacol Res.* 128:338-344. doi: 10.1016/j.phrs.2017.08.009.

Fattore L, Piva A, Zanda MT, Fumagalli G, Chiamulera C. 2017. Psychedelics and reconsolidation of traumatic and appetitive maladaptive memories: focus on cannabinoids and ketamine. *Psychopharmacology.* 235(2):433-445. doi: 10.1007/s00213-017-4793-4.

Fava M, McCall WV, Krystal A, et al. 2006. Eszopiclone co-administered with fluoxetine in patients with insomnia coexisting with major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 59:1052-1060.

Fava M, Thase ME, Trivedi MH, Ehrich E, Martin WF, Memisoglu A, Nangia N, Stanford AD, Yu M, Pathak S. 2018. Opioid system modulation with

- buprenorphine/samidorphan combination for major depressive disorder: two randomized controlled studies. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/s41380-018-0284-1.
- Fenster RJ, Lebois LAM, Ressler KJ, Suh J. 2018. Brain circuit dysfunction in post-traumatic stress disorder: from mouse to man. *Nat Rev Neurosci*. 19(9):535-551. doi: 10.1038/s41583-018-0039-7.
- Felsenberg J, Jacob PF, Walker T, Barnstedt O, Edmondson-Stait AJ, Pleijzier MW, Otto N, Schlegel P, Sharifi N, Perisse E, Smith CS, Lauritzen JS, Costa M, Jefferis GSXE, Bock DD, Waddell S. 2018. Integration of Parallel Opposing Memories Underlies Memory Extinction. *Cell*. 175(3):709-722.e15. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.021.
- Fernández RS, Pedreira ME, Boccia M. 2017. Does reconsolidation occur in natural settings? Memory reconsolidation and anxiety disorders. *Clinical Psychology Review*. 57:45-58. doi: 10.1016/j.cpr.2017.08.004.
- Fernandes BS, Williams LM, Steiner J, Leboyer M, Carvalho AF, Berk M. 2017. The new field of 'precision psychiatry'. *BMC medicine*. 15(1): 80. doi:10.1186/s12916-017-0849-x
- Fitzgerald PJ, Giustino TF, Seemann JR, Maren S. 2015. Noradrenergic blockade stabilizes prefrontal activity and enables fear extinction under stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(28):E3729-37. doi: 10.1073/pnas.1500682112.
- Fitzgerald PJ, Seemann JR, Maren S. 2014. Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain Res Bull*. 105:46-60. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.12.007.
- Flanagan JC, Korte KJ, Killeen TK, Back SE. 2016. Concurrent Treatment of Substance Use and PTSD. *Curr Psychiatry Rep*. 18(8):70. doi: 10.1007/s11920-016-0709-y.

- Forcato C, Rodríguez ML, Pedreira ME. 2011. Repeated labilization-reconsolidation processes strengthen declarative memory in humans. *PLoS One*. 6(8):e23305. doi: 10.1371/journal.pone.0023305.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nature Rev Neurosci*. 6: 119-130.
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 304(5672):881-3.
- Frankland PW, Cestari V, Filipkowski RK, McDonald RJ, Silva AJ. 1998. The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behav Neurosci*. 112(4):863-74.
- Frankland PW, Ding HK, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ. 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem*. 13(4):451-7.
- Frankland PW, Köhler S, Josselyn SA. 2013. Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends Neurosci*. 36(9):497-503. doi: 10.1016/j.tins.2013.05.002. Epub 2013 Jun 12.
- Fredholm BB. 2010. Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res*. 316(8):1284-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.004.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001 Dec;53(4):527-52.
- Fredholm BB, Lindström K. 1999. Autoradiographic comparison of the potency of several structurally unrelated adenosine receptor antagonists at adenosine A1 and A(2A) receptors. *Eur J Pharmacol*. 380(2-3):197-202.
- Fuxe K, Agnati LF, Jacobsen K, Hillion J, Canals M, Torvinen M, Tinner-Staines

- B, Staines W, Rosin D, Terasmaa A, Popoli P, Leo G, Vergoni V, Lluís C, Ciruela F, Franco R, Ferré S. 2003. Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology*. 61 :S19-23.
- Gamache K, Pitman RK, Nader K. 2012. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*. 37(13):2789-96. doi: 10.1038/npp.2012.145.
- Gandal MJ, Leppá V, Won H, Parikshak NN, Geschwind DH. 2016. The road to precision psychiatry: translating genetics into disease mechanisms. *Nat Neurosci*. 19(11):1397-1407. doi: 10.1038/nn.4409.
- Garfinkel SN, Abelson JL, King AP, Sripada RK, Wang X, Gaines LM, Liberzon I. 2014. Impaired contextual modulation of memories in PTSD: an fMRI and psychophysiological study of extinction retention and fear renewal. *J Neurosci*. 34(40):13435-43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4287-13.2014.
- Gazarini L, Stern CA, Piornedo RR, Takahashi RN, Bertoglio LJ. 2014. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 18(1). pii: pyu026. doi: 10.1093/ijnp/pyu026.
- George SA, Rodriguez-Santiago M, Riley J, Abelson JL, Floresco SB, Liberzon I. 2015. Alterations in cognitive flexibility in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Behav Brain Res*. 286:256-64. doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.051.
- Geraciotti TD Jr, Baker DG, Ekhtor NN, West SA, Hill KK, Bruce AB, Schmidt D, Rounds-Kugler B, Yehuda R, Keck PE Jr, Kascow JW. 2001. CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 158(8):1227-30.

- Gerlicher AMV, Tüscher O, Kalisch R. 2018. Dopamine-dependent prefrontal reactivations explain long-term benefit of fear extinction. *Nat Commun.* 9(1):4294. doi: 10.1038/s41467-018-06785-y.
- Gisquet-Verrier P, Lynch JF 3rd, Cutolo P, Toledano D, Ulmen A, Jasnow AM, Riccio DC. 2015. Integration of New Information with Active Memory Accounts for Retrograde Amnesia: A Challenge to the Consolidation/Reconsolidation Hypothesis? *The Journal of Neuroscience.* 35 (33), 11623-33.
- Gisquet-Verrier P, Riccio DC. 2019. Memory Integration as a Challenge to the Consolidation/Reconsolidation Hypothesis: Similarities, Differences and Perspectives. *Frontiers in systems neuroscience.* 12:71. doi: 10.3389/fnsys.2018.00071.
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. 2009. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci.* 12(10):1222-3. doi: 10.1038/nn.2384.
- Giustino TF, Maren S. 2018. Noradrenergic Modulation of Fear Conditioning and Extinction. *Front Behav Neurosci.* 12:43. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00043.
- Goltseker K, Bolotin L, Barak S. 2017. Counterconditioning During Reconsolidation Prevents Relapse of Cocaine Memories. *Neuropsychopharmacology.* 42(3):716-726. doi: 10.1038/npp.2016.140.
- Gómez-Carrillo A. 2018. Precision Psychiatry—Yes, but Precisely What?. *JAMA Psychiatry.* 75(12):1302-1303. doi:10.1001/jamapsychiatry.2018.2651.
- Gong Q, Scarpazza C, Dai J, He M, Xu X, Shi Y, Zhou B, Vieira S, McCrory E, Ai Y, Yang C, Zhang F, Lui S, Mechelli A. 2018. A transdiagnostic neuroanatomical signature of psychiatric illness. *Neuropsychopharmacology.* doi: 10.1038/s41386-018-0175-9.
- Gong Z, Zhou Q. 2018. Dnmt3a in the dorsal dentate gyrus is a key regulator of fear

- renewal. *Sci Rep.* 8(1):5093. doi: 10.1038/s41598-018-23533-w.
- Goode TD, Maren S. 2018. Common neurocircuitry mediating drug and fear relapse in preclinical models. *Psychopharmacology (Berl)* doi: 10.1007/s00213-018-5024-3.
- Gorman J, et al. 1987. An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. *J Clin Psychopharmacol.* 7:329–332.
- Goswami S, Rodriguez-Sierra O, Cascardi M, Pare D. 2013. Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. *Frontiers in neuroscience.* 7:89. doi: 10.3389/fnins.2013.00089.
- Graat I, Figuraee M, Denys D. 2017. The application of deep brain stimulation in the treatment of psychiatric disorders. *International Review of Psychiatry.* 29(2):178.
- Gradus JL, Leatherman S, Raju S, Ferguson RE, Miller M. 2014. Posttraumatic stress disorder, depression, and non-fatal intentional self-harm in Massachusetts veterans. *Injury Epidemiology.* 1(1):20.
- Graham BM, Dong V, Richardson R. 2018. The impact of chronic fluoxetine on conditioned fear expression and hippocampal FGF2 in rats: Short- and long-term effects. *Neurobiol Learn Mem.* 155:344-350. doi: 10.1016/j.nlm.2018.09.004.
- Green PJ, Suls J. 1996. The effects of caffeine on ambulatory blood pressure, heart rate, and mood in coffee drinkers. *J Behav Med.* 19(2):111-28.
- Grgic J, Mikulic P. 2017. Caffeine ingestion acutely enhances muscular strength and power but not muscular endurance in resistance-trained men *Eur J Sport Sci.* 17(8) :1029 – 1036.
- Grillon C. 2009. D-cycloserine facilitation of fear extinction and exposure-based therapy might rely on lower-level, automatic mechanisms. *Biol Psychiatry.* 66(7):636-41. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.04.017.

- Gross CT, Canteras NS. 2012. The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci* 13(9):651-8. doi: 10.1038/nrn3301.
- Gueorguieva R, Chekroud AM, Krystal JH. 2017. Trajectories of relapse in randomised, placebo-controlled trials of treatment discontinuation in major depressive disorder: an individual patient-level data meta-analysis. *Lancet Psychiatry*. 4(3):230-237. doi: 10.1016/S2215-0366(17)30038-X.
- Guidotti G, Calabrese F, Auletta F, Olivier J, Racagni G, Homberg J, Riva MA. 2012. Developmental influence of the serotonin transporter on the expression of npas4 and GABAergic markers: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology*. 37(3):746-58. doi: 10.1038/npp.2011.252.
- Guina J, Rossetter S, Derhodes B, Nahhas R, Welton R. 2015. Benzodiazepines for PTSD. *Journal of Psychiatric Practice*. 21 (4): 281. doi: 10.1097/PRA.0000000000000091.
- Gurpegui M, Jurado D, Luna JD, Fernández-Molina C, Moreno-Abril O, Gálvez R. 2007. Personality traits associated with caffeine intake and smoking. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31(5):997-1005.
- Haagen JF, Moerbeek M, Olde E, van der Hart O, Kleber RJ. 2015. PTSD after childbirth: A predictive ethological model for symptom development. *J Affect Disord*. 185:135-43.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang HL, Buch T, Waisman A, Bontempi B, Neve RL, Frankland PW, Josselyn SA. 2009. Selective erasure of a fear memory. *Science* 323(5920):1492-6. doi: 10.1126/science.1164139.
- Hariri AR, Holmes A. 2015. Finding translation in stress research. *Nat Neurosci*. 2015 Oct;18(10):1347-52. doi: 10.1038/nm.4111.
- Hardt O, Nader K, Wang YT. 2013. GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis and

the decay of early and late long-term potentiation: possible mechanisms for forgetting of short- and long-term memories. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369(1633):20130141. doi: 10.1098/rstb.2013.0141.

Harris JA, Westbrook RF. 1998. Evidence that GABA transmission mediates context-specific extinction of learned fear. *Psychopharmacology (Berl)*. 140, 105–115.

Hassabis, D., Kumaran, D., Summerfield, C., Botvinick, M. (2017). Neuroscience-Inspired Artificial Intelligence. *Neuron*. 95(2), 245-258. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.011.

Hauber W, Bareiss A. 2001. Facilitative effects of an adenosine A1/A2 receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period. *Behav Brain Res*. 118(1):43-52.

Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, Alvares Lde O, Quillfeldt JA. 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*. 40(2):315-26. doi: 10.1038/npp.2014.174.

Haubrich J, Nader K. 2018. Memory Reconsolidation. *Curr Top Behav Neurosci*. 37:151-176. doi: 10.1007/7854_2016_463.

Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. 2014. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* 32(1):40-51. doi: 10.1038/nbt.2786.

Heinsbroek JA, Furbish AB, Peters J. 2018. A single, extinction-based treatment with a kappa opioid receptor agonist elicits a long-term reduction in cocaine relapse. *Neuropsychopharmacology*. 2018 Jun;43(7):1492-1497. doi: 10.1038/s41386-017-0006-4.

Henry M, Fishman JR, Youngner SJ. 2007. Propranolol and the prevention of post-traumatic stress disorder: is it wrong to erase the "sting" of bad memories?. *Am J Bioeth*. 7(9):12-20.

- Herman AB, Widge AS. 2019 Dynamic network targeting for closed-loop deep brain stimulation. *Neuropsychopharmacology*. 44(1):219-220. doi: 10.1038/s41386-018-0210-x.
- Hernández-González S, Andreu-Sánchez C, Martín-Pascual MÁ, Gruart A, Delgado-García JM. 2017. A Cognition-Related Neural Oscillation Pattern, Generated in the Prelimbic Cortex, Can Control Operant Learning in Rats. *J Neurosci*. 37(24):5923-5935. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3651-16.2017.
- Herrera-Arellano A, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Morales-Valdéz M, García-Valencia CE, Tortoriello J. 2007. Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *Galphimia glauca* on generalized anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. *Planta Med*. 2007 Jul;73(8):713-7.
- Herrera-Ruiz M, Jiménez-Ferrer JE, De Lima TC, Avilés-Montes D, Pérez-García D, González-Cortazar M, Tortoriello J. 2006. Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine*. 13(1-2):23-8.
- Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Müller C, Lüthi A. 2008. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature*. 454(7204):600-6. doi: 10.1038/nature07166.
- Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Lüthi A. 2010. Neuronal circuits of fear extinction. *Eur J Neurosci* 31(4):599-612. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07101.x.
- Herwig U, Lutz J, Scherpiet S, Scheerer H, Kohlberg J, Opialla S, Preuss A, Steiger VR, Sulzer J, Weidt S, Stämpfli P, Rufer M, Seifritz E, Jäncke L, Brühl AB. 2019. Training emotion regulation through real-time fMRI neurofeedback of amygdala activity. *Neuroimage*. 184:687-696. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.09.068.

- Hettema JM, Annas P, Neale MC, Kendler KS, Fredrikson M. 2003. A twin study of the genetics of fear conditioning. *Arch Gen Psychiatry*. 60(7):702-8.
- Hettema JM, Annas P, Neale MC, Fredrikson M, Kendler KS. 2008. The genetic covariation between fear conditioning and self-report fears. *Biol Psychiatry*. 63(6):587-93.
- Hoffman AN, Parga A, Paode PR, Watterson LR, Nikulina EM, Hammer RP Jr, Conrad CD. 2015. Chronic stress enhanced fear memories are associated with increased amygdala zif268 mRNA expression and are resistant to reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 120:61-8. doi: 10.1016/j.nlm.2015.02.004.
- Holmes NM, Leung HT, Westbrook RF. 2016. Counterconditioned fear responses exhibit greater renewal than extinguished fear responses. *Learn Mem*. 23(4):141-50. doi: 10.1101/lm.040659.115.
- Hong I, Kim J, Kim J, Lee S, Ko HG, Nader K, Kaang BK, Tsien RW, Choi S. 2013. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(20):8218-23. doi: 10.1073/pnas.1305235110.
- Howe JR 6th, Bear MF, Golshani P, Klann E, Lipton SA, Mucke L, Sahin M, Silva AJ. 2018. The mouse as a model for neuropsychiatric drug development. *Curr Biol* 28(17): R909-R914. doi: 10.1016/j.cub.2018.07.046.
- Huang B, Zhu H, Zhou Y, Liu X, Ma L. 2017. Unconditioned- and Conditioned- Stimuli Induce Differential Memory Reconsolidation and β -AR-Dependent CREB Activation. *Front Neural Circuits*. 11:53. doi: 10.3389/fncir.2017.00053.
- Hultman R, Ulrich K, Sachs BD, Blount C, Carlson DE, Ndubuizu N, Bagot RC, Parise EM, Vu MT, Gallagher NM, Wang J, Silva AJ, Deisseroth K, Mague SD, Caron

- MG, Nestler EJ, Carin L, Dzirasa K. 2018. Brain-wide Electrical Spatiotemporal Dynamics Encode Depression Vulnerability. *Cell*. 173(1):166-180.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.012.
- Hung AY, Schwarzschild MA. 2014. Treatment of Parkinson's disease: what's in the non-dopaminergic pipeline? *Neurotherapeutics*. 11:34-46. doi: 10.1007/s13311-013-0239-9.
- Hwang MJ, Zsido RG, Song H, Pace-Schott EF, Miller KK, Lebron-Milad K, Marin MF, Milad MR. 2015. Contribution of estradiol levels and hormonal contraceptives to sex differences within the fear network during fear conditioning and extinction. *BMC Psychiatry*. 15:295. doi: 10.1186/s12888-015-0673-9.
- Inslicht SS, Rao MN, Richards A, O'Donovan A, Gibson CJ, Baum T, Metzler TJ, Neylan TC. 2018. Sleep and hypothalamic pituitary adrenal axis responses to metyrapone in posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 88:136-143. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.12.002.
- Iosifescu DV. 2011. Electroencephalography-derived biomarkers of antidepressant response. *Harv Rev Psychiatry*. 2011 May-Jun;19(3):144-54. doi: 10.3109/10673229.2011.586549.
- Iosifescu DV, Greenwald S, Devlin P, Mischoulon D, Denninger JW, Alpert JE, Fava M. 2009. Frontal EEG predictors of treatment outcome in major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 19(11):772-7. doi: 10.1016/j.euroneuro.2009.06.001.
- Ishikawa R, Fukushima H, Frankland PW, Kida S. 2016. Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval. *Elife*. 5. pii: e17464. doi: 10.7554/eLife.17464.
- Izquierdo I. 1989. Mechanism of action of scopolamine as an amnestic," *Trends in Pharmacological Sciences*. 10 (5): 175-177.
- Izquierdo I (2011) Memória. *Artmed Porto Alegre*.

- Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. 2016. Fear Memory. *Physiol Rev* 96(2):695-750. doi: 10.1152/physrev.00018.2015.
- Izquierdo I, Netto CA. 1985. The brain beta-endorphin system and behavior: the modulation of consecutively and simultaneously processed memories. *Behav Neural Biol.* 44(2):249-65.
- Jacobson KA, Gao ZG. 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5(3):247-64.
- Jasnow AM, Lynch JF 3rd, Gilman TL, Riccio DC. 2017. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *J Neurosci Res.* 95(3):821-835. doi: 10.1002/jnr.23837.
- Jiang L, Liu C, Tong J, Mao R, Chen D, Wang H, Huang J, Li L. 2014. Fluoxetine pretreatment promotes neuronal survival and maturation after auditory fear conditioning in the rat amygdala. *PLoS One.* 9(2):e89147. doi: 10.1371/journal.pone.0089147.
- Jiménez-Ferrer E, Herrera-Ruiz M, Ramírez-García R, Herrera-Arellano A, Tortoriello J. 2011. Interaction of the natural anxiolytic Galphimine-B with serotonergic drugs on dorsal hippocampus in rats. *J Ethnopharmacol.* 137(1):724-9. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.029.
- Jin J, Maren S. 2015. Fear renewal preferentially activates ventral hippocampal neurons projecting to both amygdala and prefrontal cortex in rats. *Sci Rep.* 5:8388. doi: 10.1038/srep08388.
- Jorfi M, Skousen JL, Weder C, Capadona JR. 2014. Progress towards biocompatible intracortical microelectrodes for neural interfacing applications. *Journal of neural engineering.* 12(1): 011001.
- Joss JD, Burton RM, Keller CA. 2003. Memory loss in a patient treated with fluoxetine.

The Annals of Pharmacotherapy. 37:1800–3.

Josselyn SA, Frankland PW. 2018. Fear Extinction Requires Reward. *Cell*. 175(3):639-640. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.036.

Jovanovic T, Kazama A, Bachevalier J, Davis M. 2012. Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology*. 62(2):695-704. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.02.023.

Judelson DA, Armstrong LE, Sökmen B, Roti MW, Casa DJ, Kellogg MD. 2005. Effect of chronic caffeine intake on choice reaction time, mood, and visual vigilance. *Physiol Behav*. 85(5):629-34.

Kaczurkin AN, Burton PC, Chazin SM, Manbeck AB, Espensen-Sturges T, Cooper SE, Sponheim SR, Lissek S. 2017. Neural Substrates of Overgeneralized Conditioned Fear in PTSD. *Am J Psychiatry*. 174(2):125-134. doi: 10.1176/appi.ajp.2016.15121549.

Kamboj SK, Curran HV. 2006. Neutral and emotional episodic memory: global impairment after lorazepam or scopolamine. *Psychopharmacology (Berl)*. 188:482–488.

Kang S, Vervliet B, Engelhard IM, van Dis EAM, Hagenaars MA. 2018. Reduced return of threat expectancy after counterconditioning versus extinction. *Behav Res Ther*. 108:78-84. doi: 10.1016/j.brat.2018.06.009.

Kaouane N, Porte Y, Vallée M, Brayda-Bruno L, Mons N, Calandreau L, Marighetto A, Piazza PV, Desmedt A. 2012. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science* 335(6075):1510-3. doi: 10.1126/science.1207615.

Kaplan GB, Greenblatt DJ, Leduc BW, Thompson ML, Shader RI. 1989. Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptor binding and locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 248(3):1078-83.

- Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C. 2016. 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nat Neurosci.* 19(4):605-12. doi: 10.1038/nn.4251.
- Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleskaya N, Agústsdóttir A, Antila H, Popova D, Akamine Y, Bahi A, Sullivan R, Hen R, Drew LJ, Castrén E. 2011. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science.* 334(6063):1731-4. doi: 10.1126/science.1214592.
- Kasper S, McEwen BS. 2008. Neurobiological and clinical effects of the antidepressant tianeptine. *CNS Drugs.* 22(1):15-26.
- Kawachi I, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE. 1996. A prospective study of coffee drinking and suicide in women. *Arch Intern Med.* 156(5):521-5.
- Kelemen WL, Creeley CE. 2003. State-dependent memory effects using caffeine and placebo do not extend to metamemory. *J Gen Psychol.* 130(1):70-86.
- Kida S. 2018. Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD. *Psychopharmacology (Berl).* . doi: 10.1007/s00213-018-5086-2.
- Kim WB, Cho JH. 2017. Synaptic Targeting of Double-Projecting Ventral CA1 Hippocampal Neurons to the Medial Prefrontal Cortex and Basal Amygdala. *J Neurosci.* 37(19):4868-4882. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3579-16.2017.
- Kim SC, Jo YS, Kim IH, Kim H, Choi JS. 2010. Lack of medial prefrontal cortex activation underlies the immediate extinction deficit. *J. Neurosci.* 30(3):832-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4145-09.2010.
- Kindt M. 2014. A behavioural neuroscience perspective on the aetiology and treatment of anxiety disorders. *Behav Res Ther.* 62:24-36. doi: 10.1016/j.brat.2014.08.012.

- Kindt M, Soeter M, Vervliet B. 2009. Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nat Neurosci.* 12(3):256-8. doi: 10.1038/nn.2271.
- Kitamura T, Okubo-Suzuki R, Takashima N, Murayama A, Hino T, Nishizono H, Kida S, Inokuchi K. 2012. Hippocampal function is not required for the precision of remote place memory. *Mol Brain.* 5:5. doi: 10.1186/1756-6606-5-5.
- Khalaf O, Resch S, Dixsaut L, Gorden V, Glauser L, Gräff J. 2018. Reactivation of recall-induced neurons contributes to remote fear memory attenuation. *Science.* 360(6394):1239-1242. doi: 10.1126/science.aas9875.
- Khazaie H, Rezaie L, Rezaei Payam N, Najafi F. 2015. Antidepressant-induced sexual dysfunction during treatment with fluoxetine, sertraline and trazodone; a randomized controlled trial. *Gen Hosp Psychiatry.* 37(1):40-5. doi: 10.1016/j.genhosppsy.2014.10.010.
- Klaassen EB, de Groot RH, Evers EA, Snel J, Veerman EC, Ligtenberg AJ, Jolles J, Veltman DJ. 2013. The effect of caffeine on working memory load-related brain activation in middle-aged males. *Neuropharmacology* 64:160-7. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.026.
- Knapska E, Lioudyno V, Kiryk A, Mikosz M, Górkiewicz T, Michaluk P, Gawlak M, Chaturvedi M, Mochol G, Balcerzyk M, Wojcik DK, Wilczynski GM, Kaczmarek L. 2013. Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. *J Neurosci.* 33(36):14591-600. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5239-12.2013.
- Kole MH, Swan L, Fuchs E. 2002. The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rats. *Eur J Neurosci.* 16(5):807-16.
- Kose S, Cetin M. 2017. The Research Domain Criteria framework: transitioning from dimensional systems to integrating neuroscience and psychopathology.

Psychiatry and clinical psychopharmacology. 27: 1-5. doi: doi.org/10.1080/24750573.2017.1293255.

Kozák G, Berényi A. 2017. Sustained efficacy of closed loop electrical stimulation for long-term treatment of absence epilepsy in rats. *Sci Rep.* 7(1):6300. doi: 10.1038/s41598-017-06684-0.

Kosten TR, Frank JB, Dan E, McDougle CJ, Giller EL Jr. 1991. Pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder using phenelzine or imipramine. *J Nerv Ment Dis.* 179(6):366-70.

Kroes MC, Schiller D, LeDoux JE, Phelps EA. 2016. Translational Approaches Targeting Reconsolidation. *Curr Top Behav Neurosci.* 28:197-230. doi: 10.1007/7854_2015_5008.

Kroes MC, Strange BA, Dolan RJ. 2010. Beta-adrenergic blockade during memory retrieval in humans evokes a sustained reduction of declarative emotional memory enhancement. *J Neurosci.* 30(11):3959-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5469-09.2010.

Kupfer DJ, Regier DA. 2010. Why all of medicine should care about DSM-5 . *JAMA* 303(19):1974-5. doi: 10.1001/jama.2010.646.

Kupfer DJ, Regier DA. 2011. Neuroscience, clinical evidence, and the future of psychiatric classification in DSM-5 . *Am J Psychiatry* 168(7):672-4. doi: 10.1176/appi.ajp.2011.11020219.

Kupfer DJ, Kuhl EA, Regier DA. 2013. DSM-5 --the future arrived. *JAMA* 309(16):1691-2. doi: 10.1001/jama.2013.2298.

Kupfer DJ, Kuhl EA, Wulsin L. 2013. Psychiatry's integration with medicine: the role of DSM-5 . *Annu Rev Med* 64:385-92. doi: 10.1146/annurev-med-050911-161945.

- Lader M, Bruce M. 1986. States of anxiety and their induction by drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 22(3):251-61.
- Lavano A, Guzzi G, Della Torre A, Lavano SM, Tiriolo R, Volpentesta G. 2018. DBS in Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder. *Brain Sci.* 8(1). pii: E18. doi: 10.3390/brainsci8010018.
- Lebedev MA, Nicolelis MA. 2017. Brain-Machine Interfaces: From Basic Science to Neuroprostheses and Neurorehabilitation. *Physiol Rev.* 97(2):767-837. doi: 10.1152/physrev.00027.2016.
- Lebrón-Milad K, Tsareva A, Ahmed N, Milad MR. 2013. Sex differences and estrous cycle in female rats interact with the effects of fluoxetine treatment on fear extinction. *Behav Brain Res.* 253:217-22. doi: 10.1016/j.bbr.2013.07.024.
- Lee DJ, Schnitzlein CW, Wolf JP, et al. 2016. Psychotherapy versus pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder: systemic review and meta-analyses to determine first-line treatments. *Depress Anxiety.* 33(9):792-806.
- LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23:155-84.
- LeDoux JE, Pine DS. 2016. Using Neuroscience to Help Understand Fear and Anxiety: A Two-System Framework. *Am J Psychiatry* 173(11):1083-1093.
- Lee JL. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci.* 11(11):1264-6. doi: 10.1038/nn.2205.
- Lee JL. 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci.* 32(8):413-20. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.002.
- Lee JL. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci.* 4:168. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00168.
- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear:

inhibition and potentiation. *J Neurosci.* 26:10051– 10056

Lee SH, Kwak C, Shim J, Kim JE, Choi SL, Kim HF, Jang DJ, Lee JA, Lee K, Lee CH, Lee YD, Miniaci MC, Bailey CH, Kandel ER, Kaang BK. 2012. A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(35):14200-5. doi: 10.1073/pnas.1211997109.

Leibenluft E, Fiero PL, Bartko JJ, Moul DE, Rosenthal NE. 1993. Depressive symptoms and the self-reported use of alcohol, caffeine, and carbohydrates in normal volunteers and four groups of psychiatric outpatients. *Am J Psychiatry.* 150(2):294-301.

Lesting J, Daldrup T, Narayanan V, Himpe C, Seidenbecher T, Pape HC. 2013. Directional theta coherence in prefrontal cortical to amygdalo-hippocampal pathways signals fear extinction. *PLoS One.* 8(10):e77707. doi: 10.1371/journal.pone.0077707.

Lesting J, Narayanan RT, Kluge C, Sangha S, Seidenbecher T, Pape HC. 2011. Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. *PLoS One.* 6(6):e21714. doi: 10.1371/journal.pone.0021714.

Levin Gal Richter, Stork O, Schmidt M. 2018. Animal models of PTSD: a challenge to be met. *Molecular Psychiatry.* Doi: <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0272-5>.

Levy D, Shabat-Simon M, Shalev U, Barnea-Ygael N, Cooper A, Zangen A. 2007. Repeated electrical stimulation of reward-related brain regions affects cocaine but not 'natural' reinforcement. *J Neurosci.* 27 :14179-14189.

Lewis DJ. 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychological Bulletin,*

- Liang Z, Hamada Y, Oba S, Ishii S. 2018. Characterization of electroencephalography signals for estimating saliency features in videos. *Neural Netw.* 105:52-64. doi: 10.1016/j.neunet.2018.04.013.
- Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA. 2014. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nat Neurosci.* 17(1):106-13. doi: 10.1038/nn.3582.
- Lin CC, Tung CS, Liu YP. 2016. Escitalopram reversed the traumatic stress-induced depressed and anxiety-like symptoms but not the deficits of fear memory. *Psychopharmacology (Berl).* 233(7):1135-46. doi: 10.1007/s00213-015-4194-5.
- Lissek S, Kaczurkin AN, Rabin S, Geraci M, Pine DS, Grillon C. 2014. Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear. *Biol Psychiatry.* 75(11):909-15. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.07.025.
- Lissek S, Rabin S, Heller RE, Lukenbaugh D, Geraci M, Pine DS, Grillon C. 2010. Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *American Journal of Psychiatry.* 167, 47-55.
- Liu QS, Deng R, Fan Y, Li K, Meng F, Li X, Liu R. 2017. Low dose of caffeine enhances the efficacy of antidepressants in major depressive disorder and the underlying neural substrates. *Mol Nutr Food Res.* 61(8). doi: 10.1002/mnfr.201600910.
- Liu JF, Yang C, Deng JH, Yan W, Wang HM, Luo YX, Shi HS, Meng SQ, Chai BS, Fang Q, Chai N, Xue YX, Sun J, Chen C, Wang XY, Wang JS, Lu L. 2015. Role of hippocampal β -adrenergic and glucocorticoid receptors in the novelty-induced enhancement of fear extinction. *J Neurosci.* 35(21):8308-21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0005-15.2015.
- Long VA, Fanselow MS. 2012. Stress-enhanced fear learning in rats is resistant to the

effects of immediate massed extinction. *Stress*. 15(6):627-36. doi: 10.3109/10253890.2011.650251.

Lonsdorf TB, Haaker J, Schümann D, Sommer T, Bayer J, Brassen S, Bunzeck N, Gamer M, Kalisch R. 2015. Sex differences in conditioned stimulus discrimination during context-dependent fear learning and its retrieval in humans: the role of biological sex, contraceptives and menstrual cycle phases. *J Psychiatry Neurosci* 40: 368 - 375.

López-Cruz L, Salamone JD, Correa M. 2018. Caffeine and Selective Adenosine Receptor Antagonists as New Therapeutic Tools for the Motivational Symptoms of Depression. *Front Pharmacol*. 9:526. doi: 10.3389/fphar.2018.00526.

Lopresti AL. 2017. Curcumin for neuropsychiatric disorders: a review of in vitro, animal and human studies. *J Psychopharmacol*. 31(3):287-302. doi: 10.1177/0269881116686883.

Lopresto D, Schipper P, Homberg JR. 2016. Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 60:31-42. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.10.009.

Lucas M, Mirzaei F, Pan A, Okereke OI, Willett WC, O'Reilly EJ, Koenen K, Ascherio A. 2011. Coffee, caffeine, and risk of depression among women. *Arch Intern Med*. 171(17):1571-8. doi: 10.1001/archinternmed.2011.393.

Lucas M, O'Reilly EJ, Pan A, Mirzaei F, Willett WC, Okereke OI, Ascherio A. 2014. Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: results from three prospective cohorts of American adults. *World J Biol Psychiatry*. 15(5):377-86. doi: 10.3109/15622975.2013.795243.

Lucchelli JP, Bertschy G. 2018. Low-Dose Fluoxetine in Four Children with Autistic Spectrum Disorder Improves Self-Injurious Behavior, ADHD-Like

- Symptoms, and Irritability. *Case Rep Psychiatry*. 30; 2018:6278501. doi: 10.1155/2018/6278501.
- Luchkina NV, Bolshakov VY. 2018. Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity-fear memory connection. *Psychopharmacology (Berl)*. doi: 10.1007/s00213-018-5104-4.
- Lui S, Zhou XJ, Sweeney JA, Gong Q. 2016. Psychoradiology: The Frontier of Neuroimaging in Psychiatry. *Radiology*. 281(2):357-372.
- Lunardi P, Sachser RM, Sierra RO, Pedraza LK, Medina C, de la Fuente V, Romano A, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. 2018. Effects of Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. *Mol Neurobiol*. 55(2):958-967. doi: 10.1007/s12035-016-0361-x.
- Luo Y, Chaimani A, Kataoka Y, Ostinelli EG, Ogawa Y, Cipriani A, Salanti G, Furukawa TA et al. 2018. Evidence synthesis, practice guidelines and real-world prescriptions of new generation antidepressants in the treatment of depression: a protocol for cumulative network meta-analyses and meta-epidemiological study. *BMJ open*. 8(12), e023222. doi:10.1136/bmjopen-2018-023222.
- Lynch JF, Winiecki P, Gilman TL, Adkins JM, Jasnow AM. 2017. Hippocampal GABA_{B(1a)} Receptors Constrain Generalized Contextual Fear. *Neuropsychopharmacology*. 42(4):914-924. doi: 10.1038/npp.2016.255.
- Mahabir M, Ashbaugh AR, Saumier D, Tremblay J. 2016. Propranolol's impact on cognitive performance in post-traumatic stress disorder. *J Affect Disord*. 192:98-103. doi: 10.1016/j.jad.2015.11.051.
- Mahabir M, Tucholka A, Shin LM, Etienne P, Brunet A. 2015. Emotional face processing in post-traumatic stress disorder after reconsolidation impairment using propranolol: A pilot fMRI study. *J Anxiety Disord*. 36:127-33. doi: 10.1016/j.janxdis.2015.10.004.

- Mahan AL, Ressler KJ. 2012. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends Neurosci.* 35(1):24-35. doi: 10.1016/j.tins.2011.06.007.
- Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutierre M, Zugaro M. 2016. Hippocampocortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci.* 19(7):959-64. doi: 10.1038/nn.4304.
- Mao SC, Lin HC, Gean PW. 2008. Augmentation of fear extinction by D-cycloserine is blocked by proteasome inhibitors. *Neuropsychopharmacology.* 33(13):3085-95. doi: 10.1038/npp.2008.30.
- Marcinkiewicz CA, Mazzone CM, D'Agostino G, Halladay LR, Hardaway JA, DiBerto JF, Navarro M, Burnham N, Cristiano C, Dorrier CE, Tipton GJ, Ramakrishnan C, Kozicz T, Deisseroth K, Thiele TE, McElligott ZA, Holmes A, Heisler LK, Kash TL. 2016. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature.* 537(7618):97-101. doi: 10.1038/nature19318.
- Marek R, Jin J, Goode TD, Giustino TF, Wang Q, Acca GM, Holehonnur R, Ploski JE, Fitzgerald PJ, Lynagh T, Lynch JW, Maren S, Sah P. 2018. Hippocampus-driven feed-forward inhibition of the prefrontal cortex mediates relapse of extinguished fear. *Nat Neurosci.* 21(3):384-392. doi: 10.1038/s41593-018-0073-9.
- Maren S. 2014. Nature and causes of the immediate extinction deficit: a brief review. *Neurobiol. Learn. Mem.* 113, 19–24. doi: 10.1016/j.nlm.2013.10.012.
- Maren S. 2015. Out with the old and in with the new: Synaptic mechanisms of extinction in the amygdala. *Brain Res.* 1621:231-8. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.010.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. 1997. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res.* 88(2):261-74.

- Maren S, Phan KL, Liberzon I. 2013. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci.* 14(6):417-28. doi: 10.1038/nrn3492.
- Maren S, Quirk GJ. 2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5(11):844-52.
- Marras A, Fineberg N, Pallanti S. 2016. Obsessive compulsive and related disorders: comparing DSM-5 and ICD-11. *CNS Spectrums.* 21(4):324-33. doi: 10.1017/S1092852916000110.
- Marwood L, Wise T, Perkins AM, Cleare AJ. 2018. Meta-analyses of the neural mechanisms and predictors of response to psychotherapy in depression and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 95, 61-72.
- Mataix-Cols D, Fernández de la Cruz L, Monzani B, Rosenfield D, Andersson E, Pérez-Vigil A, Frumento P, de Kleine RA, Difede J, Dunlop BW, Farrell LJ et al. 2017. D-Cycloserine Augmentation of Exposure-Based Cognitive Behavior Therapy for Anxiety, Obsessive-Compulsive, and Posttraumatic Stress Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data. *JAMA Psychiatry.* 74(5):501-510. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2016.3955.
- Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, Castrén E, Maffei L. 2008. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* 320(5874):385-8. doi: 10.1126/science.1150516.
- 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(11):1429-46. doi: 10.1002/hipo.22464.

- McEwen BS, Chattarji S, Diamond DM, Jay TM, Reagan LP, Svenningsson P, Fuchs E. 2010. The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol Psychiatry*. 15(3):237-49. doi: 10.1038/mp.2009.80.
- McEwen BS, Magarinos AM, Reagan LP. 2002. Structural plasticity and tianeptine: cellular and molecular targets. *Eur Psychiatry*. Suppl 3:318-30. McEown K, Treit D. 2013. Alpha2 GABAA receptor sub-units in the ventral hippocampus and alpha5 GABAA receptor sub-units in the dorsal hippocampus mediate anxiety and fear memory. *Neuroscience*. 252:169-177.
- McGaugh JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science*. 287(5451):248-51.
- McGaugh JL, Introini-Collison IB, Juler RG, Izquierdo I. 1986. Stria terminalis lesions attenuate the effects of posttraining naloxone and beta-endorphin on retention. *Behav Neurosci*. 100(6):839-44.
- Medina JH. 2018. Neural, Cellular and Molecular Mechanisms of Active Forgetting. *Front Syst Neurosci*. 12:3. doi: 10.3389/fnsys.2018.00003.
- Merlo E, Bekinschtein P, Jonkman S, Medina JH. 2015. Molecular Mechanisms of Memory Consolidation, Reconsolidation, and Persistence. *Neural plasticity*. 2015:687175. doi: 10.1155/2015/687175.
- Meulders A, Karsdorp PA, Claes N, Vlaeyen JWS. 2015. Comparing counterconditioning and extinction as methods to reduce fear of movement-related pain. *J. Pain* 16, 1353 - 1365. doi: 10.1016/j.jpain.2015.09.007
- Migues PV, Liu L, Archbold GE, Einarsson EÖ, Wong J, Bonasia K, Ko SH, Wang YT, Hardt O. 2016. Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *J Neurosci*. 36(12):3481-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3333-15.2016.
- Mikics É, Guirado R, Umemori J, Tóth M, Biró L, Miskolczi C, Balázsfi D, Zelena

- D, Castrén E, Haller J, Karpova NN. 2018. Social Learning Requires Plasticity Enhanced by Fluoxetine Through Prefrontal Bdnf-TrkB Signaling to Limit Aggression Induced by Post-Weaning Social Isolation. *Neuropsychopharmacology*. 43(2):235-245. doi: 10.1038/npp.2017.142.
- Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, Zeidan MA, Handwerker K, Orr SP, Rauch SL. 2009. Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 66(12):1075-82. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.06.026.
- Milad MR, Quirk GJ. 2012. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol*. 63:129-51. doi: 10.1146/annurev.psych.121208.131631.
- Miller KE, Brownlow JA, Woodward S, Gehrman PR. 2017. Sleep and Dreaming in Posttraumatic Stress Disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 19(10):71. doi: 10.1007/s11920-017-0827-1.
- Miller S, Konorski J. 1969. On a particular form of conditioned reflex. *J Exp Anal Behav*. 12(1):187-9.
- Milton AL, Merlo E, Ratano P, Gregory BL, Dumbreck JK, Everitt BJ. 2013. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *J Neurosci*. 33(3):1109-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3273-12.2013.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*. 160(3827):554-5.
- Monfils MH, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE (2009) Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science* 324:951–955

- Monfils MH, Holmes EA. 2018. Memory boundaries: opening a window inspired by reconsolidation to treat anxiety, trauma-related, and addiction disorders. *Lancet Psychiatry*. pii: S2215-0366(18)30270-0. doi: 10.1016/S2215-0366(18)30270-0.
- Monsey MS, Gerhard DM, Boyle LM, Briones MA, Seligsohn M, Schafe GE. A diet enriched with curcumin impairs newly acquired and reactivated fear memories. *Neuropsychopharmacology*. 40(5):1278-88. doi: 10.1038/npp.2014.315.
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L. 2005. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat*. 207(1):35-66.
- Muigg P, Hetzenauer A, Hauer G, Hauschild M, Gaburro S, Frank E, Landgraf R, Singewald N. 2008. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety--evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci*. 28(11):2299-309. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06511.x.
- Muravieva EV, Alberini CM. 2010. Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories. *Learn Mem*. 17(6):306-13. doi: 10.1101/lm.1794710.
- Myers KM, Davis M. 2002. Behavioral and a analysis of extinction. *Neuron* 36(4):567-84.
- Myers KM, Davis M. 2007. Mechanisms of fear extinction. *Mol. Psychiatry*. 12, 120–150.
- Nabavi SM, Daglia M, Braidy N, Nabavi SF. 2017. Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. *Nutr Neurosci* 20(3):180-194. doi: 10.1080/1028415X.2015.1103461.

- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R. 2014. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*. 511(7509):348-52. doi: 10.1038/nature13294.
- Nadel L, Moscovitch M. 1997. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol*. 7(2):217-27.
- Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M. 2000. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus*. 10(4):352-68.
- Nader K, Hardt O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*. 10(3):224-34. doi: 10.1038/nrn2590.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):722-6.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci*. 1(3):216-9.
- Naert G, Maurice T, Tapia-Arancibia L, Givalois L. 2007. Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 32(8-10):1062-78. doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.09.002
- Nagy V, Bozdagi O, Huntley GW. 2007. The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory. *Learn Mem*. 14(10):655-64.
- Nakazawa Y, Pevzner A, Tanaka KZ, Wiltgen BJ. 2016. Memory retrieval along the proximodistal axis of CA1. *Hippocampus*. 26(9):1140-8. doi: 10.1002/hipo.22596.

- Narayanan RT, Seidenbecher T, Kluge C, Bergado J, Stork O, Pape HC. 2007. Dissociated theta phase synchronization in amygdalo-hippocampal circuits during various stages of fear memory. *Eur J Neurosci.* 25(6):1823-31.
- Nasser HM, McNally GP. 2013. Neural correlates of appetitive-aversive interactions in Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem.* 20(4):220-8. doi: 10.1101/lm.029744.112.
- Nabavi B, Mitchell AL, Nutt . 2015. A Lifetime Prevalence of Comorbidity Between Bipolar Affective Disorder and Anxiety Disorders: A Meta-analysis of 52 Interview-based Studies of Psychiatric Population. *EBioMedicine.* 2(10):1405.
- Nehlig A. 2010. Is caffeine a cognitive enhancer? *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl 1:S85-94. doi: 10.3233/JAD-2010-091315.
- NICE. 2005. Depression in children and young people: identification and management in primary, community and secondary care. National Clinical Practice Guideline Number 28. <http://guidance.nice.org.uk/CG28>
- Nicholson AA, Densmore M, McKinnon MC, Neufeld RWJ, Frewen PA, Théberge J, Jetly R, Richardson JD, Lanius RA. 2018. Machine learning multivariate pattern analysis predicts classification of posttraumatic stress disorder and its dissociative subtype: a multimodal neuroimaging approach. *Psychol Med.* 11:1-11. doi: 10.1017/S0033291718002866.
- Nieh EH, Matthews GA, Allsop SA, Presbrey KN, Leppla CA, Wichmann R, Neve R, Wildes CP, Tye KM. 2015. Decoding neural circuits that control compulsive sucrose seeking. *Cell.* 160(3):528-41. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.003.
- Noble LJ, Meruva VB, Hays SA, Rennaker RL, Kilgard MP, McIntyre CK. 2019. Vagus

nerve stimulation promotes generalization of conditioned fear extinction and reduces anxiety in rats. *Brain Stimul.* 12(1):9-18. doi: 10.1016/j.brs.2018.09.013.

Norrholm SD, Anderson KM, Olin IW, Jovanovic T, Kwon C, Warren VT, McCarthy A, Bosshardt L, Sabree J, Duncan EJ, Rothbaum BO, Bradley B. 2011. Versatility of fear-potentiated startle paradigms for assessing human conditioned fear extinction and return of fear. *Front Behav Neurosci.* 5:77. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00077.

Nutt DJ. 2005. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS Spectr.* 10(1):49-56.

Olf M, de Vries GJ, Güzelcan Y, Assies J, Gersons BP. 2007. Changes in cortisol and DHEA plasma levels after psychotherapy for PTSD. *Psychoneuroendocrinology.* 32(6):619-26.

Onder E, Tural U, Aker T. 2006. A comparative study of fluoxetine, moclobemide, and tianeptine in the treatment of posttraumatic stress disorder following an earthquake. *Eur Psychiatry.* 21(3):174-9.

Otte C, Lenoci M, Metzler T, Yehuda R, Marmar CR, Neylan TC. 2007. Effects of metyrapone on hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sleep in women with post-traumatic stress disorder. *Biol Psychiatry.* 61(8):952-6.

Otto MW, Smits JAJ, Reese HE. 2005. Combined psychotherapy and pharmacotherapy for mood and anxiety disorders in adults: review and analysis. *Clin Psychol Sci Pract.* 12:72–86

Overton DA. 1978. Basic mechanisms of state-dependent learning. *Psychopharmacol Bull.* 14(1):67-8.

- Pai A, Suris AM, North CS. 2017. Posttraumatic Stress Disorder in the DSM 5: Controversy, Change, and Conceptual Considerations. *Behav Sci (Basel)* 7(1). pii: E7. doi: 10.3390/bs7010007.
- Palatnik A, Frolov K, Fux M, Benjamin J. 2001. Double-blind, controlled, crossover trial of inositol versus fluvoxamine for the treatment of panic disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 21(3):335-9.
- Pamplona FA, Henes K, Micale V, Mauch CP, Takahashi RN, Wotjak CT. 2011. Prolonged fear incubation leads to generalized avoidance behavior in mice. *J Psychiatr Res.* 45(3):354-60. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.06.015.
- Pan YW, Chan GC, Kuo CT, Storm DR, Xia Z. 2012. Inhibition of adult neurogenesis by inducible and targeted deletion of ERK5 mitogen-activated protein kinase specifically in adult neurogenic regions impairs contextual fear extinction and remote fear memory. *J Neurosci.* 32(19):6444-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6076-11.2012.
- Pandolfo P, Machado NJ, Köfalvi A, Takahashi RN, Cunha RA. 2013. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 23(4):317-28. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.04.011.
- Pantoja-Gomez LM, Corrêa AS, de Oliveira LO, Guedes RNC. 2019. Common Origin of Brazilian and Colombian Populations of the Neotropical Coffee Leaf Miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *J Econ Entomol.* doi: 10.1093/jee/toy416.
- Paris J, Kirmayer LJ. 2016. The National Institute of Mental Health Research Domain Criteria: A Bridge Too Far. *J Nerv Ment Dis.* 204(1):26-32. doi: 10.1097/NMD.0000000000000435.

- Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, Alvares Lde O. 2016. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*. 26(3):362-71. doi: 10.1002/hipo.22527.
- Pedraza LK, Sierra RO, Crestani AP, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. 2017. Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: Implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus*. 27(5):518-528. doi: 10.1002/hipo.22708.
- Pedreira ME, Maldonado H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*. 38(6):863-9.
- Perez-Caballero L, Torres-Sanchez S, Bravo L, Mico JA, Berrocoso E. 2014. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov* 9(5):567-78. doi: 10.1517/17460441.2014.907790.
- Peters R, McGee R. 1982. Cigarette smoking and state-dependent memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 76(3):232-5.
- Pickens CL, Golden SA, Adams-Deutsch T, Nair SG, Shaham Y. 2009. Long lasting incubation of conditioned fear in rats. *Biol Psychiatry*. 65(10):881-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.12.010.
- Pillai AG, Anilkumar S, Chattarji S. 2012. The same antidepressant elicits contrasting patterns of synaptic changes in the amygdala vs hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 37(12):2702-11. doi: 10.1038/npp.2012.135.
- Pitman RK, Sanders KM, Zusman RM, Healy AR, Cheema F, Lasko NB, Cahill L, Orr SP. 2002. Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol. *Biol Psychiatry*. 51(2):189-92.
- Poleszak E, Szopa A, Wyska E, Kukuła-Koch W, Serefko A, Wośko S, Bogatko K, Wróbel A, Wlaź P. 2016. Caffeine augments the antidepressant-like activity

of mianserin and agomelatine in forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol Rep.* 68(1):56-61. doi: 10.1016/j.pharep.2015.06.138.

Ponce FA, Lozano AM. 2010. Deep brain stimulation state of the art and novel stimulation targets. *Prog Brain Res.*184:311-24.

Poole RL, Braak D, Gould TJ. 2016. Concentration- and age-dependent effects of chronic caffeine on contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 298(Pt A):69-77. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.045.

Popa D, Duvarci S, Popescu AT, Léna C, Paré D. 2010. Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(14):6516-9. doi: 10.1073/pnas.0913016107.

Popik B, Crestani AP, Silva MO, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. 2018. Calpain modulates fear memory consolidation, retrieval and reconsolidation in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem.* 151:53-58. doi: 10.1016/j.nlm.2018.04.002.

Popova D, Ágústsdóttir A, Lindholm J, Mazulis U, Akamine Y, Castrén E, Karpova NN. 2014. Combination of fluoxetine and extinction treatments forms a unique synaptic protein profile that correlates with long-term fear reduction in adult mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24(7):1162-74. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.04.002.

Poulos AM, Mehta N, Lu B, Amir D, Livingston B, Santarelli A, Zhuravka I, Fanselow MS. 2016. Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. *Learn Mem.* 23(7):379-85. doi: 10.1101/lm.041400.115.

Prediger RD. 2010. Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. *J Alzheimers Dis.* 20: S205-20. doi: 10.3233/JAD-2010-091459.

Prediger RD, Takahashi RN. 2005. Modulation of short-term social memory in rats by

adenosine A1 and A(2A) receptors. *Neurosci Lett.* 376(3):160-5.

Preskorn, S. H. 2014. Prediction of individual response to antidepressants and antipsychotics: an integrated concept. *Dialogues in Clinical Neuroscience.* 16, 545–554.

Prieto-Gómez B, Tortoriello J, Vázquez-Alvarez A, Reyes-Vázquez C. 2003. Galphimine B modulates synaptic transmission on dopaminergic ventral tegmental area neurons. *Planta Med.* 2003 Jan;69(1):38-43.

Quillfeldt JA. 2016. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In: Andersen M., Tufik S. (eds) *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research.* Springer.

Quirk GJ, Mueller D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology.* 33, 56–72.

Radiske A, Gonzalez MC, Conde-Ocazonez SA, Feitosa A, Köhler CA, Bevilacqua LR, Cammarota M. 2017. Prior Learning of Relevant Nonaversive Information Is a Boundary Condition for Avoidance Memory Reconsolidation in the Rat Hippocampus. *J Neurosci.* 37(40):9675-9685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1372-17.2017.

Raes AK, De Raedt R. 2012. The effect of counterconditioning on evaluative responses and harm expectancy in a fear conditioning paradigm. *Behav Ther.* 43, 757–767. 10.1016/j.beth.2012.03.012

Rao-Ruiz P, Rotaru DC, van der Loo RJ, Mansvelder HD, Stiedl O, Smit AB, Spijker S. 2011. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci.* 14(10):1302-8. doi: 10.1038/nn.2907.

Rao VR, Sellers KK, Wallace DL, Lee MB, Bijanzadeh M, Sani OG, Yang Y, Shanechi MM, Dawes HE, Chang EF. 2018. Direct Electrical Stimulation of Lateral

Orbitofrontal Cortex Acutely Improves Mood in Individuals with Symptoms of Depression. 28(24):3893-3902.e4. doi: 10.1016/j.cub.2018.10.026.

Rantamäki T, Hendolin P, Kankaanpää A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Männistö PT, Castrén E. 2007. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*. 32(10):2152-62.

Rasmusson AM, Vythilingam M, Morgan CA 3rd. 2003. The neuroendocrinology of posttraumatic stress disorder: new directions. *CNS Spectr*. 8(9):651-6, 665-7.

Rauch G, Desgranges B, Foret J, Eustache F. 2005. The relationships between memory systems and sleep stages. *J Sleep Res*. Jun;14(2):123-40.

Ravindran LN, Stein MB 2009. Pharmacotherapy of PTSD: premises, principles, and priorities. *Brain Res*; **1293**: 24-39.

Rebola N, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. 2005. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience*. 132(4):893-903.

Redondo RL, Kim J, Arons AL, Ramirez S, Liu X, Tonegawa S. 2014. Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature*. 513(7518):426-30. doi: 10.1038/nature13725.

Reichelt A, Lee J. 2013. Appetitive Pavlovian goal-tracking memories reconsolidate only under specific conditions. *Learning and Memory*. 20(1):51-60. doi: 10.1101/lm.027482.112.

Rescorla RA. 1968. Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1968, 66, 1-5.

- Reyes CM, Cornelis MC. 2018. Caffeine in the Diet: Country-Level Consumption and Guidelines. *Nutrients*. 10(11): 1772. 10.3390/nu10111772.
- Rezayof A, Alijanpour S, Zarrindast MR, Rassouli Y. 2008. Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. *Neurobiol Learn Mem*. 89(4):441-7.
- Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J. 2007. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur J Neurosci*. 25(10):3109-14.
- Ribeiro J and Sebastião, A. 2010. Caffeine and Adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*. 20: S3–S15
- Rihs M, Muller C, Baumann P. 1996. Caffeine consumption in hospitalized psychiatric patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 246(2):83-92.
- Riccio DC, Ackil J, Burch-Vernon A. 1992. Forgetting of stimulus attributes: methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychol Bull*. 1992 Nov;112(3):433-45.
- Rich EL, Wallis JD. 2016. Decoding subjective decisions from orbitofrontal cortex. *Nat Neurosci*. 19(7):973-80. doi: 10.1038/nn.4320.
- Richardson R, Riccio DC, Jamis M, Cabosky J, Skoczen T. 1982. Modification of reactivated memory through "counterconditioning". *Am J Psychol*. 95(1):67-84.
- Rogers PJ, Heatherley SV, Mullings EL, Smith JE. 2013. Faster but not smarter: effects of caffeine and caffeine withdrawal on alertness and performance. *Psychopharmacology (Berl)*. 226(2):229-40. doi: 10.1007/s00213-012-2889-4.
- Rosenbaum RS, Winocur G, Moscovitch M. 2001. New views on old memories: re-evaluating the role of the hippocampal complex. *Behav Brain Res*. 127(1-2):183-

- Ross DA, Arbuckle MR, Travis MJ, Dwyer JB, van Schalkwyk GI, Ressler KJ. 2017. An Integrated Neuroscience Perspective on Formulation and Treatment Planning for Posttraumatic Stress Disorder: An Educational Review. *JAMA Psychiatry*. 74(4):407-415. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2016.3325.
- Roy-Byrne P. 2017. Transdiagnostic Cognitive Behavioral Therapy and the Return of the Repressed. *JAMA Psychiatry*. 1;74(9):867-868. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2017.1982.
- Rudy JW, O'Reilly RC. 1999. Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav Neurosci*. 113(5):867-80.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M. 2006. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry*. 163(11):1905-17.
- Russo SJ, Nestler EJ. 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci*. 14(9):609-25
- Sachser RM, Haubrich J, Lunardi PS, de Oliveira Alvares L. 2017. Forgetting of what was once learned: Exploring the role of postsynaptic ionotropic glutamate receptors on memory formation, maintenance, and decay. *Neuropharmacology*. 112(PtA):94-103. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.07.015.
- Sah P, Westbrook RF. 2008. Behavioural neuroscience: The circuit of fear. *Nature*. 454(7204):589-90. doi: 10.1038/454589a.
- Salamone JD, Correa M. 2009. Dopamine/adenosine interactions involved in effort-related aspects of food motivation. *Appetite*. 53(3):422-5. doi:

10.1016/j.appet.2009.07.018.

Sanday L, Zanin KA, Patti CL, Tufik S, Frussa-Filho R. 2012. Role of state-dependency in memory impairment induced by acute administration of midazolam in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 37(1):1-7. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.01.013.

Sani OG, Yang Y, Lee MB, Dawes HE, Chang EF, Shanechi MM. 2018. Mood variations decoded from multi-site intracranial human brain activity. *Nat Biotechnol*. 36(10):954-961. doi: 10.1038/nbt.4200.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 301(5634):805-9.

Santos JM, Martinez RC, Brandão ML. 2006. Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high-intensity contextual conditioning. *Eur J Pharmacol*. 542(1-3):121-8.

Sawangjit A, Oyanedel CN, Niethard N, Salazar C, Born J, Inostroza M. 2018. The hippocampus is crucial for forming non-hippocampal long-term memory during sleep. *Nature*. 564(7734):109-113. doi: 10.1038/s41586-018-0716-8.

Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE. 2001. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci*. 24(9):540-6.

Schaich Borg J, Srivastava S, Lin L, Heffner J, Dunson D, Dzirasa K, de Lecea L. 2017. Rat intersubjective decisions are encoded by frequency-specific oscillatory contexts. *Brain Behav*. 7(6):e00710. doi: 10.1002/brb3.710.

Schildkraut JJ. 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence *Am J Psychiatry*. 122(5):509-22.

- Schiller D, Kanen JW, LeDoux JE, Monfils MH, Phelps EA. 2013. Extinction during reconsolidation of threat memory diminishes prefrontal cortex involvement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(50):20040-5. doi: 10.1073/pnas.1320322110.
- Schiller D, Monfils MH, Raio CM, Johnson DC, Ledoux JE, Phelps EA. 2010. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature.* 463(7277):49-53. doi: 10.1038/nature08637.
- Schmitt JA, Hogervorst E, Vuurman EF, Jolles J, Riedel WJ. 2003. Memory functions and focussed attention in middle-aged and elderly subjects are unaffected by a low, acute dose of caffeine. *J Nutr Health Aging.* 7(5):301-3.
- Schuster J, Mitchell ES. 2019. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 89:263-274. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.09.005.
- Schwabe L, Nader K, Wolf OT, Beaudry T, Pruessner JC. 2012. Neural signature of reconsolidation impairments by propranolol in humans. *Biol Psychiatry.* 71(4):380-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.10.028
- Schwabe L, Nader K, Pruessner JC. 2013. β -Adrenergic blockade during reactivation reduces the subjective feeling of remembering associated with emotional episodic memories. *Biol Psychol.* 92(2):227-32. doi: 10.1016/j.biopsycho.2012.10.003.
- Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. 2006. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 29(11):647-54.
- Schweizer T, Renner F, Sun D, Kleim B, Holmes E, Tuschen-Caffier B. 2018. Psychophysiological reactivity, coping behaviour and intrusive memories upon multisensory Virtual Reality and Script-Driven Imagery analogue trauma: A

- randomised controlled crossover study. *Journal of Anxiety Disorders*. 59, 42-52.
- Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC. 2003. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*. 301(5634):846-50.
- Serna MC, Cruz I, Real J, Gascó E, Galván L. 2010. Duration and adherence of antidepressant treatment (2003 to 2007) based on prescription database. *Eur Psychiatry*. 25(4):206-13. doi: 10.1016/j.eurpsy.2009.07.012.
- Sevenster D, Beckers T, Kindt M. 2013. Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science*. 339(6121):830-3. doi: 10.1126/science.1231357.
- Shestatzky M, Greenberg D, Lerer B. 1988. A controlled trial of phenelzine in posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res*. 24(2):149-55.
- Shiigi Y, Kaneto H. 1990. Facilitation of memory retrieval by pre-test morphine and its state dependency in the step-through type passive avoidance learning test in mice. *Jpn J Pharmacol*. 54(1):79-81.
- Shumake J, Jones C, Auchter A, Monfils MH. 2018. Data-driven criteria to assess fear remission and phenotypic variability of extinction in rats. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 373(1742). pii: 20170035. doi: 10.1098/rstb.2017.0035.
- Shvil E, Sullivan GM, Schafer S, Markowitz JC, Campeas M, Wager TD, Milad MR, Neria Y. 2014. Sex differences in extinction recall in posttraumatic stress disorder: a pilot fMRI study. *Neurobiol Learn Mem*. 113:101-8. doi: 10.1016/j.nlm.2014.02.003.
- Siegmund A, Wotjak CT. 2006. Toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci*. 1071:324-34.
- Sierra C, Hyland ME. 2014. Common Factor Mechanisms in Clinical Practice and Their

Relationship with Outcome: Common Factors. *Clinical Psychology & Psychotherapy*. 22(3) ·DOI: 10.1002/cpp.1894

Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2013. Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem*. 20(7):379-87. doi: 10.1101/lm.030023.112.

Sierra RO, Nítola LP², Duran JM², Prieto DR², León LA², Cardenas FP. 2016. Medial orbitofrontal cortex lesion prevents facilitatory effects of d-cycloserine during fear extinction. *Behav Brain Res*. 296:379-383. doi: 10.1016/j.bbr.2015.08.021.

Silva BA, Burns AM, Gräff J. 2018. A cFos activation map of remote fear memory attenuation. *Psychopharmacology (Berl)*. doi: 10.1007/s00213-018-5000-y.

Simões AP, Machado NJ, Gonçalves N, Kaster MP, Simões AT, Nunes A, Pereira de Almeida L, Goosens KA, Rial D, Cunha RA. 2016. Adenosine A_{2A} Receptors in the Amygdala Control Synaptic Plasticity and Contextual Fear Memory. *Neuropsychopharmacology*. 41(12):2862-2871. doi: 10.1038/npp.2016.98.

Simola N, Morelli M, Seeman P. 2008. Increase of dopamine D₂(High) receptors in the striatum of rats sensitized to caffeine motor effects. *Synapse*. 62(5):394-7. doi: 10.1002/syn.20507.

Singewald N, Holmes A. 2018. Rodent models of impaired fear extinction. *Psychopharmacology (Berl)*. doi: 10.1007/s00213-018-5054-x.

Sloan E, Hall K, Moulding R, Bryce S, Mildred H, Staiger PK. 2017. Emotion regulation as a transdiagnostic treatment construct across anxiety, depression, substance, eating and borderline personality disorders: A systematic review. *Clinical Psychology Review*. 57:141-163. doi: 10.1016/j.cpr.2017.09.002.

Slomski A. 2018. MDMA-Assisted Psychotherapy for PTSD. *JAMA*. 2018 Jun

26;319(24):2470. doi: 10.1001/jama.2018.8168.

Smith AP. 2009. Caffeine, cognitive failures and health in a non-working community sample. *Hum Psychopharmacol.* 24(1):29-34. doi: 10.1002/hup.991.

Soeter M, Kindt M. 2012. Stimulation of the noradrenergic system during memory formation impairs extinction learning but not the disruption of reconsolidation. *Neuropsychopharmacology.* 37(5):1204-15. doi: 10.1038/npp.2011.307.

Soeter M, Kindt M. 2015. An Abrupt Transformation of Phobic Behavior After a Post-Retrieval Amnesic Agent. *Biol Psychiatry.* 78(12):880-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.04.006.

Soeter M, Kindt M. 2015. Retrieval cues that trigger reconsolidation of associative fear memory are not necessarily an exact replica of the original learning experience. *Front Behav Neurosci.* 9:122. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00122. eCollection 2015.

Solinas M, Ferré S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. 2002. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 22(15):6321-4.

Sotres-Bayon F, Quirk GJ. 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol.* 20(2):231-5. doi: 10.1016/j.conb.2010.02.005.

Southwick SM, Morgan CA 3rd, Bremner AD, Grillon CG, Krystal JH, Nagy LM, Charney DS. 1997. Noradrenergic alterations in posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 821:125-41.

Souza A, Koike B, Pedrosa R, Tort A, Queiroz C, Ribeiro S. 2019. Recording Day and Night: Advice for New Investigators in the Sleep and Memory Field. In Joseph P. Huston (series editor). *Handbook for In vivo Electrophysiology.* (43-62). Elsevier.

- Spennato G, Zerbib C, Mondadori C, Garcia R. 2008. Fluoxetine protects hippocampal plasticity during conditioned fear stress and prevents fear learning potentiation. *Psychopharmacology (Berl)*. 196(4):583-9.
- Squire LR, Zola-Morgan J. 2011. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci*. 34:259-88. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113720.
- Stawarski M, Stefaniuk M, Wlodarczyk J. 2014. Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Front Neuroanat*. 8:68. doi: 10.3389/fnana.2014.00068.
- Stein MB, Jang KL, Taylor S, Vernon PA, Livesley WJ. 2002. Genetic and environmental influences on trauma exposure and posttraumatic stress disorder symptoms: a twin study. *Am J Psychiatry*. 159(10):1675-81.
- Stein MB, Smoller JW. 2018. Precision psychiatry: will genomic medicine lead the way? *JAMA Psychiatry*. 75(7):663-664. doi:10.1001/jamapsychiatry.2018.0375.
- Stewart AM, Kalueff AV. 2015. Developing better and more valid animal models of brain disorders. *Behavioural Brain Research*. 276:28-31. doi: 10.1016/j.bbr.2013.12.024.
- Stujenske JM, Likhtik E, Topiwala MA, Gordon JA. 2014. Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. *Neuron*. 83(4):919-33. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.026.
- Sukoff Rizzo SJ, Pulicicchio C, Malberg JE, Andree TH, Stack GP, Hughes ZA, Schechter LE, Rosenzweig-Lipson S. 2009. 5-HT(1A) receptor antagonism reverses and prevents fluoxetine-induced sexual dysfunction in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 12(8):1045-53. doi: 10.1017/S1461145709000406.
- Sun Y, Evans J, Russell B, Kydd R, Connor B. 2013. A benzodiazepine impairs the neurogenic and behavioural effects of fluoxetine in a rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology*. 72:20-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.021.

- Suris A, Smith J, Powell C, North CS. 2013. Interfering with the reconsolidation of traumatic memory: sirolimus as a novel agent for treating veterans with posttraumatic stress disorder. *Ann Clin Psychiatry*. 25(1):33-40.
- 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.
- Sweeney P, Levack R, Watters J, Xu Z, Yang Y. 2016. Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behaviors. *Appetite*. 101:171-7. doi: 10.1016/j.appet.2016.03.013.
- Szopa A, Doboszevska U, Herbet M, Wośko S, Wyska E, Świąder K, Serefko A, Korga A, Właż A, Wróbel A, Ostrowska M, Terlecka J, Kanadys A, Poleszak E, Dudka J, Właż P. 2017. Chronic treatment with caffeine and its withdrawal modify the antidepressant-like activity of selective serotonin reuptake inhibitors in the forced swim and tail suspension tests in mice. Effects on Comt, Slc6a15 and Adora1 gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 337:95-103. doi: 10.1016/j.taap.2017.10.020.
- Szopa A, Poleszak E, Wyska E, Serefko A, Wośko S, Właż A, Pieróg M, Wróbel A, Właż P. 2016. Caffeine enhances the antidepressant-like activity of common antidepressant drugs in the forced swim test in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 389(2):211-21. doi: 10.1007/s00210-015-1189-z.
- Tallot L, Doyère V, Sullivan RM. 2015. Developmental emergence of fear/threat learning: neurobiology, associations and timing. *Genes, brain, and behavior*. 15(1):144-54.
- Tang M, Kuribara H., Falk JL. 1989. Anxiolytic effect of caffeine and caffeine-clonazepam interaction: evaluation by NaCl solution intake. *Pharmacol Biochem Behav*. 32, 773–6.
- Taylor F, Cahill L. 2002. Propranolol for reemergent posttraumatic stress

disorder following an event of retraumatization: a case study. *J Trauma Stress.* 15(5):433-7.

Taylor F, Raskind MA. 2002. The alpha1-adrenergic antagonist prazosin improves sleep and nightmares in civilian trauma posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 22(1):82-5.

Thoeringer CK, Henes K, Eder M, Dahlhoff M, Wurst W, Holsboer F, Deussing JM, Moosmang S, Wotjak CT. 2012. Consolidation of remote fear memories involves Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) receptor type 1-mediated enhancement of AMPA receptor GluR1 signaling in the dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology.* 37(3):787-96. doi: 10.1038/npp.2011.256.

Thonberg H, Fredriksson JM, Nedergaard J, Cannon B. 2002. A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem J.* 364(Pt 1):73-9.

Tollenaar MS, Elzinga BM, Spinhoven P, Everaerd W. 2009a. Immediate and prolonged effects of cortisol, but not propranolol, on memory retrieval in healthy young men. *Neurobiol Learn Mem.* 91(1):23-31. doi: 10.1016/j.nlm.2008.08.002.

Tollenaar MS, Elzinga BM, Spinhoven P, Everaerd W. 2009b. Psychophysiological responding to emotional memories in healthy young men after cortisol and propranolol administration. *Psychopharmacology (Berl).* 203(4):793-803. doi: 10.1007/s00213-008-1427-x.

Tolmeijer E, Kumari V, Peters E, Williams SCR, Mason L. 2018. Using fMRI and machine learning to predict symptom improvement following cognitive behavioural therapy for psychosis. *Neuroimage Clin.* 20:1053-1061. doi: 10.1016/j.nicl.2018.10.011.

Török B, Sipos E, Pivac N, Zelena D. 2019. Modelling posttraumatic stress disorders in animals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 90:117-133. doi:

10.1016/j.pnpbp.2018.11.013.

- Tortoriello J, Ortega A, Herrera-Ruíz M, Trujillo J, Reyes-Vázquez C. 1998. Galphimine-B modifies electrical activity of ventral tegmental area neurons in rats. *Planta Med.* 64(4):309-13.
- Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. 2015. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 16(6):317-31. doi: 10.1038/nrn3945.
- Treanor M, Brown LA, Rissman J, Craske MG. 2017. Can Memories of Traumatic Experiences or Addiction Be Erased or Modified? A Critical Review of Research on the Disruption of Memory Reconsolidation and Its Applications. *Perspect Psychol Sci.* 12(2):290-305.
- Tyrer PJ, Steinberg D. 1987. *Models for mental disorder: Conceptual models in psychiatry.* Chichester: Wiley.
- Uher R, Payne JL, Pavlova B, Perlis RH. 2014. Major depressive disorder in DSM-5 : implications for clinical practice and research of changes from DSM-IV. *Depress Anxiety.* 31(6):459–71.
- Ulrich G, Haug HJ, Fähndrich E. 1994. Acute vs. chronic EEG effects in maprotiline- and in clomipramine-treated depressive inpatients and the prediction of therapeutic outcome. *J Affect Disord.* 32(3):213-7.
- Ulrich G, Haug HJ, Stieglitz RD, Fähndrich E. 1998. EEG characteristics of clinically defined on-drug-responders and non-responders--a comparison clomipramine vs. maprotiline. *Pharmacopsychiatry.* 21(6):367-8.
- Umemori J, Winkel F, Didio G, Llach Pou M, Castrén E. 2018. iPlasticity: Induced juvenile-like plasticity in the adult brain as a mechanism of antidepressants. *Psychiatry Clin Neurosci.* 72(9):633-653. doi: 10.1111/pcn.12683.

- Ursano RJ, Zhang L, Li H, Johnson L, Carlton J, Fullerton CS, Benedek DM. 2009. PTSD and traumatic stress from gene to community and bench to bedside. *Brain Res.* 1293:2-12. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.030. Epub 2009 Mar 26.
- Vaiva G, Ducrocq F, Jezequel K, Averland B, Lestavel P, Brunet A, Marmar CR. 2003. Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. *Biol Psychiatry.* 54(9):947-9.
- van Balkom AJ, de Haan E, van Oppen P, Spinhoven P, Hoogduin KA, van Dyck R. 1998. Cognitive and behavioral therapies alone versus in combination with fluvoxamine in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *J Nerv Ment Dis.* 186(8):492-9.
- van der Zee EA, Luiten PG. 1999. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol.* 58(5):409-71.
- van Liempt S, Vermetten E, Geuze E, Westenberg HG. 2006. Pharmacotherapy for disordered sleep in post-traumatic stress disorder: a systematic review. *Int Clin Psychopharmacol.* 21(4):193-202.
- Vervliet B, Craske MG, Hermans D. 2013. Fear extinction and relapse: State of the art. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 9: 215-248.
- Vu MT, Adalı T, Ba D, Buzsáki G, Carlson D, Heller K, Liston C, Rudin C, Sohal VS, Widge AS, Mayberg HS, Sapiro G, Dzirasa K. 2018. A Shared Vision for Machine Learning in Neuroscience. *J Neurosci* 38(7):1601-1607. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0508-17.2018.
- Wade EC, Iosifescu DV. 2016. Using EEG for Treatment Guidance in Major Depressive Disorder Article in *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 1(5) ·DOI: 10.1016/j.bpsc.2016.06.002.

- Walker DL, Davis M. 2002. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(3):379-92.
- Wallis JD. 2018. Decoding Cognitive Processes from Neural Ensembles. *Trends Cogn Sci.* 22(12):1091-1102. doi: 10.1016/j.tics.2018.09.002.
- Wang J, Kurth-Nelson Z, Tirumala D, Soyer H, Leibo J, Munos R, Blundell C, Kumaran D, Botvinick M. 2016. Learning to reinforcement learn. arXiv preprint arXiv:1611.05763.
- Wang SH, de Oliveira Alvares L, Nader K. 2009. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci.* 12(7):905-12. doi: 10.1038/nn.2350.
- Wang Q, Jin J, Maren S. 2016. Renewal of extinguished fear activates ventral hippocampal neurons projecting to the prelimbic and infralimbic cortices in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 134 Pt A:38-43. doi: 10.1016/j.nlm.2016.04.002.
- Watanabe N. 2011. Fluoxetine, trazodone and ritanserin are more effective than placebo when used as add-on therapies for negative symptoms of schizophrenia. *Evidence-Based Mental Health.* 14(1):21. doi: 10.1136/ebmh.14.1.21.
- Weber M, Hart J, Richardson R. 2007. Effects of D-cycloserine on extinction of learned fear to an olfactory cue. *Neurobiol Learn Mem.* 87(4):476-82.
- Whalen DJ, Silk JS, Semel M, Forbes EE, Ryan ND, Axelson DA, Birmaher B, Dahl RE. 2008. Caffeine consumption, sleep, and affect in the natural environments of depressed youth and healthy controls. *J Pediatr Psychol.* 33(4):358-67.
- Widge AS, Ellard KK, Paulk AC, Basu I, Yousefi A, Zorowitz S, Gilmour A, Afzal A, Deckersbach T, Cash SS, Kramer MA, Eden UT, Dougherty DD, Eskandar EN. 2017. Treating refractory mental illness with closed-loop brain stimulation:

- Progress towards a patient-specific transdiagnostic approach. *Exp Neurol* 287(Pt 4):461-472. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.07.021.
- Widge AS, Malone DA, Dougherty DD. 2018. Closing the Loop on Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. *Frontiers in neuroscience*. 12, 175. doi:10.3389/fnins.2018.00175
- Wiltgen BJ, Silva AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem*. 14(4):313-7.
- 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(15):1336-44. doi: 10.1016/j.cub.2010.06.068.
- Wintermann GB, Rosendahl J, Weidner K, Strauß B, Petrowski K. 2017. Risk Factors of Delayed Onset Posttraumatic Stress Disorder in Chronically Critically Ill Patients. *J Nerv Ment Dis*. 205(10):780-787. doi: 10.1097/NMD.0000000000000714.
- Wong ML, Licinio J. 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* 2(5):343-51. doi: 10.1038/35072566
- Wolpe J. 1968. Psychotherapy by reciprocal inhibition. *Cond Reflex*. 3(4):234-40.
- Wood NE, Rosasco ML, Suris AM, Spring JD, Marin MF, Lasko NB, Goetz JM, Fischer AM, Orr SP, Pitman RK. 2015. Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: three negative psychophysiological studies. *Psychiatry Res*. 225(1-2):31-39. doi: 10.1016/j.psychres.2014.09.005.
- Worthington J, Fava M, Agustin C, Alpert J, Nierenberg AA, Pava JA, Rosenbaum JF. 1996. Consumption of alcohol, nicotine, and caffeine among depressed outpatients. Relationship with response to treatment. *Psychosomatics*. 37(6):518-22.

- Wu H, Miller KJ, Blumenfeld Z, Williams NR, Ravikumar VK, Lee KE, Kakusa B, Sacchet MD, Wintermark M, Christoffel DJ, Rutt BK, Bronte-Stewart H, Knutson B, Malenka RC, Halpern CH. 2018. Closing the loop on impulsivity via nucleus accumbens delta-band activity in mice and man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(1):192-197. doi: 10.1073/pnas.1712214114.
- Yang CH, Huang CC, Hsu KS. 2005. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. *J Neurosci*. 25(17):4288-93.
- Yang WZ, Liu TT, Cao JW, Chen XF, Liu X, Wang M, Su X, Zhang SQ, Qiu BL, Hu WX, Liu LY, Ma L, Yu YC. 2016. Fear Erasure Facilitated by Immature Inhibitory Neuron Transplantation. *Neuron*. 92(6):1352-1367. doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.018.
- Yiu AP, Mercaldo V, Yan C, Richards B, Rashid AJ, Hsiang HL, Pressey J, Mahadevan V, Tran MM, Kushner SA, Woodin MA, Frankland PW, Josselyn SA. 2014. Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. *Neuron*. 83(3):722-35. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.017.
- Yoon T, Otto T. 2007. Differential contributions of dorsal vs. ventral hippocampus to auditory trace fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*. 87: 464-475.
- Yu L, Coelho JE, Zhang X, Fu Y, Tillman A, Karaoz U, Fredholm BB, Weng Z, Chen JF. 2009. Uncovering multiple molecular targets for caffeine using a drug target validation strategy combining A 2A receptor knockout mice with microarray profiling. *Physiol Genomics*. 37(3):199-210. doi: 10.1152/physiolgenomics.90353.2008.
- Zarrindast MR, Shafaghi B. 1994. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *Eur J Pharmacol*. 256(3):233-9.

- Zarrindast MR, Shendy MM, Ahmadi S. 2007. Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. *Behav Pharmacol.* 18(4):289-95.
- Zhao Y, Hessburg JP, Asok Kumar JN, Francis JT. 2018. Paradigm Shift in Sensorimotor Control Research and Brain Machine Interface Control: The Influence of Context on Sensorimotor Representations. *Front Neurosci.* 12:579. doi: 10.3389/fnins.2018.00579.
- Zhou H, Xiong GJ, Jing L, Song NN, Pu DL, Tang X, He XB, Xu FQ, Huang JF, Li LJ, Richter-Levin G, Mao RR, Zhou QX, Ding YQ, Xu L. 2017. The interhemispheric CA1 circuit governs rapid generalisation but not fear memory. *Nat Commun.* 8(1):2190. doi: 10.1038/s41467-017-02315-4.
- Zhou YL, Riccio DC. 1994. Pretest cuing can alleviate the forgetting of contextual stimulus attributes. *Learning & Motivation.* 25, 233-244.
- Zhou Y, Riccio DC. 1996. Manipulation of Components of Context: The Context Shift Effect and Forgetting of Stimulus Attributes. *Learn Motiv.* 27(4):400-7.
- Zinbarg RE, Barlow DH, Brown TA, Hertz RM. 1992. Cognitive-behavioral approaches to the nature and treatment of anxiety disorders. *Annu Rev Psychol.* 43:235-67.
- Zou C, Ding X, Flaherty JH, Dong B. 2013. Clinical efficacy and safety of fluoxetine in generalized anxiety disorder in Chinese patients. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 9:1661-70 8.

8. Anexos

Mudanças na locomoção induzida pela administração de cafeína 40mg/kg. O experimento foi realizado após sugestão dos revisores com o intuito de confirmar que o aumento da dose levaria aos efeitos psicoestimulantes geralmente reportados com a substância.

