

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Angel David Arellano Perez

**ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO: EFEITOS DO
METILFENIDATO, RITMO CIRCADIANO, OCITOCINA E SUPORTE
SOCIAL SEXO-DEPENDENTE DURANTE A REATIVAÇÃO**

Porto Alegre, 2022

Angel David Arellano Perez

**ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO: EFEITOS DO
METILFENIDATO, RITMO CIRCADIANO, OCITOCINA E SUPORTE
SOCIAL SEXO-DEPENDENTE DURANTE A REATIVAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

AGRADECIMENTOS

Por ter vida e saúde para viver esta experiência, graças a Deus por este sonho realizado.

Aos meus pais por sempre me apoiarem, obrigado Mami por todos os momentos de apoio incondicional. Pai obrigado pelos ânimos e me encorajar para continuar; pais mesmo à distância, esta conquista é também de vocês. Para meu irmãozinho, obrigado por me apoiar e me permitir chegar até aqui, você é meu maior exemplo.

Ao Programa de Bolsas de Estudo da OEA por me dar esta oportunidade. CAPES pelo o apoio financeiro. PPG Neurociências-UFRGS. Obrigado professora Denys pelo apoio no início e pelo incentivo para continuar.

Ao Laboratório de Neurobiologia da Memória, imensamente grato por me receber como parte de uma família, meus parceiros e colegas. Professor Jorge, obrigado por me receber quando eu precisei. Professor Lucas de Oliveira, mestre, muito obrigado por seu apoio durante estes anos, sua constante dedicação, paixão pela ciência e encorajamento na pesquisa me encorajam a ir adiante, obrigado por acreditar em mim e explorar o potencial que eu tenho. Meus queridos amigos, Bruno, admiro o quanto você sabe, obrigado por sua amizade e por ser um parceiro de saídas! Mirelle, a melhor colega psicóloga, seu interesse pela neurociência me encorajou, obrigado por tornar minha estadia no laboratório agradável! Jordana, obrigado pelo apoio quando precisei!. Aline, obrigado por fazer parte deste trabalho, admiro seu potencial. Fernanda, você tem muito potencial, obrigada por sua ajuda com o inglês. Henrique, obrigado por alegrar os momentos compartilhados e as piadas para nos alegrar. Tina, saudades de você, como eu amo sua personalidade, obrigado por tudo!

Joelma, obrigado pelos belos momentos compartilhados e sua amizade, na vida a gente perde mas ganha muitas coisas melhores, eu perdi uma mala mas ganhei muitas mais, com coisas melhores que enchem meus dias de alegria, obrigado por ser incondicional, admiro seu talento e energia para fazer as coisas.

Meus amigos Javier e Ana, com os quais compartilhei muito tempo. Anita atenciosa e alegre, obrigado por me mostrar essa faceta da tua vida, devo conhecer teu pais! Obrigado amigos por abrilhantarem esses dias de pandemia. Javier obrigado por me mostrar que por mais triste que seja o cenário, há sempre um motivo para continuar. Obrigada Marcia pelo apoio durante minha estadia la e me tornar parte da tua família. Juliana, obrigado por todos os momentos que compartilhamos, você me encoraja a seguir em frente!

À família Madruga por me receber na sua casa, obrigado por seu apoio durante minha estadia, você mantém um lugar em meu coração, obrigado por alegrar meus dias, Srs. Madruga, obrigado por sua confiança. Katia, minha mentora internacional, obrigada por me mostrar que os sonhos podem se tornar realidade. Eu te admiro, obrigado por me apoiar para chegar até aqui!

À Igreja Batista Betel de Porto Alegre e aos amigos que deixei, obrigado Rafa e Gaby por fazerem do meus Natais no Brasil os melhores, por me fazerem parte da sua família, aos pais de Gaby por me apoiarem quando fiquei em São Paulo e pelo amor recebido, obrigado à família Da Costa pelo apoio nos momentos de necessidade e a constância no caminho da Fe, estamos juntos!

Professores e funcionários da PPG Neurociências gratos pelos ensinamentos e apoio ao longo do caminho.

Professora Carla Dalmaz, pelas sugestões na escrita e demais membros da Banca, obrigado.

RESUMO

Experiências ou eventos com conteúdo emocional facilitam a consolidação de memórias, assim como sua evocação posterior, mas aquelas associadas com eventos estressantes ou com uma carga emocional negativa podem desencadear transtornos emocionais trazendo lembranças negativas que podem se tornar persistentes e em alguns casos levam a formação de transtornos de estresse pós-traumático ou fobias. Os principais tratamentos psicológicos se baseiam na terapia de exposição, levando a formação da memória de extinção tornando a memória original susceptível de retornar. Alternativamente, as propriedades dinâmicas da memória permitem sua atualização, após sua evocação elas podem entrar num estado lábil susceptível de intervenções uma janela de tempo que permite modificar seu traço através da incorporação de um novo estado emocional ou informação durante sua reativação, processo conhecido como reconsolidação. Através da reconsolidação uma memória pode incorporar uma valência emocional menos aversiva e atenuar a expressão de medo proporcionando novos alvos de intervenção para terapias psicológicas. Pesquisas feitas pelo nosso grupo mostraram que a utilização de um estímulo de valência gratificante, durante a reativação de memórias aversivas levaram a sua atenuação, esses resultados orientaram o desenvolvimento dessas teses, tendo como objetivo a incorporação de um estado menos aversivo durante a sua reativação para levar à atenuação emocional da memória. Aqui foram utilizados ratos Wistar adultos, machos e fêmeas treinados ao condicionamento aversivo ao contexto; a memória de medo foi reativada posteriormente usando diferentes tempos de exposição ao contexto com a administração de metilfenidato (i.p.), durante o ciclo escuro, com a incorporação de uma fêmea, ou com a infusão de ocitocina no hipocampo. No dia seguinte, a memória foi testada para avaliar qualquer mudança na expressão de congelamento. No capítulo I, MFD foi usado na dose de 3 e 10 mg/kg pré ou pós-reativação (i.p.), administração pre-reativação após três sessões levaram à atenuação da memória de medo em ambos grupos droga. Enquanto numa sessão de extinção, gerou um prejuízo na memória de extinção. Controles posteriores demonstraram que MFD em ambas doses teve efeito de preferência contextual e aumento da atividade locomotora na dose de 10 mg/kg. No capítulo II, ratos foram treinados ao CAC no ciclo claro, foi avaliado o efeito do ciclo circadiano na reativação da memória (ciclo claro ou escuro). Sucessivas reativações no ciclo escuro demonstraram ter um efeito na atenuação da memória comparado com o grupo reativado no ciclo claro, quando ambos os grupos foram testados no ciclo claro. Este efeito foi bloqueado quando um inibidor de glicocorticoides foi administrado (i.p.) antes de cada reativação no ciclo escuro. Diferenças não foram encontradas na memória de extinção. No capítulo III. Ratos passaram pelo condicionamento aversivo ao contexto, dois dias após a memória de medo foi reativa com uma exposição ao contexto de 12 min, 3 minutos iniciais foram registrados e depois uma fêmea (familiar, com sessão de interação prévia, familiar de um dia para outro/overnight, ou não familiar) foi apresentada no contexto pelos próximos 9 minutos. Na sessão de teste os grupos expostos durante a reativação com uma fêmea familiar, mostram uma atenuação do congelamento, sem retorno da memória em testes posteriores. O uso de antagonista de dopamina e ocitocina no hipocampo antes da reativação bloqueia este efeito na atenuação da memória. No capítulo IV, a infusão de OT no hipocampo prejudicou a consolidação da memória de medo em machos, mas não em fêmeas; sua administração após uma sessão de reativação de 12 minutos atenuou a expressão da memória em uma sessão de teste posterior. Nossos resultados em conjunto contribuem para ao entendimento da reconsolidação da memória através de intervenções baseadas no contracondicionamento, assim, nossos achados abrem novas vias para o uso de novos tratamentos para atenuação de memórias de medo em humanos.

ABSTRACT

Experiences or events with emotional content facilitate the consolidation of memories, as well as their subsequent recall, but those associated with stressful events or with a negative emotional charge can trigger emotional disorders by bringing back negative memories, that can become persistent and trigger the formation of post-traumatic stress disorders or phobias. The main psychological treatments are based on exposure therapy, forming an extinction memory, making the original memory likely to return. Alternatively, the dynamic properties of memories allow them to be updated, so that after their recall they can enter into a stable state, and a window of time allows them to be modified through the incorporation of new emotional states or information during their reactivation, a process known as reconsolidation. Through reconsolidation, a memory can incorporate a less aversive emotional valence and attenuate the expression of fear, which provides new intervention targets for psychological therapies. Research in our group has shown that the use of a rewarding valence stimulus during the reactivation of aversive memories led to its attenuation, these results guided the development of this thesis, aiming to incorporate a less aversive state during its reactivation to lead to emotional attenuation of the memory. Here, adult male and female Wistar rats trained to context aversive conditioning were used; fear memory was subsequently reactivated using different context exposure times with methylphenidate (i.p.) administration, during the dark cycle, with the incorporation of a female, or with oxytocin infusion into the hippocampus. The next day, memory was tested to assess any changes in freezing expression. In chapter I, MFD was used at a dose of 3 and 10 mg/kg pre- or post- reactivation (i.p.), and pre-reactivation administration after three sessions led to an attenuation of fear memory in both drug groups. While in an extinction session, it generated an impairment of extinction memory. Later controls showed that MFD in both doses had contextual preference effect and increased locomotor activity at the dose of 10 mg/kg. In chapter II, rats were trained to CAC in the light cycle, and the effect of the circadian cycle on memory reactivation (light or dark cycle) was evaluated. Successive reactivations in the dark cycle showed an effect on memory attenuation compared to the group reactivated in the light cycle, when both groups were tested in the light cycle. This effect was blocked when a glucocorticoid inhibitor was administered (i.p.) before each dark cycle reactivation. No differences were found in extinction memory. In Chapter

III. Rats subjected to context aversive conditioning, two days later fear memory was reactivated with a 12-min exposure to the context, initial 3 min were recorded and then a female (familiar, with previous interaction session, familiar overnight, or unfamiliar) was presented in the context for the next 9 min. In the test session the groups exposed during reactivation with a familiar female show an attenuation of freezing, with no return of memory recall in later tests. The use of dopamine and oxytocin antagonist in the hippocampus before reactivation blocks this effect on memory attenuation. In Chapter IV, OT infusion into the hippocampus impaired fear memory consolidation in males but not in females; its administration after a 12-min reactivation session attenuated memory expression in a later test session. Our results together contribute to the understanding of memory reconsolidation by counterconditioning-based interventions, thus, our findings open new avenues for the use of novel treatments for attenuating fear memories in humans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos destinos da memória após sua reativação.

Figura 2. Formação da memória de extinção e retorno da memória original

Figura 3. Contra-condicionamento contra terapia baseada na extinção

Figura 4. Fisiologia dos ciclos circadianos

Figura 5. Interação social: Contágio emocional em relação ao tamponamento social

Figura 6. Vias de projeção de ocitocina e seus receptores

Figura 7. Conclusões por capítulo.

Anexo 1. Comportamento de medo no coespecífico observador.

Lista de Abreviaturas

- 5HT Serotonina
- ABL Amígdala basolateral
- ACe Amígdala central
- ACh acetilcolina
- AdX Adrenalectomia
- AL Amígdala lateral
- AMe Amígdala medial
- CA1 Corno de Amon 1, região hipocampal
- CA2 Corno de Amon 2, região hipocampal
- CA3 Corno de Amon 3, região hipocampal
- CAC Condicionamento aversivo ao contexto
- CA-Cx Córtex cingulado anterior
- CPF Córtex pré-frontal
- CS- Estímulo incondicionado
- CS+ Estímulo condicionado
- D1 Receptor dopaminérgico do tipo 1
- D2 Receptor dopaminérgico do tipo 2
- DG Giro denteado do hipocampo
- DSM Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
- HPA Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
- HPC Hipocampo
- IL-Cx Córtex infra límbico
- mPFC Córtex pré-frontal medial
- NA Noradrenalina
- NAc Núcleo accumbens
- NMDA Receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato
- OT Ocitocina
- PrL-Cx Córtex pré límbico
- TDAH Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
- TEPT Transtorno de estresse pós-traumático
- HPCd Hipocampo dorsal
- VTA Área tegmental ventral

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Memórias traumáticas e intervenções para atenuação.....	3
1.2. Intervenções com psicoestimulantes: uso do metilfenidato na atenuação de memórias aversivas.	6
1.3. Ritmo circadiano na reativação de memórias de medo: intervenções durante a fase ativa	8
1.4. Suporte social na atenção de memórias aversivas: reativando memórias de medo com um parceiro.....	12
1.5. Ocitocina (OT) na modulação da resposta de medo: evidências na atenuação de memórias.	14
2. OBJETIVOS GERAIS	19
2.1. Objetivos específicos do capítulo I	19
2.2. Objetivos específicos do capítulo II	19
2.3. Objetivos específicos do capítulo III.....	19
2.4. Objetivos específicos do capítulo IV.....	20
3. CAPÍTULO I Rewarding information presented during reactivation attenuates fear memory: Methylphenidate and fear memory updating	21
4. CAPÍTULO II Memory reactivation in the dark, active phase promotes fear attenuation: role of glucocorticoids.	31
5. CAPÍTULO III Updating fear memory in males with female presentation during reactivation: role of dopamine and oxytocin receptors.....	47
6. CAPÍTULO IV Oxytocin in the hippocampus impairs contextual fear memory formation in males and facilitates its attenuation: role in memory reactivation and extinction.	74
7. DISCUSSÃO GERAL	91
7.1. Atenuando a expressão de medo com estímulos gratificantes: efeitos na atualização da memória.....	96
7.2. Interferindo na atualização ou acelerando a extinção.....	99
7.3. Atenuação da expressão de medo e prejuízo na extinção.....	100
7.4. Fêmeas são o melhor suporte para atenuar o medo em machos?.....	101
7.5. Ocitocina modula a aquisição de memórias aversivas, efeito dependente do sexo.	102
7.6. Alcance das intervenções em pesquisa com humanos.....	103
8. CONCLUSÕES	104
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1. INTRODUÇÃO

Memória e aprendizado são processos interligados, compreendem a base para a escolha das nossas decisões e são importantes para nossa sobrevivência. Na figura seguinte é possível observar as fases que compreendem a formação da memória e seus destinos após sua evocação, referido em específico para o aprendizado associativo, o alvo desta tese: quando uma nova informação é adquirida, mecanismos celulares e moleculares levam a sua consolidação, e uma vez consolidada ela pode ser reativada posteriormente (de Oliveira Alvares & Do-Monte, 2021):

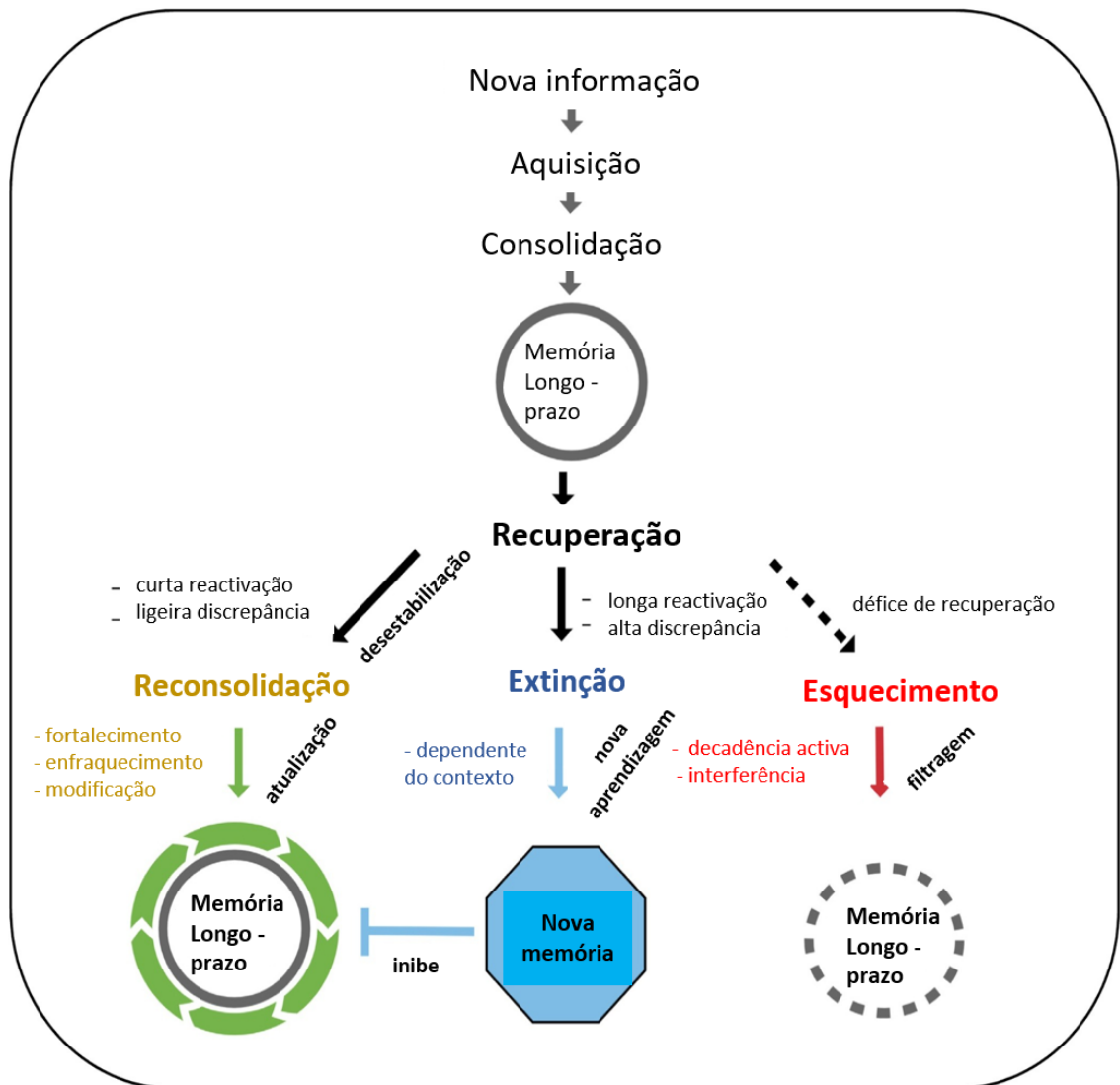


Figura 1. Esquema dos destinos da memória após sua reativação.

Adaptação de: Oliveira Alvares & Do-Monte (2021)

O mecanismo para a formação de uma memória e sua consolidação, refere-se ao processo pelo qual uma memória provisória e lábil é transformada em um conteúdo mais estável e duradoura (Squire, 2015). Para uma revisão mais aprofundada, ver Quillfeldt (2019) e Kathe et al., (2013). O primeiro processo compreende a consolidação sináptica (formação da memória de

curto prazo) que envolve alterações de proteínas pré-existentes, recrutamento de neurónios e suas ligações; este processo pode durar minutos ou horas. Depois, este processo continua através da consolidação sistémica e do recrutamento de nova síntese proteica (memória de longo prazo); consiste na reorganização gradual do traço explícito da memória acompanhado de mudanças graduais, onde a memória vai se tornando menos dependente do hipocampo, incrementando sua complexidade, distribuição, e conectividade até regiões do neocórtex, processo que pode levar de horas até semanas (Quillfeldt, 2019; Dudai, 1996).

Durante sua evocação a memória pode tomar diferentes vias, gerando mudanças na sua constituição ou engrama. Assim, em resposta ao tempo de exposição ao contexto ou estímulo previamente condicionado a memória pode ser reconsolidada, por sessões curtas; ou substituída por uma memória de extinção, produto de uma longa apresentação do estímulo condicionado. Por outro lado, se a memória apresenta um déficit na sua reativação ou informação teria sido esquecida, poderia ser consequência dos mecanismos de esquecimento. Ele atua como espécie de filtro para remover informações desnecessárias, detalhes seriam perdidos como resultados de um decaimento ativo ou por interferência de nova informação (Oliveira Alvares, & Do-Monte, 2021).

O processo de reconsolidação é guiado através dos mecanismos de desestabilização e reestabilização da memória, produto da leve discrepância entre o estímulo apresentado e o esperado (erro de predição). Sendo nessa fase quando a memória é susceptível à intervenção, assim a incorporação de uma nova informação ou novo estado emocional podem levar ao seu fortalecimento, enfraquecimento ou modificação (Monfís et al., 2009).

Enquanto a memória de extinção é produto de um maior tempo de exposição ao contexto, gera um maior erro de predição que formam a base para a criação de um novo aprendizado que se torna dependente do contexto, assim sua formação constitui a base de um novo aprendizado que inibe a memória aprendida originalmente, e em alguns casos podendo retornar com o tempo.

1.1. MEMÓRIAS TRAUMÁTICAS E INTERVENÇÕES PARA SUA ATENUAÇÃO

Ao longo da nossa vida, é possível estarmos expostos a experiências de conteúdo emocional intenso, levando a consolidação de memórias emocionais. Embora elas sejam importantes para nossa sobrevivência, elas podem se tornar recorrentes, como um evento traumático, por exemplo. Porém, essas experiências de conteúdo emocional negativo podem se tornar persistentes e retornar através da recuperação espontânea. Conseqüentemente, levando a aparição de sintomas de transtornos emocionais, como fobias, ansiedade, depressão ou, sinergicamente, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Eles são caracterizados no DSM-5 por um indivíduo que revive a experiência traumática, causando um impacto significativo na vida dos que sofrem desses transtornos (Levin et al., 2014).

Nas últimas décadas o TEPT tem se tornado alvo de intervenções terapêuticas, especialmente através das terapias de exposição onde o sujeito é exposto em um ambiente seguro para evocar novamente a experiência traumática na presença do estímulo aversivo. Comodescrito anteriormente, esta categoria de intervenção leva à formação da memória de extinção. Embora aconteça a inibição da expressão do medo, a memória inicial pode retornar por várias vias, como exemplificado na figura 2.

Na figura 2 é possível observar as fases da memória de extinção e as vias pelas quais a memória original pode retornar. O processo de aquisição acontece quando dois estímulos são pareados (som e choque com o carro) e geram uma resposta condicionada (aumento do medo). Visto que a memória é consolidada, ela pode ser reativada através das terapias de exposição (ambiente seguro), e durante esse treinamento a resposta de medo vai diminuir e a memória de extinção vai se formar. Como mencionado anteriormente, a memória original pode retornar, através da apresentação do estímulo condicionado (som), e/ou temporalmente por recuperação espontânea, e pela re-exposição ao contexto.

Nesse sentido, os alvos de intervenção na memória de extinção buscam compreender os mecanismos para conseguir generalizar essa memória, tornando-a menos dependente do contexto ou fortalecendo sua formação.

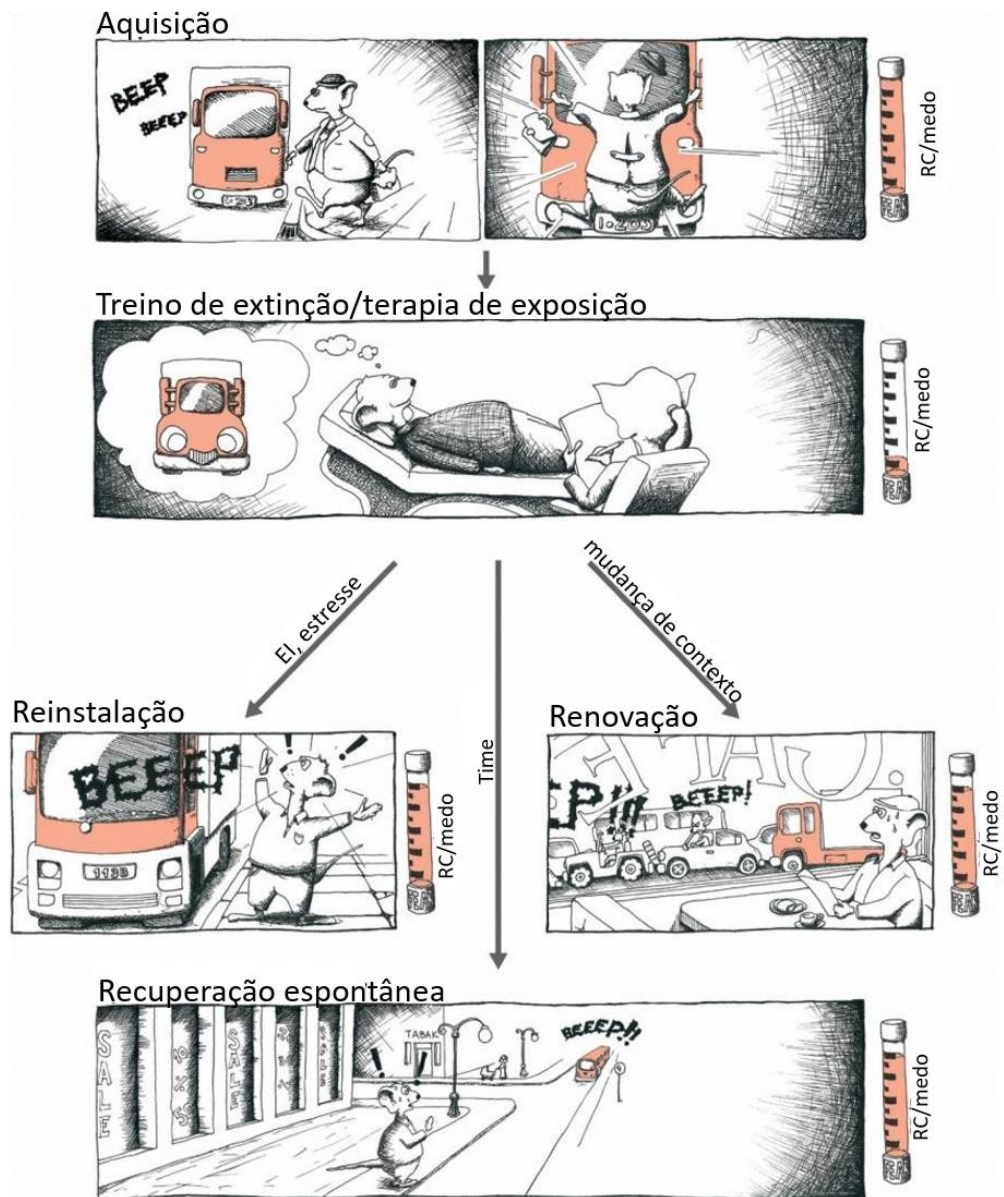


Figura 2. Formação da memória de extinção e retorno da memória original

Adaptação de: Singewald & Holmes (2019).

Outro mecanismo pelo qual as memórias podem se tornar suscetível de intervenção são as terapias baseadas nos mecanismos da reconsolidação ou atualização. Foi conhecido que quando uma memória é reativada passa por um estado de enfraquecimento onde é desestabilizada e reestabilizada novamente, um processo dependente das sínteses de proteína (Nader et al., 2000; Lee, et al., 2006).

Assim, aproveitando o estado lábil da memória durante sua evocação, onde ela se torna suscetível a intervenções, uma nova informação ou estado emocional pode ser incorporado. Um dos mecanismos que a diferenciam da memória de extinção é que a intervenção é dirigida à memória original ou ao engrama que a suporta. (Nader & Einarsson, 2010).

Nesse sentido, as intervenções na janela de reconsolidação tem aberto possibilidades para

mudar tanto o conteúdo da memória quanto sua valência emocional. Porém, existem condições limitantes para algumas categorias de memórias, aquelas de intensidade muito forte ou antigas, tornando seu traço difícil de labilizar e ser suscetível de intervenções (De Oliveira Alvares & Do-Monte, 2021; Raio & Phelps, 2015).

Por outro lado, na teoria que sustenta a reconsolidação, encontra-se também as intervenções baseadas no contra-condicionamento (Keller et al., 2020). Elas se caracterizam pela apresentação de um estímulo de valência gratificante durante a reativação de memórias aversivas, com o propósito de criar uma associação, facilitando a incorporação de um estado emocional menos aversivo no traço original da memória, diminuindo sua valência negativa através da atualização da memória.



Figura 3. Formação da memória de extinção e retorno da memória original

Adaptação de: Keller et al. (2020)

Como se observa na figura 3, uma experiência emocional negativa (mordida de um cachorro) gera uma memória aversiva que pode passar por uma terapia de extinção clássica ou pela apresentação de um estímulo de valência positiva (estado emocional gratificante), depois de um tempo, quando o estímulo condicionado (aversivo) é apresentado é possível observar que na terapia de extinção a memória original retorna enquanto na exposição com o contra-condicionamento ela pode ser lembrada com uma valência menos aversiva.

Nos próximos capítulos, serão apresentadas diversas intervenções que facilitam a atenuação da expressão do medo e que possibilitam seu uso para a atualização de memórias.

1.2. INTERVENÇÕES COM PSICOESTIMULANTES: USO DO METILFENIDATO NA ATENUAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

O uso de psicoestimulantes, tais como metilfenidato (MFD) e algumas classes de anfetaminas, têm sido prescrito principalmente no tratamento do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) pelos seus efeitos na melhora das funções cognitivas (Spencer et al., 2012), e na modulação das respostas emocionais, tornando-o alvo para o tratamento de outros transtornos. O MFD tem sido usado para o tratamento de TEPT em conjunto com terapia assistida (Houlihan, 2011), principalmente sua ação psicoestimulante pode melhorar os sintomas emocionais e cognitivos, e assim reduzir os sintomas associados ao TEPT. Entretanto, seu uso durante um evento traumático poderia ser prejudicial em alguns casos (Toledano & Gisquet-Verrier, 2014), porque poderia exacerbar as respostas de medo, e assim favorecer a consolidação de eventos traumáticos (Herbst, McCaslin, & Kalapatapu, 2017). Nessa linha, um droga com efeitos psicoestimulantes tal como o 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tem sido estudado na redução dos sintomas do TEPT, e já se encontra em testes clínicos de fase 3, os resultados são promissores para sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Mitchell et al., 2021); isto poderia representar uma referência para a utilização futura do MFD no tratamento do TEPT.

Numa revisão de Feduccia e Mithoefer (2018) encontram-se diversas evidências do efeito do uso de MDMA no tratamento de TEPT com psicoterapia assistida, atribuindo seus aportes na facilitação de novos aprendizados; seus mecanismos de ação são o aumento da liberação de monoaminas (serotonina, noradrenalina, dopamina) e hormônios (ocitocina e cortisol), envolvendo a participação da amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal na ativação do sistema mesocorticolímbico, dopaminérgico e noradrenérgico. Os autores sustentam a ideia que a redução dos sintomas do TEPT possa acontecer pela facilitação da extinção ou reconsolidação da memória de medo, atribui-se que o *mismatch* durante a experiência de evocação da memória com emoções prazerosas adicionais possa permitir a atualização de informações, embora os mecanismos pelo quais essa nova valência é incorporada ainda não está claro (Toledano & Gisquet-Verrier, 2014).

Quanto ao uso de metilfenidato (MFD), um fármaco conhecido pelo nome comercial de Ritalina, é ainda a principal droga para o tratamento do TDAH (Shellenberg et al., 2020), seu mecanismo de ação atua na inibição da recaptção de dopamina e noradrenalina (Faraone, 2018). O uso potencial do MFD para o tratamento de TEPT tem sido reportado tanto em modelos animais como em humanos (Malikowska-Racia & Salat, 2019; Aga-Mizrachi et al., 2014), sua

administração antes do diagnóstico de PTSD em humanos reduziu as respostas de ansiedade durante a recuperação da memória de medo um mês depois (Ritov & Richter-Levin, 2017), um estudo de McAllister et al. (2016) apresentou resultados promissores para o tratamento do TEPT, reduzindo significativamente as queixas cognitivas associadas ao TEPT. Outros efeitos são uma melhora na flexibilidade cognitiva, atenção e memória (Godfrey, 2009) assim como na diminuição da ansiedade (Ernst et al., 2016).

Em estudos com animais os efeitos do MFD podem variar em relação ao tempo e via administração, assim como a dose. Na aquisição da memória, Camarck et al. (2014.a) encontraram que a administração intraperitoneal (i.p.) de MFD 1 mg/kg, 30min antes do treino, melhorou a aquisição da memória ao contextual e ao tom, e doses menores (0,01-0,1 mg/kg) só no condicionamento ao tom, na dose de 10 mg/kg foi encontrado um prejuízo da aquisição ao contexto e um aumento da atividade locomotora. Zheng et al. (2008) utilizaram a tarefa de esquiva inibitória e mostram uma facilitação da consolidação quando infundido pós-treino na amígdala basolateral (ABL) ou no córtex cingulado e sua administração intraperitoneal (i.p) na dose de 0,5 ou 5 mg/kg não gerou efeito algum. Abraham et al. (2012) encontraram uma facilitação da extinção no condicionamento ao contexto (sessão de 12min) com uma dose de 10 mg/kg (i.p) usando um treino de intensidade baixa (2 sec., 0,35 mA), imediatamente antes da reexposição ao contexto, e posteriormente utilizando a dose de 20 mg conseguiram um efeito em testes subsequentes. Furini et al. (2017) infundiram MFD diretamente na região de CA1 20min antes de uma sessão de extinção (treino de 2s 0,5 mA), e encontraram uma diminuição do nível de congelamento dos animais durante o treino e no teste realizado um dia após.

Na tarefa de labirinto aquático de Morris, o tratamento com 10 mg/kg MFD melhorou a aquisição e retenção de memória, enquanto o uso de 1 mg/kg MFD teve efeito só na retenção (Camarck et al., 2014.b). Em outro trabalho, utilizando esse mesmo protocolo, MFD foi administrado via oral nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg e os efeitos encontrados foram uma melhora da aquisição de memória, retenção, reconsolidação, enquanto a extinção foi prejudicada. Tratamento por 6 semanas nas doses 0,25 e 0,5 mg/kg produziu um aumento na atividade motora, mas uma dose mais alta (1,0 mg/kg) levou a sensibilização comportamental.

Assim como outros psicoestimulantes, o MFD, dependendo da dose, gera efeito de preferência ao contexto, tendo sido registrado que na dose de 10 mg/kg há um alto potencial de dependência e efeito de sensibilização, enquanto doses mais baixas 1 mg/kg MPH gera um potencial mínimo de dependência, sem consequência na sensibilização (Carmack et al., 2014.a). A administração via oral tem mostrado também efeito de preferência nas doses de 3 e 10 mg/kg (Wooters, Walton, & Bardo, 2011).

O MFD, assim como outros psicoestimulantes, tem mostrado ter um efeito no aumento da atividade locomotora, especialmente na dose de 10 mg/kg (via intraperitoneal) (Carmack et al., 2014.a; Koda et al., 2010). O que poderia estar associado com um efeito da dose, pois em doses menores os resultados não são conclusivos (Arellano Perez, et al., 2020). Outra consideração é o tempo de absorção, pois quando MFD é administrado intraperitonealmente nos ratos, as concentrações máximas de dopamina são registradas entre os 10-15 min após sua administração (Shimizu et al., 2019). Em relação aos estudos em humanos, seria importante notar que a dose clínica utilizada seria o equivalente a 2,5-3 mg/kg nos modelos animais (Kuczenski & Segal, 2005; Gerasimov et al., 2000). Assim, os resultados encontrados nesta tese podem ser tidos em conta na investigação com humanos.

1.3. RITMO CIRCADIANO NA REATIVAÇÃO DE MEMÓRIAS DE MEDO: INTERVENÇÕES DURANTE A FASE ATIVA

Os animais devem responder a mudanças ou demandas do ambiente, eles são preparados através de um sistema de modulação fisiológico que responde a mecanismos endógenos programados de forma circadiana. Esse sistema chamado ritmo circadiano é dividido em duas fases bem conhecidas em roedores, fase ativa (ciclo escuro) e fase inativa (ciclo claro) que seria o ciclo de menos alerta ou sono (Sharma, 2003; Daan, 2000).

Trabalhos prévios reportam que a memória pode ser modulada em resposta ao ciclo circadiano. Em camundongos, a aquisição da memória de medo ao tom é mais rápida quando o treino acontece na fase inativa, onde também o nível de congelamento é maior, independente do ciclo de treino (Chaudhury & Colwell, 2002). Em ratos, a resposta de condicionamento ao tom é maior na fase inativa que na fase ativa, isso quando treino e teste acontecem no mesmo ciclo circadiano (Kumar & Jha, 2012). Este efeito também tem se encontrado para o condicionamento de aversão ao paladar dependente da amígdala, com maior força na memória quando o condicionamento ocorre na fase inativa (Infurna et al., 1979). Em outro estudo (Woodruff, 2015), ratos foram submetidos ao condicionamento aversivo ao tom e tanto treino quanto teste foram realizados no mesmo ciclo, interessante, os níveis de congelamento não mostraram diferenças quando o teste foi comparado entre os ciclos.

Estes resultados indicam que o efeito do ciclo circadiano na consolidação da memória, não parecem ser conclusivos quando treino e teste acontecem em ciclos diferentes, mas quando a memória é evocada durante a fase ativa (ciclo escuro) a expressão de congelamento pode ser menor que na fase inativa (ciclo claro).

Em aspectos evolutivos, Albrecht & Storck (2017) mencionam que estas variações da expressão de medo podem estar relacionadas com o aumento da importância dos eventos aversivos que ocorrem durante a fase inativa, quando o animal geralmente se retira para o ninho. Somado ao aumento da probabilidade de sono pós-treino, o qual é necessário para a consolidação da memória, o que poderia reforçar a memória do medo adquirida durante a fase inativa (Klinzing et al., 2019).

Por outro lado, os resultados no aprendizado de extinção mostram descobertas promissoras, mas as intervenções podem ser dependentes do ciclo de treino. Em camundongos, a taxa de extinção é melhor quando o treino acontece na fase escura (Caudhury & Colwell, 2002). Em ratos, a memória de extinção foi facilitada quando treino e teste aconteceram durante a fase ativa, e esse efeito foi dependente da presença das glândulas suprarrenais, um efeito que se correlaciona pela liberação de cortisol (Woodruff et al., 2015).

Considerando os resultados anteriormente descritos é possível atribuir a atenuação da expressão do medo também ao aumento dos níveis de corticosterona. Como é sabido, os níveis de glicocorticoides modulam a expressão da memória (Kelliher et al., 2000; Rudy & Pugh, 1998; de Quervain, et al., 2019). De maneira interessante, em humanos foi mostrado que pela manhã o aprendizado de extinção foi melhor em comparação com a tarde, e isto foi correlacionado pelos altos níveis de cortisol presente durante o início da manhã (Pace-Schott et al., 2013).

Uma consideração importante a se fazer é sobre os padrões rítmicos na reativação de memórias. Albrecht & Storck (2017) descrevem uma dependência circadiana do estado de reativação de memórias aversivas como uma marcação temporal "*timestamping*"; assim a memória seria reforçada quando os testes são realizados em intervalos de 24 horas após treino, sendo mais eficaz durante a fase inativa (Harrison et al., 2017). Da mesma forma existiria uma sensibilidade nas mudanças ou interrupções do ciclo antes, ou depois do treino, o que afetaria o comportamento de medo contextual em camundongos e em ratos. Isto indica que o sono poderia ser relevante para a formação de memórias pelos seus efeitos circadianos (Harrison et al., 2017; Pace-Schott, Germain & Milad, 2015; Weiss & Donlea, 2022). Entretanto, as memórias adquiridas durante a fase ativa parecem ser mais resistentes à privação do sono (Hagewoud et al., 2010).

No que diz respeito à memória de extinção, ela também pode ser afetada por interrupções no ciclo circadiano o como efeito da privação do sono, entretanto, parece ser independente do ciclo onde a memória foi formada (Melo & Ehrlich, 2016; Kumar & Jha, 2012; Clark, 2020). Poderia se concluir que a reativação da memória é vulnerável às alterações do ciclo circadiano, associada com uma dessincronização das estruturas associadas.

Em pesquisas com humanos, o sono tem mostrado exercer um papel importante para a reativação de memórias (Pace-Schott et al., 2015), assim como nos processos de reconsolidação de memórias de medo em intervenções após sua reativação (Kind & Soeter, 2018). De fato, um estudo demonstrou que uma curta sesta após reativar e modificar uma memória reduz sua valência emocional (Azza et al., 2022).

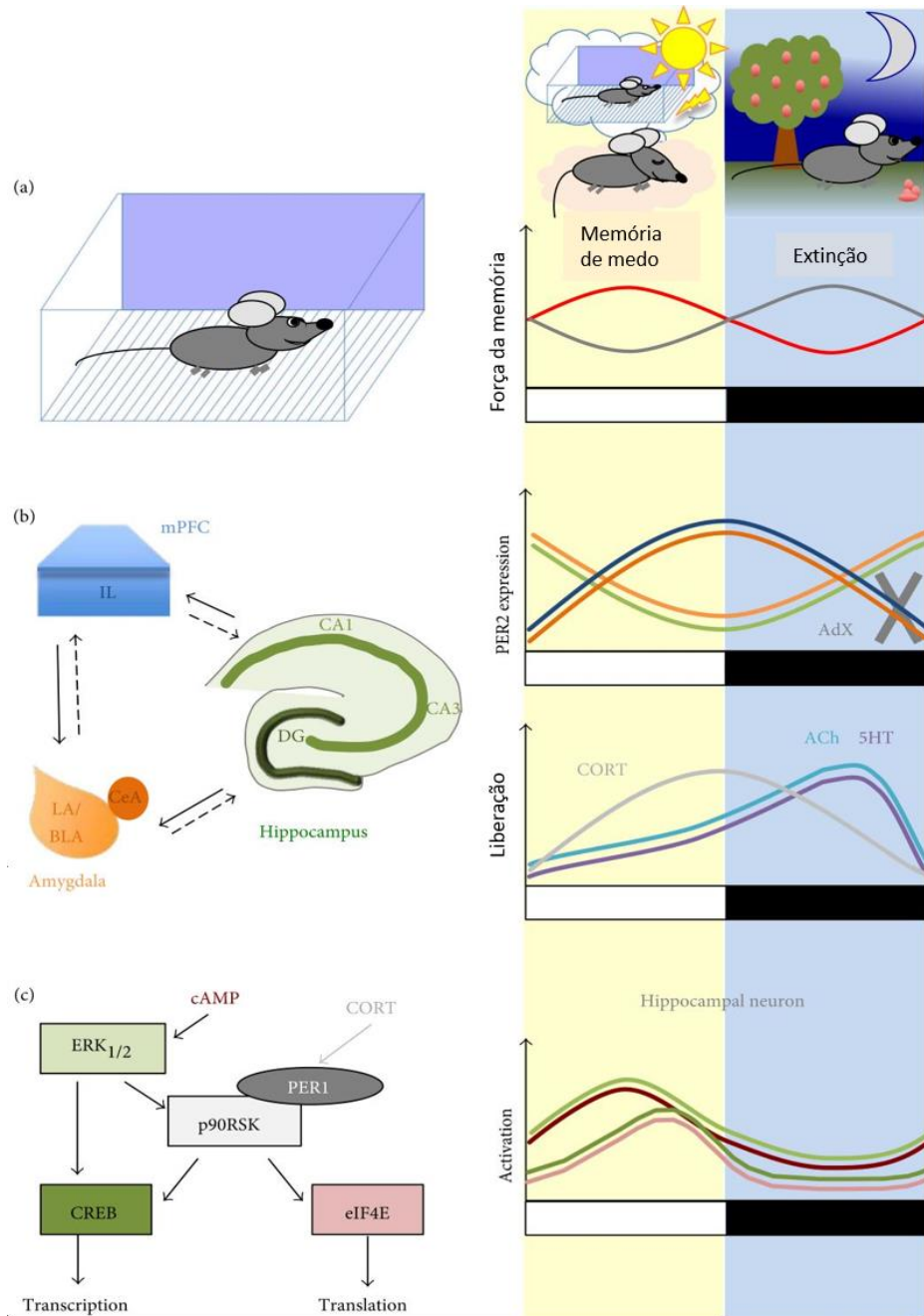


Figure 4. Fisiologia dos ciclos circadianos

Adaptação de: Albrecht & Storck (2017)

Em uma revisão de Albrecht e Storck (2017) foram apresentados os mecanismos envolvidos na modulação da memória por interações do ciclo circadiano. Como observado na figura anterior (figura 4). (a) nível comportamental, a força da memória é maior quando treino e

teste acontecem na fase inativa (ciclo claro). Treino e reativação da memória aversiva na fase ativa (ciclo escuro), facilitam a memória de extinção. (b) ao nível da circuitaria cerebral, a força da memória e a extinção são determinadas por interação da amígdala (pistas associadas), hipocampo (informação contextual) e córtex pré-frontal (CPF), para extinção da memória no córtex infralímbico (IL-Cx) seria importante pelas conexões com a amígdala central (ACe). Em relação à expressão dos genes no ciclo circadiano, o gene do período 2 (Per2) constitui um componente importante que modula o ritmo circadiano, expresso principalmente no núcleo supraquiasmático do hipotálamo, e outras áreas do cerebelo (Kim et al., 2018). A expressão de Per2 modula a atividade circadiana em algumas sub-regiões (Figura 4b), assim, podem se encontrar dois padrões, no ACe (laranja-escuro) e no IL-Cx (azul) uma maior expressão durante o final da tarde, enquanto na LA/ABL (laranja-claro) e no hipocampo (verde-claro) no início da manhã (Lamont et al., 2005; Woodruff et al., 2016). Além disso, o Per2 pode ser alterado por ação da corticosterona, assim, a supressão de cortisol por adrenalectomia (AdX) suprime o padrão de expressão circadiano de PER2 na ACe e IL. De fato, os níveis de corticosterona são maiores na fase ativa dos ratos, eles atingem seus picos no começo do ciclo escuro (Dalm et al., 2005).

Outro fator importante nas características oscilatórias próprias de cada ciclo, compreende o aumento na liberação de corticosterona (COR) no início do ciclo escuro, e a modulação de alguns neurotransmissores, por exemplo, a dopamina aumenta no córtex pré frontal, núcleo accumbens (NAc) e no estriado principalmente; a serotonina, em algumas áreas do neocórtex, hipocampo e amígdala; e a noradrenalina no córtex pré frontal, núcleos paraventricular e no hipocampo caudal (Hartsock & Spencer, 2020; Menon et al., 2019; Miyamoto et al., 2012; Albrecht & Storck, 2017).

Finalmente, a nível molecular (Figura 4c), a via MAPK em neurônios HPC apresentam um perfil de ativação circadiana, com picos durante a fase clara para o segundo mensageiro cAMP (vermelho-escuro), a cinase ERK1/2 (verde-claro), o fator de transcrição CREB (verde-escuro), e o fator de iniciação de tradução de proteínas eIF4E (vermelho claro). Além disso, a translocação nuclear de p90RSK é regulada pela PER1 modulando a ativação transcricional das proteínas a jusante dependentes da CREB. Os níveis de expressão PER1 são regulados pela sinalização de corticosterona (Rawashdeh et al., 2016; Albrecht e Storck, 2017).

1.4. SUPORTE SOCIAL NA ATENÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS: REATIVANDO MEMÓRIAS DE MEDO COM UM PARCEIRO

Atenuar memórias de medo com a exposição de um parceiro tem mostrado efeitos promissores durante a reativação de um evento aversivo. Tratasse de intervenções não farmacológicas onde a apresentação de um co-específico ou da mesma espécie gera um efeito de suporte social capaz de atenuar a expressão de medo, ou resposta de estresse.

Um efeito conhecido como tamponamento social, do inglês “*social buffering*”, acontece quando um co-específico é apresentado para um parceiro estressado ou com medo (ante a exposição de um estímulo aversivo), ou após um condicionamento de medo, diminuindo o congelamento do parceiro ou atenuando a resposta de estresse (Kiyokawa et al., 2007). Esse efeito se encontra nos mecanismos de suporte social pela afinidade entre as espécies. Kiyokawa (2017) explica que o suporte social acontece com a presença de um co-específico, ou seja: familiar, do mesmo sexo ou do sexo oposto, em um relacionamento de tipo não sexual. Essa apresentação pode acontecer antes, durante ou depois de uma tarefa aversiva, gerando uma resposta de suporte que diminuiria a expressão de medo.

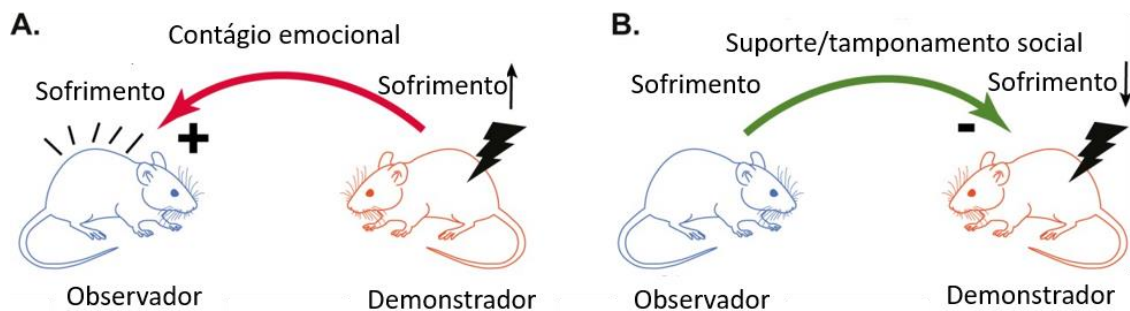


Figura 5. Contágio emocional e tamponamento social

Adaptação de: Han et al., 2019

Durante a exposição de um coespecífico (observador) enquanto outro rato está expressando uma resposta de medo (demonstrador), é possível encontrar duas categorias de efeito: o primeiro (a) associado ao contágio emocional, aqui o demonstrador que atravessa um treino de condicionamento ou a reativação de uma memória aversiva, gera um efeito de transmissão do medo ao observador, criando nele uma resposta de congelamento; o segundo (b) compreende o efeito de tamponamento social, o cenário é o mesmo no demonstrador, mas o observador gera um efeito de suporte no demonstrador, atenuando sua resposta de congelamento ou diminuindo a evocação de uma memória aversiva. Outra consideração na categoria do “observador” é que esse animal poderia ser considerado também “demonstrador” entanto transmite um comportamento atenuador para o rato estressado.

Pesquisas em ratos demonstram que a apresentação de um coespecífico não familiar durante o condicionamento aversivo ao tom inibe a expressão de congelamento, uma resposta mediada pelo sistema olfativo (Kiyokawa et al., 2009) suprimindo a ativação induzida pelo estímulo incondicionado na amígdala lateral (AL), em consequência reduzindo a resposta condicionada (Fuzzo et al., 2015; Kiyokawa et al., 2012). Esse mesmo efeito foi encontrado durante a reativação de uma memória de medo, e explicado por uma supressão da liberação de corticosterona (Kiyokawa et al., 2014b). Enquanto a exposição do odor de um familiar é efetiva, a exposição de um familiar da caixa de moradia mostra, todavia, ser mais efetiva (Kiyokawa et al., 2014b). Embora, em camundongos o efeito de tamponamento social com exposição de um coespecífico familiar parece ser efetivo só através da interação social, assim, só o odor não é suficiente (Liu & Yuan 2016). Por outro lado, o efeito de tamponamento social também tem se registrado entre exposição de fêmeas, como mostrado em Ishii et al. (2016), interessante, eles mostraram que o ciclo estral não afetou a resposta de medo.

Efeitos de interação social para avaliar suporte social em ratos de sexo diferente não conta com ampla referência na literatura (Kiyokawa & Hennessy, 2018). Mas tem sido encontrado que a exposição de uma fêmea reduz o nível de ansiedade e a resposta de medo em machos (Bai, 2009). Contudo, o suporte social tem mostrado benefícios para a memória de extinção, a exposição de um coespecífico não familiar do mesmo sexo diminui a expressão de medo e estresse o que contribui para a formação da memória de extinção (Mikami et al., 2020). Num estudo realizado por Gao (2020) a exposição de fêmeas ovariectomizadas (ovx) e tratadas com hormônios tornando-as sexualmente receptivas facilitou a formação de memória de extinção em machos. Aqui, poderíamos considerar o ciclo estral da fêmea durante a interação, podendo expressar um comportamento de maior ou menor receptividade para o macho (Yost et al., 2019; Chari, 2020) o que poderia estar mediado por um interesse sexual (Kiyokawa, 2017).

Por outro lado, existem variações baseados no sexo que poderiam mediar a preferência entre os ratos, por exemplo, tanto ratos machos quanto fêmeas evitam um co-específico estressados que seja não-familiar. No entanto, as fêmeas demonstraram uma preferência para interagir com parceiros estressados e familiares, enquanto machos os evitavam (Rogers-Carter et al., 2018). É possível pensar que as fêmeas sejam mais eficazes do que os machos para gerar um tamponamento para seu co-específico, sem isso causar uma experiência de maior ou menor contágio emocional, como já foi demonstrado pelo menos entre ratos do mesmo sexo, que ratos machos e fêmeas apresentam níveis similares no contágio emocional (Han et al., 2020). Entretanto, nos machos a interação com fêmeas pode acarretar um aumento nos níveis de glicocorticóides e se tornar uma experiência benéfica ou de prejuízo (Garrat et al., 2016). Contudo, a apresentação de uma fêmea familiar para o macho pode ter uma valência positiva,

tanto social quanto sexual. Quanto às fêmeas, ficaria a pergunta se um macho familiar poderia ser melhor que outra fêmea para atenuar a resposta de medo.

Em relação aos mecanismos envolvidos dependentes da interação entre ratos de sexo oposto, vias ocitocinérgicas seriam as principais envolvidas na interação de tipo social entre machos e fêmeas, enquanto ao efeito de gratificação sexual por se mesmo, as vias dopaminérgicas (ativação dos receptores D1 e D5) teriam maior participação (Bai et al., 2009).

Os efeitos reportados da interação social entre machos parecem ser dependentes dos receptores de vasopressina, enquanto em machos com uma fêmea familiar, parece ser dependente das vias ocitocinérgicas e dopaminérgicas (Lieberwirth & Wang, 2016; Loewen, 2020; Dumais & Veenema, 2016; Triana-Del Rio, 2015). Participação do NAcc tem sido reportada também, onde as vias dopaminérgicas pelo efeito de tamponamento social poderiam diminuir as respostas de estresse (Donovan, 2018). Por outro lado, receptores de ocitocina no VTA participam da interação social do tipo gratificante entre ratos do mesmo sexo, efeito que parece ser mais gratificante entre fêmeas que em ratos machos (Borland, et al. 2019). Finalmente, é importante considerar a participação do hipocampo nos processos de memória e vias ocitocinérgicas (Lazzari et al., 2019; Sánchez-Vidaña et al., 2016).

No seguinte tópico este assunto será abordado com maior detalhamento.

1.5. OCITOCINA (OT) NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA DE MEDO: EVIDÊNCIAS NA ATENUAÇÃO DE MEMÓRIAS

Ocitocina é um neuropeptídeo sintetizado nos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) no sistema hipotalâmico-neurohipofisário, com o núcleo magnocelular acessório do hipotálamo. Este sistema neuro-segregário projeta-se centralmente para a neuro-hipófise, liberado através da circulação da pituitária posterior de modo a modular a atividade de várias regiões cerebrais onde a OT pode se ligar aos seus receptores (Neumann & Landgraf, 2012; Frijling, 2017). Em humanos, embora ainda não se conte com um mapeamento conclusivo (Naja & Aoun, 2017), as principais regiões registradas que expressam receptores de OT foram observados na amígdala (ACe, ABL), área pré-óptica medial, hipotálamo (anterior e ventromedial), núcleo olfatório, córtex cingulado anterior (CA-Cx), septo ventrolateral e áreas do tronco encefálico (Bocia et al., 2013). Em relação às diferenças sexuais, os níveis periféricos de OT podem ser comparáveis entre homens e mulheres (Frijling, 2017). Entretanto, na sua síntese os resultados não são conclusivos. Dunamis & Veenema (2016) indicam que as fêmeas exibem geralmente uma maior expressão de OT, enquanto nos machos a expressão dos receptores é maior (Naja & Aoun, 2017).

Fisiologicamente, nas fêmeas, os principais alvos hormonais são as células mioepiteliais (canais alveolares na glândula mamária) na fase de lactância, e no parto por contração da musculatura do útero, enquanto nos machos são os órgãos reprodutivos masculinos (vesículas seminais e epidídimo) (Lozic & Ludwig, 2021; Naja & Aoun, 2017). A OT também está envolvida no comportamento de interação social, é crucial para a formação de vínculos de apego, na neurobiologia do comportamento do tipo materno, empatia e relacionamentos afetivos (Feldman, 2012). Suas propriedades ansiolíticas têm levado seu uso como alvo para intervenções socioemocionais em população psiquiátrica, principalmente por administração intranasal (Naja & Aoun, 2017; Feldman, 2012).

Em ratos, a OT tem sido principalmente estudada no comportamento social na circuitaria do córtex pré-frontal medial (CPFM), e sua participação com a serotonina na modulação de recompensa social por ação do núcleo accumbens (Dölen et al., 2013). Num estudo feito por Warfvinge et al. (2020) realizou-se um mapeamento de sua distribuição e sua expressão mais distinta foi encontrado no hipocampo, na ponte e na substância negra; e em regiões da amígdala e hipotálamo tanto OT quanto seus receptores. Uma disparidade entre o peptídeo e seu receptor foi observado principalmente no córtex cerebral, cerebelar (expressão OT) e no hipocampo (expressão de receptores OT).

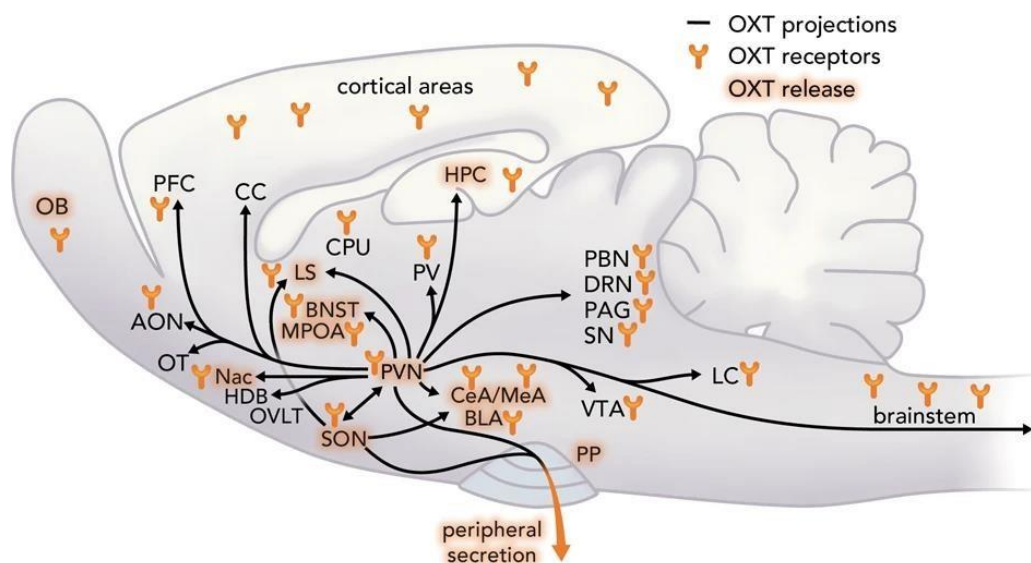


Figura 6. Vias de projeção de ocitocina e seus receptores

Tomada de: Grinevich & Neumann (2021)

Na figura anterior encontrasse as projeções neuronais de OT, seus receptores e locais de liberação. O esquema apresenta dados disponíveis tanto em machos quanto em fêmeas. Bulbo olfatório (OB), núcleo olfatório (AON), tubérculo olfatório (OT), córtex pré-frontal (PFC), córtex cingulado (CC), caudado putamen (CPu), septo lateral (LS), núcleo do leito da estria terminal (BNST), área pré-óptica (MPOA), núcleo accumbens (Nac), núcleo HDB do membro

horizontal da banda diagonal, organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), núcleo supraóptico (SON), núcleo paraventricular (PVN), núcleo periventricular do tálamo (PV), hipocampo (HPC), amígdala (CeA/MeA,BLA), pituitária posterior (PP), Núcleo parabraqueal (PBN), núcleo rafa dorsal (DRN), periaqueductal cinza (PAG), substância nigra (SN), área tegmental ventral (VTA), locus coeruleus (LC). Adaptado de Jurek & Neumann (2018).

Em estudos com humanos, tem se avaliado na tarefa de medo condicionado, a administração de OT intranasal antes do treino se associa com uma redução na aquisição precoce tanto para o aprendizado contextual quanto por pista, assim como uma menor resposta no núcleo accumbens; enquanto na aquisição tardia, os participantes que receberam OT mostraram um aumento da resposta no hipocampo durante o aprendizado contextual, mas não por pista (Cavalli et al., 2017). Isto indica que a OT poderia mediar a aquisição de um aprendizado. Entretanto, em humanos teria um efeito específico de modulação durante a aquisição (Hoge et al., 2019).

De fato, a ocitocina tem um papel importante na aquisição da memória, em estudos com ratos quando um antagonista de Atosiban (OT) foi infundido via i.p. após treino de memória contextual, prejudicou a consolidação da memória de medo de longo prazo, enquanto sua administração após uma sessão de reativação não gerou efeito algum (Rasie Abdullahi et al., 2018). Por outro lado, sua administração na amígdala também afeta a consolidação da memória do medo (Gunduz-Cinar et al., 2020; Campbell-Smith, 2015). Estes resultados sustentam que a OT é importante na consolidação, mas sua administração em dependência da dose também poderia prejudicá-la (Rasie Abdullahi et al., 2018).

Os resultados mais relevantes para o tratamento de TEPT mostraram que uma administração só de OT intranasal, atenuou a conectividade funcional da amígdala-ventromedial e o córtex pré-frontal ventrolateral em indivíduos que passaram por exposição recente de um evento traumático. Entretanto, sua administração repetida reduziu o desenvolvimento de sintomas subsequentes do TEPT (Frijling, 2017). Resultados corroborados com modelos animais para o estudo de vulnerabilidade ao TEPT. Uma intervenção a longo prazo com OT intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) mostrou uma redução das alterações no córtex pré-límbico e amígdala basolateral em animais submetidos ao estresse prolongado, desenvolvendo um fenótipo resiliente com atenuação da sintomatologia associada ao TEPT (Le Dorze et al., 2020).

Como citado anteriormente, a administração sistêmica de OT estaria ligada mais com um efeito ansiolítico que modula a resposta de medo condicionado. Em modelos animais seu efeito exógeno é similar com os mostrados em humanos. Embora estes seriam mediados pela dose ou concentração da substância. Evidências indicam que a OT reduz a resposta do tipo ansiosa quando administrada de forma periférica (0,01 e 0,1 µg/kg SC), mas não no sistema cerebroventricular (0,002 e 2.0 µg) (Ayers et al., 2011).

Assim, no condicionamento ao tom a infusão pré-treino de OT via i.c.v (ratos, 0,1 ou 1.0µg/5µl; camundongos, 0,1 ou 0.5 µg/2 µl) não afetou o condicionamento ao tom, mas acelerou a formação de memória de extinção, enquanto o uso de um antagonista pré-treino prejudicou a memória de extinção. Interessantemente, sua administração antes do treino de extinção prejudicou a formação da memória de extinção tanto em ratos quanto em camundongos (Toth et al., 2012).

Isto indica que OT participa da formação da memória de extinção, embora possa ter um efeito facilitador ou prejudicial. Em ratos, quando OT (0,3 mg/kg) subcutânea foi administrada após a sessão de reativação, ela prejudicou a reconsolidação atenuando a expressão de congelamento, com efeito, só na memória de longo prazo (Hou, et al., 2015). Embora este resultado não tenha sido encontrado em humanos, eles não parecem conclusivos. Numa tarefa de condicionamento, OT administrada após reativação da memória facilitou a formação da memória de extinção, numa sessão posterior (Hu et al., 2019), aqui poderia ser considerado que modulou a resposta no teste subsequente, sendo que em outro estudo quando OT foi administrada antes da sessão de extinção, não facilitou sua formação (Acheson, et al., 2013).

Em relação ao mecanismo de ação da OT na resposta de medo, o principal alvo estudado é a amígdala. Gunduz-Cinar et al. (2020) avaliaram em camundongos o efeito de OT na tarefa de condicionamento aversivo ao tom, OT foi infundida antes de sessão de extinção na ACe (0,01 ou 1µg) ou no ABL (0,01 e 0,01 µg/2 µl), eles encontraram que a dose menor de OT na ACe facilitou a memória de extinção, enquanto a dose maior prejudicou, já na ABL não teve efeito algum.

Um dos sistemas elucidados propõe que a administração de OT ativaria neurônios do AL, aumentando a inibição gabaérgica nas projeções PAG para neurônios de saída do AMe, gerando uma atenuação de resposta de medo contextual (Baldi et al., 2021). Optogeneticamente tem sido demonstrado que uma sub-população de neurônios de ocitocina para a amígdala suportam o engrama que facilita a evocação da memória de medo (Hasan, 2019).

A participação do hipocampo é relativamente recente no estudo dos efeitos da ocitocina, tendo sido feitas poucas descobertas nessa estrutura. O hipocampo participa do processamento neural da memória social, e que nos neurônios do CA2 são essenciais para a codificação, consolidação e reativação da memória (Watarai et al., 2021). Além disso, a OT reduz a inibição GABAérgica em várias estruturas neuronais, incluindo o hipocampo (Owen et al. 2013; Mitre et al., 2018). Outro fator para ser considerado é que a OT também está envolvida na liberação da resposta ao estresse. Ela participa da regulação para diminuir a resposta do eixo HPA (Love, 2018; Neumann et al., 2000; Wirth, 2015). O que corrobora que seus efeitos poderiam ser direcionados pelo eixo HPA, indicando que tanto a dose quanto a via de infusão deve ser

considerado (Missig et al., 2010).

Num estudo recente, em ratos condicionados ao tom, a OT foi injetada no hipocampo dorsal (HPCd) (10 ng/0,5 µl) e aumentou a atividade CA1-ventral e IL-Cx; enquanto durante a fase extinção, a liberação endógena de OT no HPCd foi registrada (Bazaz, 2022). Eles concluem que a injeção de OT exógena no HPCd se acompanhada do treinamento de extinção, aumenta a extinção do medo com diminuição da atividade do PrL-Cx.

Finalmente, o referencial teórico apresentado acima descreve vários tratamentos que foram utilizados neste trabalho, em conjunto, eles representam estímulos de valência gratificante ou recompensadora, tais como: as propriedades estimulantes do metilfenidato, o aumento da liberação do glicocorticóide durante o início do ciclo escuro, a apresentação de um co-específico familiar do sexo oposto, e os efeitos comportamentais da liberação da oxitocina. Assim, os resultados mencionados mostraram anteriormente os seus efeitos na redução da expressão do medo, mas sem registos na actualização da memória, utilizando os seus efeitos como um estímulo de contra-condicionamento durante a reativação de memórias aversivas.

Por conseguinte, para o desenvolvimento desta tese, foi levantada a hipótese de que a utilização destas intervenções durante a reativação da memória de medo levaria a uma reconsolidação da valência aversiva; um efeito de actualização associado principalmente pelas propriedades antiaversivas dos estímulos na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto; capaz de atenuar a memória do medo numa sessão de teste.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos de (i) metilfenidato (MFD) (ii) ciclo circadiano (iii) suporte sexual e (iv) ocitocina na reativação de memória aversiva em ratos que passaram pelo condicionamento aversivo ao contexto (CAC).

2.1. Objetivos específicos do capítulo I

- 2.1.1. Avaliar o efeito de MFD (3 e 10 mg/kg via i.p.) na reativação da memória aversiva.
- 2.1.2. Determinar se sucessivas reativações sob o efeito da administração de MFD (3 e 10 mg/kg) levam à reconsolidação da memória aversiva.
- 2.1.3. Verificar se o bloqueio dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L impede o efeito do MFD (3 e 10 mg/kg) sobre as reativações da memória.
- 2.1.5. Avaliar o efeito de MFD (3 e 10 mg/kg via i.p.) na aquisição e consolidação da memória de extinção.
- 2.1.6. Verificar se o efeito do MFD (3 e 10 mg/kg via i.p.) sobre as reativações da memória é dependente do tempo de administração.
- 2.1.7. Avaliar a resposta aditiva do MFD (3 e 10 mg/kg via i.p.) na preferência do lugar condicionado na tarefa de condicionamento de preferência de local.
- 2.1.8. Avaliar o efeito do MFD (3 e 10 mg/kg via i.p.) sobre a atividade locomotora na tarefa de campo aberto.

2.2. Objetivos específicos do capítulo II

- 2.2.1. Avaliar o efeito do ciclo circadiano na evocação da memória aversiva, através da sua reativação no ciclo claro e escuro.
- 2.2.2. Determinar se sucessivas sessões de reativação da memória no ciclo escuro levam à atenuação da memória.
- 2.2.3. Verificar se o treino de extinção no ciclo claro e escuro difere na consolidação da memória de extinção.
- 2.2.4. Verificar se a administração de um inibidor de glicocorticoides (metirapona) inibe o efeito de reativações periódicas da memória de medo no ciclo escuro.
- 2.2.5. Determinar se o treino da memória aversiva no ciclo claro e escuro difere na consolidação da memória.
- 2.2.5. Avaliar se a atividade locomotora na tarefa de campo aberto difere segundo o ciclo circadiano.

2.3. Objetivos específicos do capítulo III

- 2.3.1. Verificar se a exposição de uma fêmea – familiar ou nova, durante a janela de reconsolidação da memória de medo em machos leva a sua atenuação.
- 2.3.1. Determinar se a exposição de um macho – familiar ou novo, durante a janela de reconsolidação da memória de medo em machos leva a sua atenuação.
- 2.3.2. Verificar se a exposição de um rato macho – familiar, durante a janela de reconsolidação da memória de medo em fêmeas leva a sua atenuação.

2.3.3. Determinar o efeito da exposição de uma fêmea – familiar, durante uma sessão de extinção de medo em ratos machos.

2.3.4. Avaliar se os receptores D1/D5 no hipocampo participam do processo de atualização da memória aversiva em ratos machos expostos com uma fêmea familiar, durante a reativação da memória.

2.3.5. Avaliar se o bloqueio dos receptores de ocitocina no hipocampo suprime o efeito da atenuação da memória em ratos machos com uma fêmea familiar, durante a reativação da memória.

2.4. Objetivos específicos do capítulo IV

2.4.1. Avaliar o efeito da infusão de ocitocina no hipocampo na aquisição da memória aversiva em machos (0,033 µg/µL ou 0,07 µg/µL.) e em fêmeas (0.033 µg/µL).

2.4.2. Verificar se a infusão pós treino de ocitocina (0.033 µg/µL) no hipocampo gera algum efeito na consolidação da memória de curto prazo.

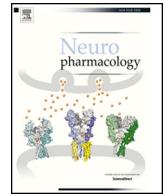
2.4.3. Avaliar o efeito da infusão de ocitocina (0.033 µg/µL) no hipocampo após uma sessão de reativação.

2.4.4. Determinar se a administração de ocitocina (0.033 µg/µL) no hipocampo pré ou pós-treino de extinção, gera algum efeito na memória de extinção.

3. CAPÍTULO I

**Rewarding information presented during reactivation attenuates fear memory:
Methylphenidate and fear memory updating.**

Artigo publicado na revista Neuropharmacology



Rewarding information presented during reactivation attenuates fear memory: Methylphenidate and fear memory updating



Angel David Arellano Pérez^{a,b}, Bruno Popik^{a,b}, Lucas de Oliveira Alvares^{a,b,*}

^a Laboratório de Neurobiologia da Memória, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

HIGHLIGHTS

- Methylphenidate has rewarding properties and induces place preference.
- Fear memory reactivation under effect of methylphenidate attenuates fear expression.
- Methylphenidate impairs fear retrieval.

ARTICLE INFO

Keywords:

Methylphenidate
Fear memory
Memory updating
Reconsolidation
Extinction

ABSTRACT

In the last decade it became clear that a previously consolidated memory can be modified during the plastic state induced by retrieval. This updating process opens the possibility to adapt undesired memory. Here we investigated whether fear memory could be updated to less-aversive/positive level by inserting hedonic information during retrieval. Considering that methylphenidate has strong rewarding propriety, we injected 3 or 10 mg/kg pre or post-reactivation in rats previously trained in contextual fear conditioning. We found that memory reactivation under effect of methylphenidate attenuates fear memory within-session and in subsequent tests in a drug-free condition, without presenting spontaneous recovery. Interestingly, methylphenidate impaired memory extinction when injected before, but not after a long reactivation session. We also showed that methylphenidate induces place preference and increases motor activity. Thus, this study provides new insights in the memory updating process and suggests that a previously consolidated fear memory can be attenuated by inserting appetitive information during retrieval.

1. Introduction

Strong emotional experiences can lead to the formation of enduring traumatic memories, which are at the core of the development of psychiatric disorders such as posttraumatic stress disorder (PTSD) and phobias (Parsons and Ressler, 2013). These pathological memories present a high prevalence and cause a tremendous social and economic burden (American Psychiatric Association, 2013; Brewin, 2011; Sareen, 2014). Extinction-based therapies and pharmacological treatments are the most common interventions to attenuate these pathological memories (Jonas et al., 2013), but a significant proportion of patients are not responsive to these approaches (Berger et al., 2009; Vervliet et al., 2013), presenting return of fear symptoms or resistance in their response to treatment (Kindt, 2018). Moreover, extinction-based therapy does not erase the original fear memory, which may reemerge

spontaneously with the passage of time (Archbold et al., 2010; Bouton, 2002).

A well-established memory can enter into a labile, plastic state following retrieval, becoming susceptible to interventions (De Oliveira Alvares et al., 2013; Nader et al., 2000). This process, known as reconsolidation, allows a previously consolidated memory to be updated (Alberini, 2011; Bonin and De Koninck, 2015; Nadel et al., 2012; Nader et al., 2000; Nader and Einarsson, 2010). Moreover, it opens a window of opportunity to modify an unwanted memory such as those underlying traumatic experiences. In the last decade, several studies have shown that a fear-related memory can be attenuated by interfering pharmacologically following memory reactivation (Beckers and Kindt, 2017), so that the labile state induced by retrieval would be disrupted by the drug treatment, preventing memory restabilization. For instance, a contextual fear memory can be attenuated by injecting anisomycin

* Corresponding author. Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, sala 210, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: lucas.alvares@ufrgs.br (L. de Oliveira Alvares).

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108107>

Received 7 November 2019; Received in revised form 7 April 2020; Accepted 12 April 2020

Available online 16 April 2020

0028-3908/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

after retrieval, since memory reconsolidation requires protein synthesis to be restabilized (Nader et al., 2000).

It has been suggested that this reconsolidation-based approach acts directly on the original memory trace, instead of creating a new memory as in extinction, thus, fear attenuation by reconsolidation interference is more effective and long-lasting than extinction (Beckers and Kindt, 2017). However, most of the pharmacological agents used to inhibit reconsolidation are toxic and cannot be readily used in humans, such as protein synthesis inhibitors or NMDA antagonists (Lee et al., 2006; Beckers and Kindt, 2017). Alternatively, another way to modify memory following reactivation is to change its content -or strengthening the plastic period induced by retrieval (De Oliveira Alvares et al., 2013). For instance, a contextual fear memory could be updated with the incorporation of positive information while memory is in the label state induced by reactivation (context reexposure), in a process known as counterconditioning (Pearce and Dickinson, 1975; Richardson et al., 1982).

In this way, the previous aversive content associated with the context would be rewritten to include positive information, updating it to a positive/less aversive form. Indeed, it has been shown that appetitive substances such as chocolate, fruit-loops cereal, or caffeine, contingent on reactivation updates a context previously associated with a footshock, making this context much less aversive even in the absence of the appetitive stimuli in subsequent reexposures (Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018).

Methylphenidate (MPH) is a psychostimulant drug used worldwide as the first-line treatment for Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). MPH acts inhibiting the dopamine and noradrenaline reuptake through DAT and NET inhibition (McDonald et al., 2017; Shimizu et al., 2019), and enhances memory acquisition (Carmack et al., 2014a) and extinction (Abraham et al., 2012). MPH presents prominent rewarding properties. For instance, it induces self-administration, conditioned place preference (CPP) and behavioral sensitization (Carmack et al., 2014b; Peña et al., 2011; Wooters et al., 2011). Moreover, MPH increases the dopamine levels in the striatum and nucleus accumbens (NAc) (Briars et al., 2016; Shimizu et al., 2019).

In the present study, we hypothesized that using a drug with significant hedonic property such as MPH concomitant with the labile state induced by retrieval would integrate those positive information in the background of a fear conditioned memory, so that it would be updated to a less aversive level and thus, reduce fear response to fear-associated reminders.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male *Wistar* rats (2–3 months old, weighing approximately 300 g) from CREAL at Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) were used for all the experiments. They were housed in Plexiglas boxes, 4 animals *per* cage. Animals were kept on 12:12 light/dark cycle under controlled temperature (21 °C ± 2), with food and water available *ad libitum*. All the procedures followed the Brazilian ethical guidelines for animal research.

2.2. Drug

Methylphenidate hydrochloride (MPH) (Ritalin®, Novartis farmaceutica, Brazil) was pulverized and dissolved in saline solution (0,9% NaCl) to obtain a final concentration of 3 and 10 mg/mL. Saline (control group) or MPH solution were administered intraperitoneally (i.p.) in the same volume (1 mL/kg). Nimodipine, an antagonist of the L-type voltage-gated calcium channels (LVGCCs) was dissolved in sterile isotonic saline solution to a concentration of 16 mg/mL. Nimodipine or its vehicle was injected intraperitoneally at a volume of 1 mL/kg (16 mg/kg) 30 min before memory reactivation.

2.3. Contextual fear conditioning (CFC)

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25 × 25 cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart). One day before conditioning, animals were exposed to the conditioning chamber for 5 min. In the training session, rats were placed in the conditioning chamber for 3min before receiving two 2-s, 1-mA footshocks separated by a 30-s interval; they were kept in the conditioning context for an additional 30-s before returning to their home cage. In the reactivation/extinction session, 48 h after training, animals were re-exposed to the same conditioning chamber (one or three times) without the footshock, for 4, 12 or 40min. In the test, animals were re-exposed in the same context for 5min 24 h after the last reactivation session. In some experiments, a second test was performed 20 days after the first test in order to check for spontaneous recovery. MPH was injected 10 or 30 min before each reactivation session.

2.4. Conditioned place preference (CPP)

The place preference apparatus consists of three interconnected chambers, two for conditioning with same dimensions (24 × 40 × 50 cm), and a central/starting chamber (10 × 40 × 50 cm). Each chamber was adapted with particular contextual cues and floor texture. The central chamber communicated the conditioning compartments with removable doors (10 × 14 cm).

Conditioned place preference consisted of three phases: pre-conditioning (day 1), conditioning (days 2–6) and test (day 7). In the pre-conditioning, rats were allowed to explore the entire apparatus for 15 min. The time spent in each compartment was analyzed in order to determine baseline preference for any chamber. In the case of individual pre-conditioning preferences, the conditioning took place in the opposite chamber. Conditioning trials occurred over five consecutive days, where MPH or saline were paired with its specific compartment, counterbalanced across the rats. All animals were submitted to two conditioning sessions a day with interval between 5 and 7 h, where methylphenidate (3 mg or 10 mg/kg) or vehicle (saline) were administered intraperitoneally 10 or 30 min before each conditioning session and placed in its correspondent chamber for 30 min. In the test (day 7), animals were allowed to explore the entire apparatus for 15 min in the absence of vehicle or MPH, and the time spent in each compartment was assessed. A preference index was used as follows: MPH-paired chamber/MPH-paired chamber + vehicle-paired chamber).

2.5. Behavioral measurement

Freezing behavior was used as a memory index, being registered with a stop watching real time by an experienced observer that was unaware of the experimental conditions. Freezing was defined as total cessation of all movements except those required for respiration (Blanchard and Blanchard, 1969).

2.6. Open field

Locomotor activity was assessed in the open field chamber, of 49 cm height, and 60 × 60 cm of walls, the box made of wood counted on distinct visual cues in the walls, floor was divided into 25 equal rectangles or “sectors”. During the experiment, a low-intensity light of 25 lux was equally distributed into the chamber. The behavior was recorded by video tracking and processed offline.

Animals received vehicle or MPH 10 or 30-min before the open field exposition. During the 15-min test session, crossings between sectors (locomotor activity) was measured, as well as, the time spent in the periphery and center of the apparatus.

2.7. Statistical analysis

The data were expressed as mean \pm SEM. The statistical analyses were performed using one sample *t*-test, unpaired *t*-test, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc test when necessary. All data used the confidence level of 95% and the values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. All experiments were randomized and performed blindly.

3. Results

3.1. Methylphenidate temporarily inhibits fear expression

Memory reactivation may enter into a labile state, where new information can be inserted in the background of a consolidated memory. Considering that MPH has rewarding properties, we hypothesized that injecting MPH during memory reactivation would insert appetitive information, updating a previously acquired fear memory to a positive/less aversive level. In order to address this possibility, rats were trained in a contextual fear conditioning task. Two days later, they received a systemic injection of MPH (3 or 10 mg/kg) or its vehicle 10 min before reactivation. In the following day, animals were tested (Fig. 1A).

During reactivation, the dose of 10mg/kg of MPH, but not 3 mg/kg, decreased the freezing levels compared to the control group (One-way ANOVA: $F_{(2,21)} = 5.688$; $P = 0.01$; SNK post hoc: vehicle group vs 3 mg/kg, $P = 0.12$; vehicle group vs 10 mg/kg, $P = 0.002$) (Fig. 1B). However, this effect was not observed in the test session in a drug-free condition (One-way ANOVA: $F_{(2,21)} = 3.46$; $P = 0.0502$) (Fig. 1C). This result suggests that the higher dose of MPH inhibits fear expression, but does not update fear memory permanently. Next, we evaluated the effect of the drug infused immediately after reactivation (Fig. 1D). One-way ANOVA revealed no difference in both reactivation ($F_{(2,15)} = 2.395$; $P = 0.13$) and test session ($F_{(2,15)} = 0.4015$; $P = 0.68$) (Fig. 1E–F).

In order to verify whether the MPH injection without reactivation could affect the subsequent test 24 h later, we fear conditioned a new set of animals as described above, but the MPH or vehicle were injected without reactivation. We found no difference in the test (Fig. 1G–H; One-way ANOVA: $F_{(2,16)} = 0.06907$; $P = 0.93$).

3.2. Periodical reactivations under effect of MPH lead to the attenuation of fear memory

It has been shown that a single reactivation may be not enough to update fear memory, requiring periodical sessions in order to enable the integration of new appetitive information and reduce fear expression (Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018). Then we asked whether increasing the number of reactivation sessions under effect of MPH would enable memory updating. Thus, animals were fear conditioned and subjected to three reactivation sessions before being tested (Fig. 2A).

Over the course of reactivations, both groups (3 and 10 mg/kg) presented a lower freezing level in comparison to the control group (Two-way ANOVA: interaction $F_{(4,36)} = 1.923$, $P = 0.13$; time $F_{(2,18)} = 4.375$, $P = 0.02$; treatment $F_{(2,36)} = 57.68$ $P < 0.0001$). SNK post hoc revealed that the 10 mg/kg group expressed a lower freezing response in every reactivations whereas the 3 mg/kg group showed a lower freezing level in the second and third session compared to controls ($P < 0.05$) (Fig. 2B).

In the test, both MPH treated groups presented a lower freezing response in comparison to the controls (One-way ANOVA, $F_{(2,19)} = 4.085$, $P = 0.035$; followed by SNK post hoc test: vehicle group vs 3 mg/kg, $P = 0.032$; vehicle group vs 10 mg/kg, $P = 0.033$). To verify whether this fear reduction was long lasting, animals were retested 20 days later in order to check for spontaneous recovery. Both MPH treated groups kept expressing a lower freezing levels in the spontaneous recovery test compared to the control group (One-way

ANOVA, $F_{(2,19)} = 6.615$, $P = 0.006$; followed by SNK post hoc: vehicle group vs 3 mg/kg, $P = 0.03$; vehicle group vs 10 mg/kg, $P = 0.002$) (Fig. 2C).

Several evidence has shown that activation of LVGCC is necessary for destabilization of reactivated memory (Suzuki et al., 2008; Lee and Flavell, 2014; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015; Popik et al., 2020). That is, blocking this target before reactivation prevents memory updating (De Oliveira Alvares et al., 2013; Haubrich et al., 2015). Then, the next experiment aimed at understanding whether the MPH effect is mediated by memory updating/reconsolidation. Animals were fear conditioned as described above, but the LVGCC antagonist nimodipine (16 mg/kg) was injected 30 min before each reactivation (Fig. 2D). Only 10 mg/kg group expressed a lower freezing response in every reactivations session compared to the others groups (Two-way ANOVA; interaction $F_{(6,63)} = 0.5683$, $P = 0.75$; treatment $F_{(2,21)} = 2.659$, $P = 0.09$; time $F_{(3,63)} = 18.64$, $P < 0.0001$; followed by SNK post hoc, $P < 0.05$). In the test, no difference was observed among the groups (Fig. 2F; One-way ANOVA, $F_{(3,28)} = 0.8551$, $P = 0.48$) (Fig. 2E–F).

In order to dissociate the MPH effect in memory updating (that is, the integration of the rewarding properties of MPH into a background fear memory) and a possible direct pharmacological inhibition of memory reconsolidation, we subjected a new batch of animals to the same protocol, except that the drug injection was administered immediately after reactivation (Fig. 2G).

In the second reactivation, the higher dose group expressed a lower freezing level compared to the controls (Two-way ANOVA; interaction $F_{(4,42)} = 2.176$, $P = 0.088$; time $F_{(2,21)} = 5.561$, $P = 0.011$; treatment $F_{(2,42)} = 5.161$, $P = 0.009$; followed by SNK post hoc, $P < 0.05$). No difference was found in the test and spontaneous recovery (One-way ANOVA; $F_{(2,22)} = 2.679$; $P = 0.09$ and $F_{(2,22)} = 2.156$; $P = 0.14$, respectively) (Fig. 2H–I). Taken together, these results suggest that animals require to be reactivated under MPH effect in order to update memory.

Next, we wondered whether the MPH effects would also be observed combining the three reactivation into a single, long-lasting reactivation session. Thus, animals were trained and exposed to a single 12 min reactivation (Fig. 2J). Fear reduction was limited in the reactivation (Two-way ANOVA, interaction $F_{(4,36)} = 0.07421$, $P = 0.99$; time $F_{(2,18)} = 2.31$, $P = 0.13$; treatment $F_{(2,36)} = 24.75$, $P < 0.0001$; SNK post hoc revealed that the 10 mg/kg, but not the 3 mg/kg dose, expressed a lower freezing expression in all timepoints compared to the vehicle group ($P < 0.05$). In the test, no difference was found (One-way ANOVA; $F_{(2,17)} = 0.9544$; $P = 0.4$) (Fig. 2K–L). This result suggests that three separate reactivations are more effective than a single combined one in order to update memory.

3.3. MPH impaired acquisition of extinction memory

We next investigated whether MPH affects fear extinction. Then, animals were fear conditioned and, 48 h later, subjected to a 40-min extinction session. 10 min before extinction, animals were treated with MPH (3 or 10mg/kg) or vehicle (Fig. 3A). The higher MPH dose expressed a lower freezing level in the 1–5 and 5–10 min interval compared to controls (Two-way ANOVA; interaction $F_{(14,112)} = 0.5789$, $P = 0.876$; time $F_{(7,56)} = 1.83$, $P = 0.099$; treatment $F_{(2,112)} = 11.66$, $P < 0.0001$; followed by SNK post hoc, $P < 0.05$) (Fig. 3B). In the test, the MPH 3 mg/kg group expressed a higher freezing level compared to the controls (One-way ANOVA; $F_{(2,21)} = 4.654$, $P = 0.02$; SNK post hoc; vehicle group vs 3 mg/kg, $P = 0.01$) (Fig. 3C). Together, these results suggest that MPH 3 mg impairs the acquisition of extinction memory.

Next, we evaluated the effect of MPH in the extinction consolidation, by treating animals immediately after the extinction session (Fig. 3D). No difference was found neither in the extinction session among the groups (Two-way ANOVA; interaction $F_{(14,112)} = 0.4576$,

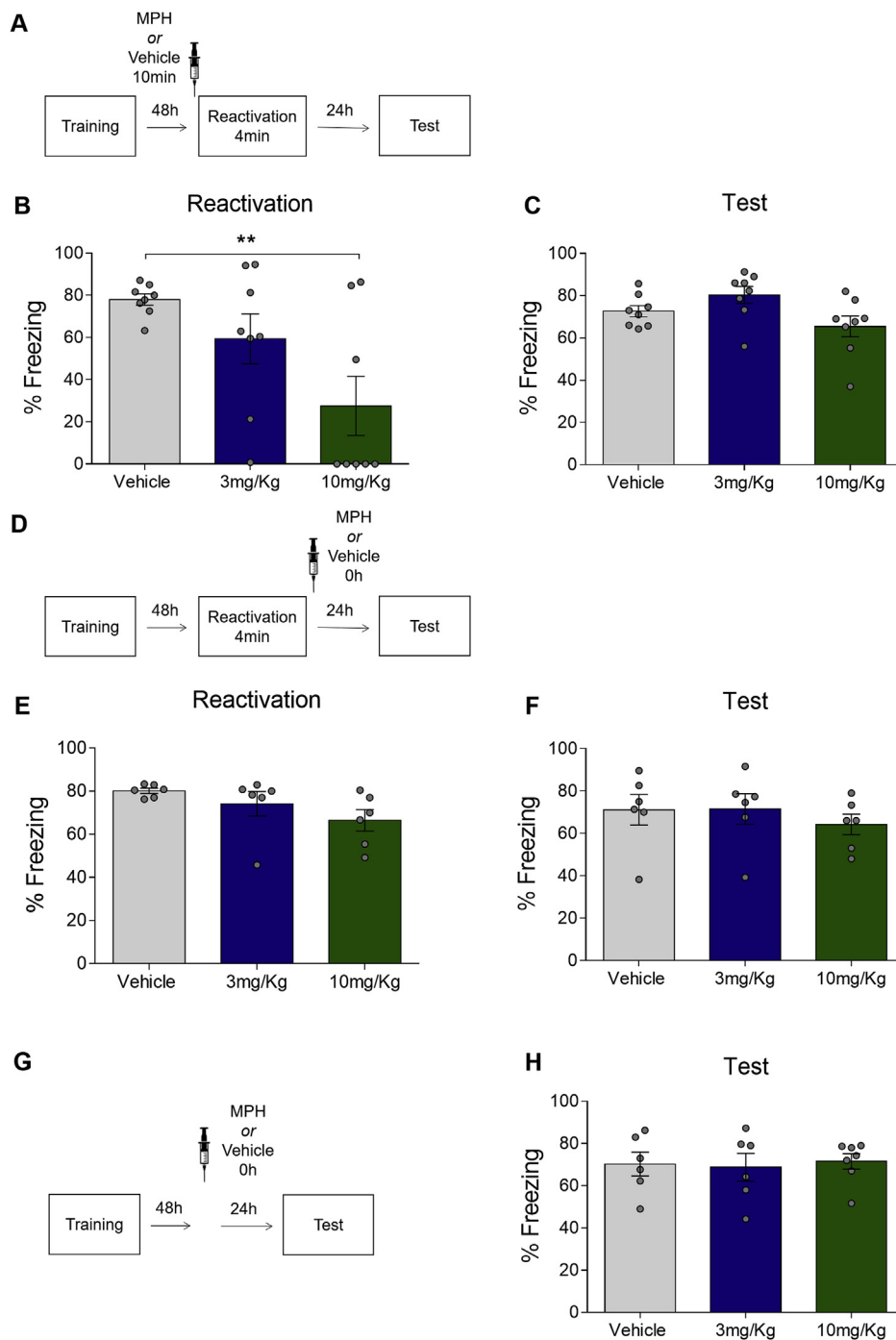


Fig. 1. Methylphenidate temporarily inhibits fear expression. (A) Experimental design. (B) During the reactivation session, freezing levels were reduced by MPH 10 mg/kg when compared to the vehicle group. (C) Test session, no difference was observed among the groups. (D) Experimental design. (E) No difference was observed in either the reactivation or (F) test. (G) Experimental design. (H) Test session, no difference was observed among the groups. Bars represent mean \pm SEM. ** $p < 0.005$.

$P = 0.95$; time $F_{(7,56)} = 40.23$, $P < 0.0001$; treatment $F_{(2,112)} = 4.140$, $P = 0.01$ nor in the test (One-way ANOVA; $F_{(2,26)} = 0.9550$; $P = 0.39$) (Fig. 3E and F).

3.4. MPH induces conditioned place preference and increases motor activity

It has been shown that a fear memory may be reinterpreted by the insertion of rewarding stimuli concomitant with reactivation, such as chocolate, fruit loops, or caffeine (Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018). We hypothesized that the MPH effect in reducing fear expression

could be caused by its possible hedonic properties during reactivations. Considering that conditioning place preference (CPP) has been largely used to evaluate drug rewarding properties in rats, we tested whether MPH in the same doses used above induces CPP. Then, animals were subjected for 5 conditioning days, where they received MPH or saline 10 min before being exposed to the contexts. One day later, they were tested in a drug-free condition (Fig. 4A). One Sample t -test showed that both 3 mg ($T_{(9)} = 4.174$; $P = 0.002$) and 10 mg MPH group ($T_{(8)} = 4.714$; $P = 0.001$), but not the vehicle group conditioning ($T_{(10)} = 1.250$; $P = 0.24$) spent more time in the conditioning chamber

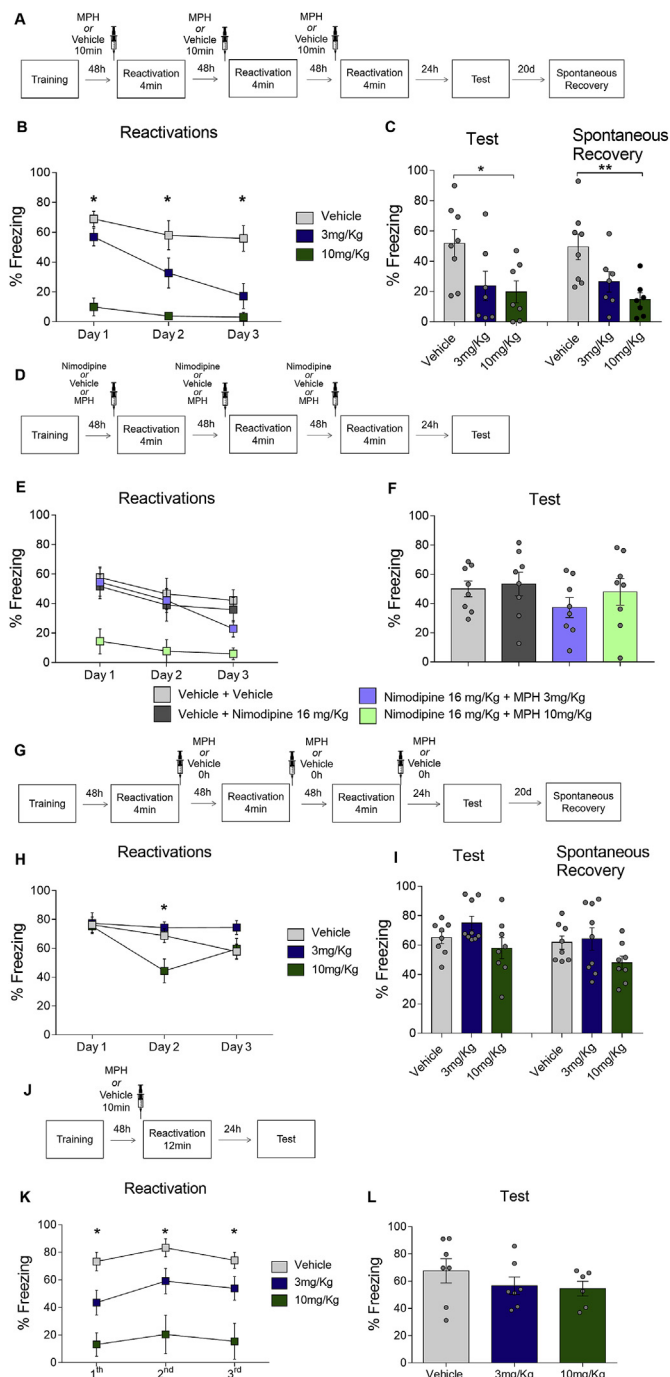


Fig. 2. Periodical reactivations under effect of MPH lead to the attenuation of fear memory. (A) Experimental design. (B) Freezing levels were reduced by MPH when compared to the vehicle group. (C) MPH 3 and 10 mg/kg showed a lower freezing level in the test and Spontaneous recovery. (D) Experimental design. (E) Only the group Nimodipine + MPH 10 mg/kg showed a lower freezing level in the reactivations. (F) No difference was observed among the groups in the test session. (G) Experimental design. (H) Reactivations sessions: MPH 10 mg/kg inhibited temporally the fear expression in the second day. (I) No difference was observed among the groups in the test session and Spontaneous recovery test. (J) Experimental design. (K) Reactivation sessions are divided in three blocks (4 min each), MPH 10 mg/kg shows a lower freezing expression compared to the control group. (L) Test session, no difference was observed among the groups. Bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

compared to chance levels of 50%. Further analysis have shown that the 10 mg/kg, but not 3mg/kg spent more time in the conditioning compartment compared to the vehicle group (One-way ANOVA; $F_{(2,27)} = 3.437$; $P = 0.04$; SNK post hoc: vehicle group vs 3 mg/kg, $P = 0.12$, vehicle group vs 10 mg/kg, $P = 0.03$) (Fig. 4B) These results suggest that MPH induces place preference in both doses, predominantly in the higher one.

It has been shown that the incapacity to express fear behavioral through an active distractor during freezing response produces a persistent decrease in fear response in subsequent tests even in the absence of the distractor (Crestani et al., 2015). Considering that there is several evidence showing that MPH produce a dose dependent increase in the motor activity (Gerasimov et al., 2000; Yang et al., 2006), it is reasonable to predict that the increase in the motricity during reactivation leads to a decrease in freezing behavior. To test this prediction, we next evaluated whether the MPH doses used in the present study affect motor activity. Then, animals were treated with MPH or vehicle 10 min before being exposed to an open field (OF) arena (Fig. 4C). Animals treated with the higher MPH dose increased the number of crossings compared to the control group (One-way ANOVA; $F_{(2,17)} = 12.48$; $P = 0.0005$; SNK post hoc: vehicle group vs 3 mg/kg, $P = 0.45$, vehicle group vs 10 mg/kg, $P = 0.0002$) (Fig. 4D).

We also measured the time spent in the periphery in order to evaluate whether MPH could affect anxiety-like behavior. One-way ANOVA revealed no difference among the groups ($F_{(2,17)} = 1.57$; $P = 0.236$) (Fig. 4E). Taken together, these results suggest that MPH, especially the higher dose induces both place preference and an increase in motor activity, suggesting that both effects may contribute to the fear reduction effect.

It has been shown that psychostimulants may present a distinct affective state, in which initially promotes a positive state followed by and aversive state. Then, we verified whether MPH would induce place preference if injected earlier. Thus, animals were trained as described above, but the MPH was administered 30 min before being exposed to the context. We found no place preference in this pretreatment time point (Unpaired t -test, $T_{(10)} = 1.672$; $P = 0.13$) One Sample t -test; vehicle group $T_{(5)} = 1.808$; $P = 0.13$ and 10 mg MPH group $T_{(5)} = 0.3821$; $P = 0.72$) (Fig. 4F–G).

The above experiment suggests that MPH does not promote a hedonic state 30 min after its administration. Then, we predicted that MPH injected 30 min before memory reactivation would not reduce fear expression. Thus, a new set of animals were trained exactly as in Fig. 2A, except that MPH was injected 30 min before each reactivation (Fig. 4H). Over the course of reactivations, 10 mg/kg group presented a lower freezing level in comparison to the control group (Two-way ANOVA: interaction $F_{(4,36)} = 0.7502$, $P = 0.56$; time $F_{(2,18)} = 5.284$, $P = 0.01$; treatment $F_{(2,36)} = 16.72$, $P < 0.0001$; followed by SNK post hoc, $P < 0.05$). However, no difference was found in the test (One-way ANOVA; $F_{(2,17)} = 0.2584$; $P = 0.78$) (Fig. 4I–J).

4. Discussion

The main finding of the present study shows that the reactivation under effect of methylphenidate administration is able to reduce freezing expression, possibly by updating memory to a less aversive level. This effect was found when MPH was injected before reactivation, but not immediately after (Fig. 2C,I). Moreover, it was necessary three sessions in order to update fear memory. The rewarding property of MPH showed in the CPP experiment (Fig. 4B), suggests that the updating effect might be due to the integration of hedonic information with a fear, negative background memory.

In the last decade, it became clear that memory may enter into a labile state during retrieval, in which the original memory can be weakened, strengthened or updated by the integration of new information (De Oliveira Alvares et al., 2013; Kwapis et al., 2017; Lee, 2010, 2008). Thus, the new piece of information is incorporated by

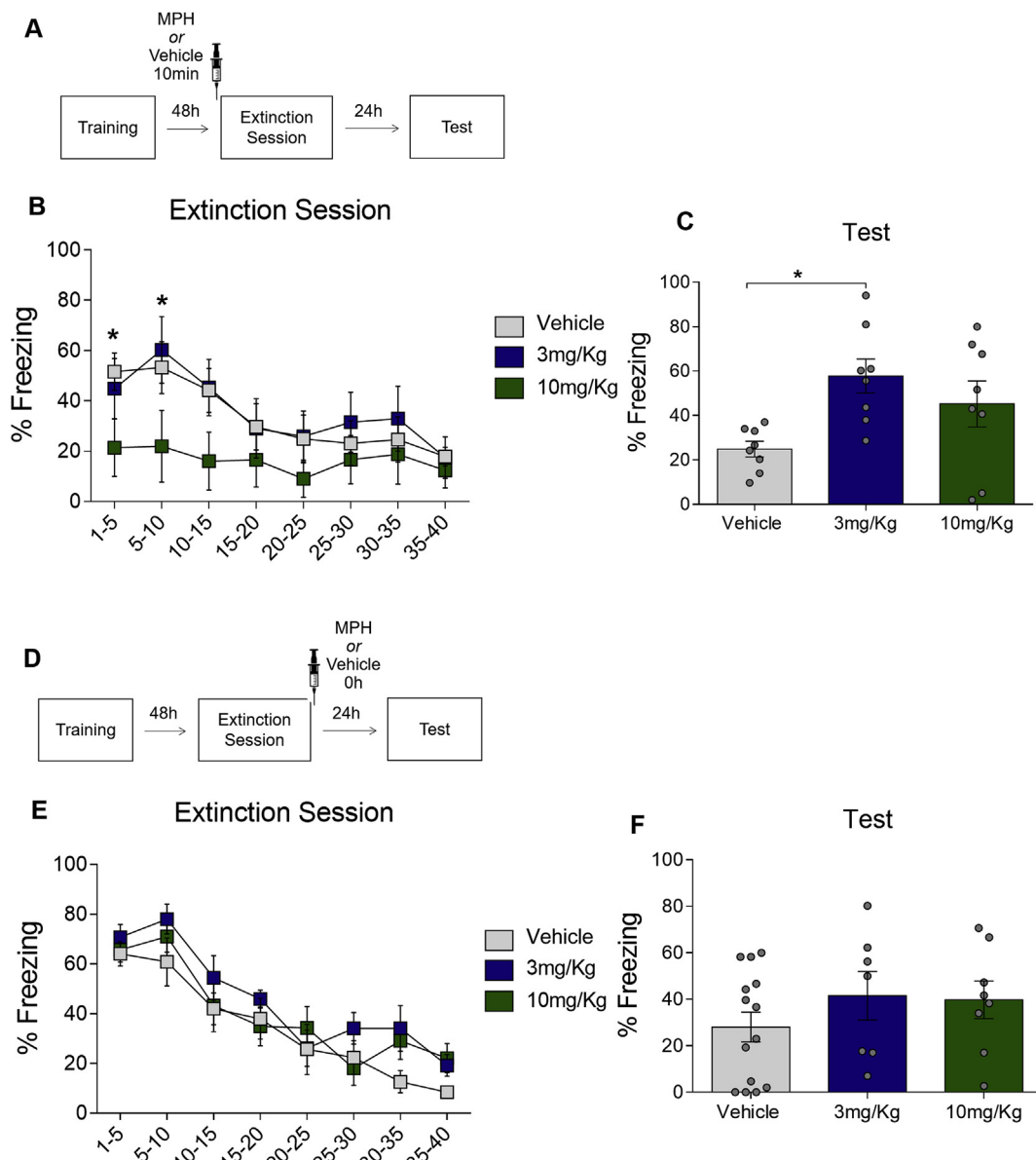


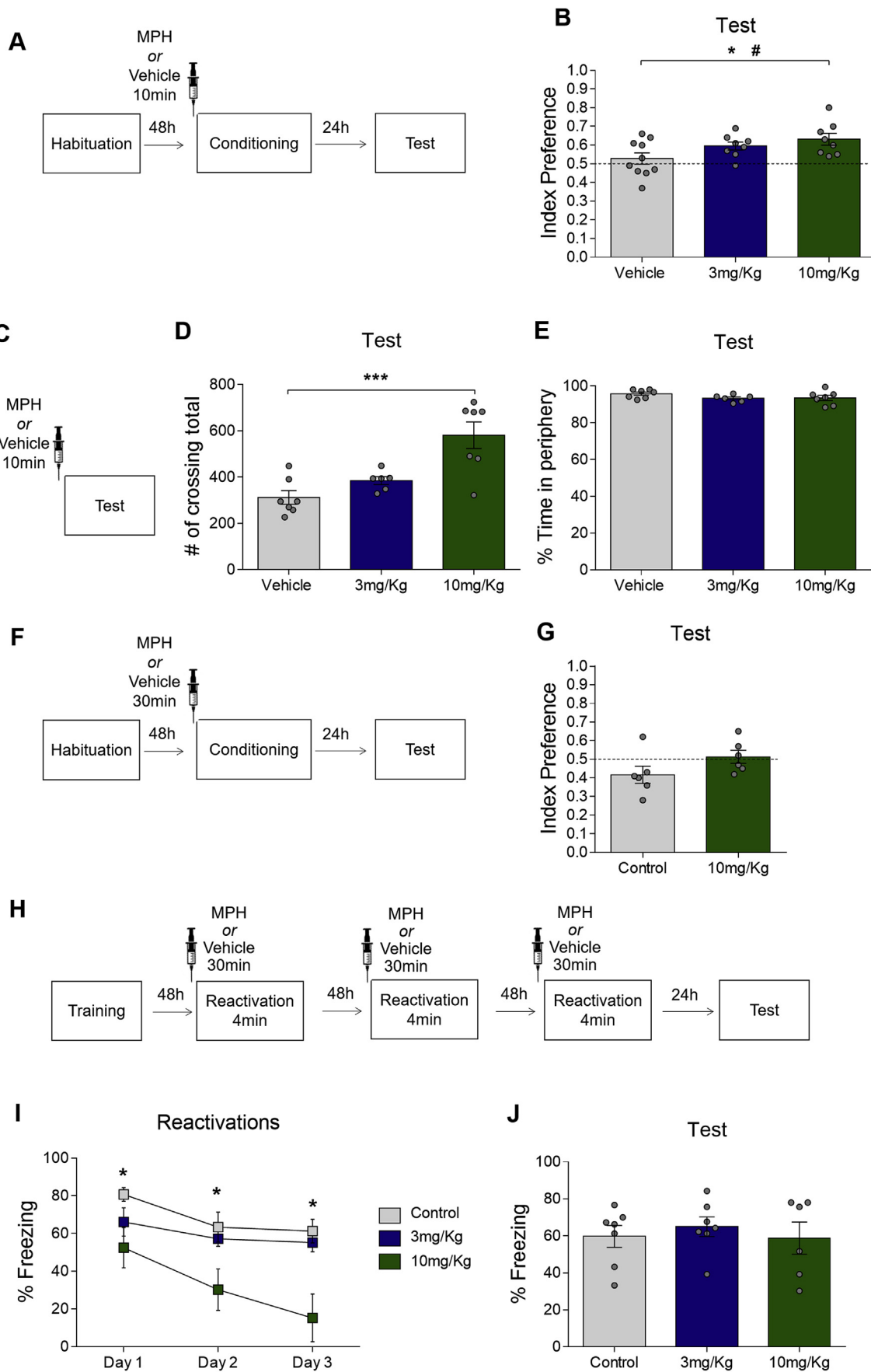
Fig. 3. MPH impaired acquisition of extinction memory. (A) Experimental design. (B) Extinction session is expressed in blocks of 5min, MPH 10 mg/kg shows fear reduction during the first two blocks. (C) Test session, MPH 3 mg/kg expressed a higher freezing level compared to controls. (D) Experimental design. (E) No difference was observed among the groups during extinction and (F) Test session. Bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

memory during reactivation, becoming part of it. Particularly, recent studies have demonstrated that contextually fear conditioned rats could update fear memory by providing positive emotional stimulus such as fruit-loops cereal, chocolate or caffeine during retrieval (Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018). Then, animals no longer express a high freezing response when reexposed to the same conditioned context. Interestingly, in all cases, it was necessary multiple reactivation in order to enable memory updating, suggesting that this kind of memory change takes place gradually. Accordingly, the acquisition of an appetitive learning usually also requires multiple training sessions. Here, we used a drug that have strong rewarding characteristic as a potential agent to modify a previously acquired fear memory. It has been shown that MPH increases the dopamine levels in the nucleus accumbens (Quansah and Zetterström, 2019; Shimizu et al., 2019), induces self-administration (Botly et al., 2008; Peña et al., 2011), place preference (Carmack et al., 2014b; Wooters et al., 2011), and behavioral sensitization (Askenasy et al., 2007). In order to confirm those findings, we subjected animals to conditioning place preference. We found that both

3 and 10 mg/kg induce place preference, particularly the higher dose (Fig. 4B). This finding converges with the abovementioned studies using other appetitive stimuli showing that hedonic stimulus provided concomitant with fear reactivation memory attenuates fear expression even in a drug-free subsequent test. It is possible that the freezing reduction found in contextual fear conditioning has limitation on discrete cue conditioning, since the contingency between the MPH effect and the cue will be less precise.

It is important to note that the 10 mg/kg MPH dose decreased fear expression within-session in every experiment in which it has been injected before reactivation (Fig. 1B; 2 B, K; 3 B). It may be caused by the increase of the motor activity (shown in the open field experiment, Fig. 4D). These results are consistent with previous studies (Carmack et al., 2014b; Koda et al., 2010), that have demonstrated that this effect regarding locomotor activity is present especially with doses higher than 5 mg.

It has been recently shown that the proper fear expression itself is important to the maintenance of fear memory (Crestani et al., 2015).



(caption on next page)

Fig. 4. MPH induces conditioned place preference and increases motor activity. (A) CPP experimental design. (B) Animals preferred the compartment paired with MPH 3 and 10 mg/kg. The higher MPH dose spent more time in the conditioned compartment compared to the control group. (C) Open field experimental design. (D) MPH 10 mg/kg increased the motor activity compared to the control group. (E) No difference in time spent in the periphery was observed among the groups. (F) CPP experimental design. (G) MPH do not induce place preference if injected 30min before exposed to the context. (H) Experimental design. (I) Reactivations sessions: MPH was injected 30min before each reactivation sessions, 10 mg/kg group shows a lower freezing expression compared to the control group. (J) No difference was observed among the groups in the test session. Bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$ compared to control, # $p < 0.05$ compared to 0.5 preference index.

That is, if animals are distracted during freezing behavior (so that they cannot freeze properly), it affects subsequent fear retrieval, making animals express lower freezing levels in further tests. This result suggests that there is a feed-forward loop between fear expression and fear memory maintenance. Thus, if fear response cannot be expressed during retrieval, it affects the way memory is reconsolidated. Indeed, Thomas et al. (2017) have demonstrated that the propranolol administration before, but not after memory reactivation reduces fear expression. Considering that propranolol blocks the physiological responses such as heart rate and the general sympathetic response during retrieval, it may, at least in part, explain the reason why it was more effective in reducing fear memory expression in a subsequent, drug-free test compared to post reactivation treatment. Thus, the fact that MPH affects memory expression by disrupting freezing behavior (by increasing motor activity) could also contribute to the fear reduction outcome in the following tests.

It is possible that our results in attenuating fear expression following memory reactivation under the effect of MPH is mediated by counter-conditioning, in which the negative affective states caused by fear conditioning can be modified by providing positive hedonic stimulus during retrieval. Although the CPP and OF experiments offer two possible reasons underlying the fear reduction promoted by the periodically reactivation under effect of MPH (memory updating through the incorporation of hedonic information and the inability to properly express fear by the increase of motor activity), we cannot completely dissociate the contribution of each factor. The fact that MPH injection 30 min before still affects motor activity (data not shown) without inducing CPP (Fig. 4G) or reducing fear expression in the test (Fig. 4J) suggests that the counterconditioning contribution is more significant than the increased motor activity. Another study has found fear reduction injecting the D1/D5 agonist SKF before or after reactivation, as well as place preference and increase of motor activity (Abraham et al., 2016). In both cases, the fact that dopamine is closely involved in reward, locomotion, and memory makes any interpretation of changes in behavior challenging, and limits a clear dissociation among those components.

One could argue that MPH is actually facilitating fear extinction instead of updating fear memory, since MPH is a general cognitive enhancer. Indeed, MPH has been shown to enhance extinction in mice (Abraham et al., 2012). Although this possibility cannot be excluded, we believe that it may be not the case, since we would expect spontaneous recovery if our fear reduction was mediated by extinction (Alberini, 2011), however, even tested 20 days after the test, there was no fear recovery. In addition, we did not find any extinction enhancement by MPH administration when we tested in a standard extinction protocol (Fig. 3). Also, we found that nimodipine, a drug that has been shown to prevent memory destabilization (and thus memory updating), blocks the MPH effect in reducing freezing behavior in the test (although LVGCC inhibitors such as nimodipine has also been shown to impair extinction (Cain et al., 2002), which could impair fear reduction). Furthermore, surprisingly, we found that MPH actually impairs fear extinction (Fig. 3C). Taken together, we suggest that the fear reduction effect is probably due to the incorporation of positive hedonic information as a result of the MPH treatment concomitant with retrieval that updates the original fear memory to a less aversive level.

The fact that we have found a significant fear reduction only under short-length reactivation sessions may be explained in light of the

opposite-process effect (Ettenberg et al., 2004), which posits that psychostimulants such as MPH induces distinct affective states overtime. Initially, it induces a reinforcing positive state, but becomes aversive with the passage of time, when the drug plasma levels starts to fall. Indeed, we and others (Wooters et al., 2011) have found that MPH induces place preference when injected 10, but not 30 min before exposing to the CPP apparatus. This particularity may explain the discrepancy between other studies regarding fear extinction (Abraham et al., 2012).

Since the beginning of this century, the possibility to attenuate fear memory by interfering with reconsolidation has emerged as a promising strategy to erase pathological memories (Beckers and Kindt, 2017). However, most of the interference approaches rely on toxic pharmacological treatment such as protein synthesis inhibitors following retrieval, limiting its direct application in humans. We consider the updating strategy to deal with pathological memory a promising approach that requires to be further explored, since it permanently attenuated fear expression by employing a broadly used drug that has been safely administrated in humans.

CRediT authorship contribution statement

Angel David Arellano Pérez: Project administration, Methodology. **Bruno Popik:** Methodology. **Lucas de Oliveira Alvares:** Writing - original draft, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian government agencies CAPES and CNPq (Universal 2018 - 405100/2018-3). The authors acknowledge Paula Lunardi and Mirelle Casagrande for their kind technical assistance.

References

- Abraham, A.D., Cunningham, C.L., Lattal, K.M., 2012. Methylphenidate enhances extinction of contextual fear. *Learn. Mem.* <https://doi.org/10.1101/lm.024752.111>.
- Abraham, A.D., Neve, K.A., Lattal, K.M., 2016. Activation of D1/5 dopamine receptors: a common mechanism for enhancing extinction of fear and reward-seeking behaviors. *Neuropsychopharmacology: Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41 (8), 2072–2081. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.5>.
- Alberini, C.M., 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front. Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00012>.
- American Psychiatric Association, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fifth ed. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition.
- Archbold, G.E.B., Bouton, M.E., Nader, K., 2010. Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. *Eur. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07161.x>.
- Askenasy, E.P., Taber, K.H., Yang, P.B., Dafny, N., 2007. Methylphenidate (ritalin): behavioral studies in the rat. *Int. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1080/00207450600910176>.
- Beckers, T., Kindt, M., 2017. Memory reconsolidation interference as an emerging treatment for emotional disorders: strengths, limitations, challenges, and opportunities. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032816-045209>.
- Berger, W., Mendlowicz, M.V., Marques-Portella, C., Kinrys, G., Fontenelle, L.F., Marmar, C.R., Figueira, I., 2009. Pharmacologic alternatives to antidepressants in

- posttraumatic stress disorder: a systematic review. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.12.004>.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J. Comp. Physiol. Psychol.* <https://doi.org/10.1037/h0027676>.
- Bonin, R.P., De Koninck, Y., 2015. Reconsolidation and the regulation of plasticity: moving beyond memory. *Trends Neurosci.* <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.007>.
- Botly, L.C.P., Burton, C.L., Rizos, Z., Fletcher, P.J., 2008. Characterization of methylphenidate self-administration and reinstatement in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)*. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1093-z>.
- Bouton, M.E., 2002. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol. Psychiatr.* [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01546-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01546-9).
- Brewin, C.R., 2011. The nature and significance of memory disturbance in posttraumatic stress disorder. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032210-104544>.
- Briars, L., Todd, T., et al., 2016. A review of pharmacological management of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Pediatr. Pharmacol. Therapeut.* <https://doi.org/10.5863/1551-6776-21.3.192>.
- Cain, C.K., Blouin, A.M., Barad, M., 2002. L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-09113>.
- Carmack, S.A., Block, C.L., Howell, K.K., Anagnostaras, S.G., 2014a. Methylphenidate enhances acquisition and retention of spatial memory. *Neurosci. Lett.* 567, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.029>.
- Carmack, S.A., Howell, K.K., Rasaei, K., Reas, E.T., Anagnostaras, S.G., 2014b. Animal model of methylphenidate's long-term memory-enhancing effects. *Learn. Mem.* <https://doi.org/10.1101/lm.033613.113>.
- Crestani, A.P., Zacouteguy Boos, F., Haubrich, J., Ordoñez Sierra, R., Santana, F., Molina, J.M.D., Cassini, L.D.F., Alvares, L.D.O., Quillfeldt, J.A., 2015. Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/srep13633>.
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A.P., Cassini, L.F., Haubrich, J., Santana, F., Quillfeldt, J.A., 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>.
- Ettenberg, A., 2004. Opponent process properties of self-administered cocaine. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27 (8), 721–728. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.009>.
- Gerassimov, M.R., Marsteller, D., Dewey, S.L., Franceschi, M., Volkow, N.D., Gifford, A., Gatley, S.J., Molina, P.E., 2000. Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: a microdialysis and locomotor activity study. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*
- Haubrich, J., Crestani, A.P., Cassini, L.F., Santana, F., Sierra, R.O., De, O., Alvares, L., Quillfeldt, J.A., 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.174>.
- Jonas, D.E., Cusack, K., Forneris, C.A., Wilkins, T.M., Sonis, J., Middleton, J.C., Feltner, C., Meredith, D., Cavanaugh, J., Brownley, K.A., Olmsted, K.R., Greenblatt, A., Weil, A., Gaynes, B.N., 2013. Psychological and pharmacological treatments for adults with posttraumatic stress disorder (PTSD). *Comp. Eff. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2004.04.009>.
- Kindt, M., 2018. The surprising subtleties of changing fear memory: a challenge for translational science. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0033>.
- Koda, K., Ago, Y., Cong, Y., Kita, Y., Takuma, K., Matsuda, T., 2010. Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06750.x>.
- Kwapis, J.L., Jarome, T.J., Ferrara, N.C., Helmstetter, F.J., 2017. Updating procedures can reorganize the neural circuit supporting a fear memory. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.23>.
- Lee, J.L.C., 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front. Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00168>.
- Lee, J.L.C., 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nn.2205>.
- Lee, J., Flavell, C., 2014. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. *Front. Behav. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00144>.
- Lee, J.L.C., Milton, A.L., Everitt, B.J., 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2466-06.2006>.
- McDonald, B.C., Flashman, L.A., Arciniegas, D.B., Ferguson, R.J., Xing, L., Harezlak, J., Sprehn, G.C., Hammond, F.M., Maerlender, A.C., Kruck, C.L., Gillock, K.L., Frey, K., Wall, R.N., Saykin, A.J., McAllister, T.W., 2017. Methylphenidate and memory and attention adaptation training for persistent cognitive symptoms after traumatic brain injury: a randomized, placebo-controlled trial. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.261>.
- Nadel, L., Hupbach, A., Gomez, R., Newman-Smith, K., 2012. Memory formation, consolidation and transformation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.03.001>.
- Nader, K., Einarsson, E.Ö., 2010. Memory reconsolidation: an update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x>.
- Nader, K., Schafe, G.E., Le Doux, J.E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35021052>.
- Parsons, R.G., Ressler, K.J., 2013. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nn.3296>.
- Pearce, J.M., Dickinson, A., 1975. Pavlovian countercondition: changing the suppressive properties of shock by association with food. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* <https://doi.org/10.1037/0097-7403.1.2.170>.
- Pedraza, L.K., Sierra, R.O., Lotz, F.N., Alvares, L.D.O., 2018. Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25648-6>.
- Peña, I.C.D., Ahn, H.S., Choi, J.Y., Shin, C.Y., Ryu, J.H., Cheong, J.H., 2011. Methylphenidate self-administration and conditioned place preference in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: the spontaneously hypertensive rat. *Behav. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328342503a>.
- Popik, B., Amorim, F.E., Amaral, O.B., Alvares, L., 2020. Shifting from fear to safety through deconditioning-update. *elife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.51207>.
- Quansah, E., Zetterström, T.S.C., 2019. Chronic methylphenidate preferentially alters catecholamine protein targets in the parietal cortex and ventral striatum. *Neurochem. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.01.016>.
- Richardson, R., Riccio, D.C., Jamis, M., Cabosky, J., Skoczen, T., 1982. Modification of reactivated memory through “counterconditioning”. *Am. J. Psychol.* <https://doi.org/10.2307/1422660>.
- Sareen, J., 2014. Posttraumatic stress disorder in adults: impact, comorbidity, risk factors, and treatment. *Can. J. Psychiatr.* <https://doi.org/10.1177/070674371405900902>.
- Shimizu, R., Horiguchi, N., Yano, K., Sakuramoto, M., Kanegawa, N., Shinohara, S., Ohnishi, S., 2019. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of brain dopamine levels based on dopamine transporter occupancy after administration of methylphenidate in rats. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 78–87. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.252262>.
- Suzuki, A., et al., 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn. Mem.* <https://doi.org/10.1101/lm.888808>.
- Thomas, É., Saumier, D., Pitman, R.K., Tremblay, J., Brunet, A., 2017. Consolidation and reconsolidation are impaired by oral propranolol administered before but not after memory (re)activation in humans. *Neurobiol. Learn. Mem.* 142, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.010>.
- Vervliet, B., Craske, M.G., Hermans, D., 2013. Fear extinction and relapse: state of the art. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050212-185542>.
- Wooters, T.E., Walton, M.T., Bardo, M.T., 2011. Oral methylphenidate establishes a conditioned place preference in rats. *Neurosci. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.040>.
- Yang, P.B., Swann, A.C., Dafny, N., 2006. Dose-response characteristics of methylphenidate on locomotor behavior and on sensory evoked potentials recorded from the VTA, NAc, and PFC in freely behaving rats. *Behav. Brain Funct.* 2. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-2-3>.

4. CAPÍTULO II

Memory reactivation in the dark, active phase promotes fear attenuation role of glucocorticoids

Artigo submetido na revista Neuroscience

Memory reactivation in the dark, active phase promotes fear attenuation role of glucocorticoids

Angel David Arellano Perez^{1,3}, Joelma Alves^{2,4}, and Lucas de Oliveira Alvares^{1,3*}

¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Laboratório de Neurobiologia do Estresse, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³Programa da Pós-Graduação em Neurociências. Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

⁴Programa da Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

*Corresponding author: Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, sala 210, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Brazil. E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br

Abstract

It has been shown that a previously consolidated memory can incorporate either new external information or a novel internal emotional state following a labile state induced by reactivation. This updating process allows editing unwanted fear memory, leading to the reduction of fear response. Memory can be modulated by the circadian cycle. Considering that rodents are more active during the night, expressing less fear behaviour, we investigated whether fear memory can be updated when reactivated during the dark cycle. We found that rats expressed lower freezing levels during a single reactivation session in the dark cycle, but not in the test. However, three reactivation sessions in the dark cycle were able to update fear memory, reducing freezing response in the test performed in the light cycle. This effect was blocked when the glucocorticoid synthesis inhibitor metyrapone was administered before reactivation. This approach opens new avenues to explore interventions that consider the circadian cycle in the treatment of fear memories based on non-pharmacological interventions.

Keywords

Circadian cycle, Fear memory, Glucocorticoids, Reconsolidation, Extinction.

Highlights:

- *Reactivation in the dark cycle attenuates fear memory expression within session, but not in the test.*
- *Successive fear reactivations in the dark cycle update memory, attenuating freezing expression in the test.*
- *Fear memory attenuation through reactivations in the dark cycle is mediated by glucocorticoid release.*

Introduction

Aversive emotional experiences can trigger the formation of pathological memories and the development of post-traumatic stress disorder (PTSD) (Parsons & Ressler, 2013). Although extinction-based therapy is effective in part of the patients suffering from PTSD, this treatment has several limitations, such as the return of the fear symptoms with the passage of time (Bouton, 2002). Thus, understanding conditions through which extinction might overcome these limitations would be extremely important to deal with maladaptive fear memories.

In the last decades, it became clear that a well-consolidated memory can enter a labile state following reactivation. During this plastic state, memory strength or its content can be modified by distinct interventions before being reconsolidated (De Oliveira Alvares & Do-Monte, 2021). Although several studies have been successful to attenuate fear memory by affecting memory reconsolidation through pharmacological interference, most of these treatments are toxic and cannot be used in humans (Beckers & Kindt, 2017). It has been proposed that the reconsolidation approach to reduce fear expression is more effective than extinction-based strategy because the fear attenuation seems to be permanent (Lee et al., 2017).

Recently, it has been shown that fear memory can be updated to a less aversive level if some internal or external information is inserted in the background of fear memory. For instance, the presence of appetitive information (such as chocolate and caffeine) (Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018), some specific endogenous state (Sierra et al., 2013), or delivering a very low footshock (Popik et al., 2020) during memory reactivation is capable of robustly and permanently attenuate fear expression. The advantage of these methods of intervention relying on behavioural therapies based on memory updating is that it does not require potentially toxic drugs.

Cognitive performance can be modulated by time-of-day, that is, depending on the circadian cycle, memory retrieval might be enhanced or impaired (Hasegawa et al., 2019). Although it has been demonstrated that memory is affected by the circadian cycle (Eckel-Mahan et al., 2008; Hasegawa et al., 2019), it is still unknown whether it influences memory updating. It has been shown that there is a freezing reduction in a fear memory retrieved in the dark cycle (Chaudhury & Colwell, 2002). Here, we hypothesized that this fearless state achieved by the active cycle could be incorporated in the background of a fear memory during the plastic state induced by reactivation, updating it to a less aversive level.

Experimental procedures

Subjects

Were used male *Wistar* rats (2-3 months old, weighing approximately 300g) from CREAL at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), which were housed 4 per cage in Plexiglas boxes, under a 12hs light/dark cycle (7 am/7 pm) at a constant controlled temperature ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$), with water and food available *ad libitum*. All the procedures followed the Brazilian ethical guidelines for animal research. For this study, we used a total of 132 rats. For each experiment, a new batch of animals was used.

Behavioural apparatus and procedures

Contextual Fear Conditioning (CFC)

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25×25 cm grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart). One day before conditioning, animals were exposed to the conditioning chamber for 5 min in the light cycle. The conditioning training sessions were carried out in the light cycle, rats were placed in the chamber for 3 min, then received two 2s, 0,7 mA foot-shocks separated by a 30s interval; they were kept in the conditioning context for an additional 30s before returning to their home cage. The conditioning chamber presented an independent light source, so that the brightness inside the chambers was

the same regardless of the cycle phase.

Reactivation sessions and test

Reactivation sessions were performed 2 days after training in the same context, in either the dark cycle (8 pm-11 pm) or the light cycle (2 pm-5 pm), during 4, 12, or 28min. Another experiment was designed with three short 4-minute sessions with intervals of 2 days between each one. No footshocks were delivered during reactivation. The test session was performed during the light cycle, in the same context for 5 minutes, 1 day after the last reactivation session. In the 12 and 28-min reactivations, data were shown and analysed in blocks of 4 min.

Behavioural Measurement

Freezing behavior was used as a memory index, being registered with a stop watching in real-time by an experienced observer unaware of the experimental conditions. Freezing is defined as a total cessation of all movements except those required for respiration (Blanchard & Blanchard, 1969).

Open field

Locomotor activity was assessed in an open field chamber of 49 cm height and 60 × 60 cm walls, which was made of wood counted on distinct visual cues in the walls, and floor divided into 25 equal rectangles or "sectors". During the experiment, a low-intensity light of ~25 lux was equally distributed into the chamber. The behaviour was recorded by video tracking and processed offline.

Animals were exposed to open field, either light or dark cycle during 5 min, crossings between sectors (locomotor activity) was measured, as well as the time spent in the periphery and center of the apparatus.

Drug

Metypapone (Sigma-Aldrich), a corticosterone synthesis inhibitor, was dissolved in sterile isotonic saline with 10% DMSO to a final concentration of 50 mg/ml and injected intraperitoneal (50 mg/kg). The dose of metypapone was selected based on previous findings, indicating that it effectively blocks stress-induced increases in circulating levels of corticosterone (Rooszendaal et al., 1996).

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed using *Student's t-test*; one-way, two-way, or repeated-measure analysis of variance (ANOVA), followed by Sidak's *posthoc* test, when necessary. All data used the confidence level of 95% and the values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. All experiments were randomized and performed blindly.

Results

Reactivation in the dark cycle attenuates fear memory expression within a session, but not in the test.

Fear memory can be updated to a less aversive level depending on the condition presented during reactivation. Here, we first asked whether a brief reactivation in the active (dark) cycle would affect memory reconsolidation in a subsequent test performed in the light cycle. Animals were fear conditioned in the light cycle and, after 2 days, memory was reactivated in either the light or the dark cycle. One day later, animals were tested in the same context in the light cycle (Fig. 1A). Student's t-test showed significant different between the groups during memory reactivation, ($t(16) = 2.305$, $P = 0.0349$; $n=9$ per group), but not in the test session (Student's t-test, $t(16) = 2.018$, $P = 0.0606$) (Fig1B-C). This result indicates that memory reactivation in the dark cycle inhibits fear expression, but memory is not updated, since animals keep expressing high freezing levels in the light cycle test.

Next, we asked whether a longer reactivation session would be able to reduce fear expression in the test. Following the same training protocol described above, animals were exposed to a 12-minutes fear memory reactivation (3x4-min block) in either the light ($n = 8$) or the dark ($n = 9$)

cycle (Fig. 2A). During reactivation, repeated-measures ANOVA revealed no effect of time (blocks) x group interaction ($F(2,21)=0.9761$, $P=0.3932$), nor significant effect between time ($F(2,24)=0.7466$, $P=0.4847$), but significant effect between groups ($F(1,21)=26.16$, $P<0.0001$; Fig. 2B). Sidak's multiple comparisons test revealed a significant difference between groups in the second and third reactivation blocks (block 1-3, $P=0.1297$; block 6-9, $P=0.0413$; block 9-12, $P=0.0017$). Curiously, no effect was found between the groups in the test (Student's t-test, $t(15) = 0.6514$, $P = 0.5247$; Fig.2C). These results showed again that during reactivation in the dark cycle, fear memory is suppressed, but it does not lead to any effect in the test performed in the light cycle.

Successive reactivations in the dark cycle lead to attenuation of fear memory.

It has been shown that periodical reactivation in the presence of caffeine, methylphenidate, chocolate, and a weak footshock leads to memory updating and a permanent fear attenuation (Popik et al., 2020; Arellano Pérez et al., 2020; Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018). We then asked whether subjecting spaced reactivations during the dark cycle would undergo fear attenuation in a test performed in the light cycle. Animals were trained in the light cycle as described above, and fear memory was reactivated in three 4-minutes sessions during the light ($n = 12$) or dark ($n = 10$) cycle, with an interval of 2 days between them. Twenty-four hours later, animals were tested in the light cycle (Fig.2D). During reactivation sessions, repeated-measures ANOVA showed an effect of sessions x group interaction ($F(2,16)=5.161$, $P=0.0186$), and significant effect within sessions ($F(2,22)= 29.37$, $P<0.0001$), but no effect between groups ($F(1,11)=0.8397$, $P=0.3791$). Sidak post hoc multiple comparisons showed a significant effect between the sessions in the dark cycle (1st - 2nd, $P= 0.0007$; 1st - 3rd, $P<0.0001$; Fig. 2E). Student's t-test showed a significant fear reduction in the dark cycle-reactivated group in the test ($t(20) = 3.039$, $P = 0.0065$; Fig. 2F). These results indicate that successive reactivations in the dark cycle lead to a fear attenuation.

Fear expression in the dark cycle is reduced within extinction session, but not in the test

Our results so far showed that several reactivations in the dark cycle lead to fear memory attenuation. Next, we wondered whether it would also attenuate fear expression by enhancing extinction. Then, we conditioned the animals as above, and 2 days later they were subjected to an extinction session (28 minutes) in the light ($n=12$) or dark cycle ($n=10$) (Fig. 2G). During extinction training repeated-measures ANOVA showed no effect of time (blocks) x group interaction ($F(6,105)=1.928$, $P=0.0830$), but significant effect between groups ($F(1,105)=7.416$, $P=0.0076$), and between time (blocks) ($F(6,105)=4.232$, $P=0.0007$; Fig. 2H). Although the dark cycle group expressed lower fear expression during the extinction session, no significant difference was found in the test (Student's t-test, $t(15) = 0.08887$, $P = 0.9304$; Fig. 2I).

Fear memory attenuation through reactivations in the dark cycle is blocked by Metyrapone.

Considering that there is an increase of glucocorticoids level during the active phase (dark cycle) (Dalm et al., 2005; Segall et al., 2006), we next evaluated whether the enhanced corticosterone levels at the beginning of the dark cycle would be participating in the fear memory reduction. Thus, we hypothesized that the administration of the glucocorticoid synthesis inhibitor metyrapone would block the effect on fear memory attenuation found in Fig. 2F. In this experiment, all rats were trained in the light cycle and reactivations were performed only in the dark cycle. Fifty minutes before each reactivation, metyrapone ($n=7$) or vehicle ($n=11$) was administered intraperitoneally (Fig. 3A). During reactivations, repeated-measures ANOVA showed no effect of sessions x group interaction ($F(2,8)=0.6732$, $P=0.5368$), nor significant effect between groups ($F(1,10)=0.4939$, $P=0.4982$), but significant effect between sessions ($F(2,20)=21.87$, $P<0.0001$; Fig. 3B). One day later, in the test, significant differences were found between the groups (Student's t-test, $t_{(16)} = 2.603$, $P = 0.0192$; Fig. 3C). These results confirmed our hypothesis that inhibition of synthesis of glucocorticoids with metyrapone impaired fear

memory attenuation caused by reactivations in the dark cycle.

We performed an experiment identical to the abovementioned, except that metyrapone (n=4) or vehicle (n=8) were injected before memory reactivation in the light phase (Fig. 3D). During reactivations, repeated-measures ANOVA showed no effect of session x group interaction ($F(2,2)=1.222$, $P=0.4500$), between groups ($F(1,7)=0.2061$, $P=0.6636$), nor between sessions ($F(2,14)=2.258$, $P=0.1413$; Fig. 3E). In the test session, no significant differences were found between the groups (Student's t-test, $t_{(10)} = 0.8842$, $P = 0.3973$; data not shown). These results confirm that inhibition of glucocorticoid synthesis with Metyrapone impairs fear memory attenuation only when the memory is reactivated in the dark cycle, when the corticosterone level is increased.

The circadian cycle does not interfere with fear memory conditioning or locomotor activity.

Next, we asked whether training either in the dark or light cycle would affect memory formation. To evaluate this possibility, we carry out a training protocol in the dark (n=6) or light cycle (n=12), and fear memory was tested two days after in the light cycle (Fig. 4A). We found no differences between the groups trained in the dark or light cycle in the test (Student's t-test, $t_{(10)} = 0.6640$, $P = 0.5217$; Fig. 4B).

Finally, we asked whether our results could be influenced by the possible motor activity increase during the dark cycle. Then, rats underwent an exploration-free behavior in an open field during either the light (n=8) or dark (n=8) cycle and locomotor activity was registered through the number of crossings. No difference was found between the groups (Student's t-test, $t_{(14)} = 0.5290$, $P=0.6051$; Fig. 4C), suggesting that our memory fear reduction in animals reactivated in the dark cycle does not rely on motor activity changes.

Discussion

In this study, we evaluated the effect of memory reactivation during the light or dark cycle in fear-conditioned rats. We showed that memory reactivated in the dark cycle exhibited a lower freezing level within the session compared to the group reactivated in the light cycle (Fig. 1B and 2B). However, this attenuation was temporary, since no effect was found in the test session performed in the light cycle. Second, we found that periodical short reactivations in the dark cycle attenuate fear memory, as observed by the low freezing presented in the test session (Fig. 2F). Third, we have shown that this effect on fear memory attenuation through several reactivations in the dark cycle is, at least in part, mediated by corticosterone (Fig. 3).

Depending on the memory reactivation length, two distinct processes can take place. Short reactivation might undergo reconsolidation, while longer reactivation might induce extinction (Suzuki et al., 2004, Wang et al., 2009; De Oliveira Alvares et al., 2013). It has been demonstrated that memory short reactivations might undergo destabilization. During this labile period, new external information or internal emotional state can be inserted into the original memory, updating its content or strength (de Oliveira Alvares & Do-Monte, 2021; Lee, 2009). In the last decades, several studies have shown that pharmacological treatments injected immediately after fear memory reactivation impairs the freezing response in the test (Blundell et al., 2008; Dębiec & LeDoux, 2006; Lee et al., 2006; Milekic & Alberini, 2002; Nader et al., 2000). Although this strategy has been considered promising for attenuating traumatic-like memory, most of this evidence was performed by toxic drug treatments such as protein synthesis inhibitors or NMDA antagonists (Beckers & Kindt, 2017).

Recently, other strategies able to attenuate fear memory response without using drugs relying on the plastic state induced by reactivation have been demonstrated (De Oliveira Alvares & Do-Monte 2021). Usually, this new approach updates the previously acquired fear memory by an emotional remodelling, in which positive information is presented during memory reactivation. Then, fear memory is modified and rewritten to a positive/less-aversive level. This emotional remodelling during reactivation has been shown using chocolate, cereals, caffeine, and methylphenidate (Arellano Pérez et al., 2020; Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018).

Another interesting study reported that fear-conditioned rats incapable of expressing freezing because of an air-puff distractor during reactivation also express low freezing levels in the subsequent tests (without any distractor) (Crestani et al., 2015). That is, the incapacity to properly express the emotional experience during the memory vulnerable state induced by the reactivation is sufficient to disrupt memory reconsolidation, updating it to a less aversive form. It has been shown that animals express a lower freezing level if they are tested in the active-dark cycle (Albrecht & Stork, 2017; Chaudhury & Colwell, 2002).

In the present study, we wondered whether the fearless state presented in the dark-cycle reactivation could be incorporated in the original memory, modifying it to a less aversive level. We have found that one single short session of reactivation is not enough to attenuate fear memory in the test. Regarding longer reactivations, we found that a 12-min exposure does not induce extinction in any group. On the other hand, 28-min exposure in the training context presented a robust within session extinction in the dark cycle group, although no difference was found in the test. We feel that animals during the dark cycle present a reduction in the fear expression without actually decrease the fear memory, since this difference is not maintained in the test. However, three short reactivation sessions in the dark-cycle were able to update memory, reducing the freezing in the test performed in the light cycle.

One of the main events involved in the oscillations of the circadian cycle is the fluctuation of glucocorticoid levels. There are several studies showing the important role played by glucocorticoid on memory (Cordero et al., 1998 and 2002; Souza, et al. 2014; Kaouane et al., 2020; Park et al., 2006). The corticosterone reaches its peak a few hours following the dark cycle (Dalm et al., 2005). Considering that memory reactivation was performed when glucocorticoids are extremely elevated, we hypothesized that this increase in glucocorticoid levels would be affecting the fear memory attenuation. As shown on fig 3B, the glucocorticoid synthesis inhibitor metyrapone prevented the fear attenuation caused by the reactivation in the dark cycle (but not in the light cycle (Fig. 3E), suggesting that the increased corticosterone levels during memory updating play an important role in the fear memory reduction. It is possible that the high glucocorticoid levels during reactivation impair per se memory retrieval (De Quervain et al., 1998; Meir Drexler & Wolf, 2017) (and this fearless response is incorporated in the original memory), and/or glucocorticoid impairs the reconsolidation process directly (Amiri et al., 2015). One possible mechanism underpinning our findings is that the increased glucocorticoid levels in the dark phase increase the endocannabinoid levels (Balsevich et al., 2017), which has been shown to facilitate memory destabilization (Lunardi et al., 2020; Suzuki et al., 2008) as well as fear extinction (Marsicano et al., 2002; Sachser et al., 2015).

It has been shown that extinction training is affected by the circadian cycle (Albrecht & Stork, 2017; Woodruff et al., 2015). Although we confirmed that animals undergoing extinction in the dark cycle express less freezing within session, no difference was found in the test. We also expected to find a difference in the memory retention in animals trained in distinct cycles (Garren et al., 2013). It is possible that our protocol in both extinction and conditioning is above the threshold that might be sensitive to the circadian cycle modulation. In fact, memory formation and extinction were only found in weak/mild protocols (Chaudhury & Colwell, 2002; Hasegawa et al., 2019). Although nocturnal rodents are generally less active during the day, we did not find any motor difference in the open field (Fig. 4C). It is possible that this effect was overcome by the novelty of the open-field arena. Recently, it has been shown that a night of sleep after a post-reactivation treatment is essential to reduce fear expression by reconsolidation mechanisms, thus, factors such as the circadian-cycle and sleep should be taken into account in approaches relying on interventions based on reconsolidation (Kindt & Soeter, 2018).

It is important to note that fear reduction was observed in some protocols along the experiments, although this effect was more evident in the dark group. The absence of subsequent tests such as spontaneous recovery and reinstatement limits the interpretation of the results regarding the process involved in our findings. Another limitation of this study is that the corticosterone level was not directly measured (although several studies have demonstrated that

it happens, such as Chauveau et al., 2010; Gaele et al., 2019; Roozendaal et al., 1996). Recently, many studies have demonstrated that fear memories might be remodelled by changing their emotional valence during the plastic state induced by reactivation, without using any toxic treatment. This memory updating robustly reduces the fear response. Here, we found another no invasive approach resulting in fear attenuation. The main finding reported in this study is that (a) periodical reactivations in the dark cycle update fear memory to a less aversive level, and (b) this effect is, at least in part, mediated by corticosterone. Thus, this study might be important to optimize strategies to deal with pathological memories. Our results suggest that therapeutical approaches to treat traumatic memories could be enhanced by being performed in the appropriate daytime.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian government agencies CAPES and CNPq (Universal 2018 - 405100/2018-3). The authors acknowledge Isabel Cristina Marques Scarello for her kind technical assistance.

Competing interests

The authors declare no competing interests

REFERENCES

- Amiri, S., Jafarian, Z., Vafaei, A. A., Motaghd-Larijani, Z., Samaei, S. A., & Rashidy-Pour, A. (2015). Glucocorticoids interact with cholinergic system in impairing memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Basic and Clinical Neuroscience*, 6(3).
- Albrecht, A., & Stork, O. (2017). Circadian Rhythms in Fear Conditioning: An Overview of Behavioral, Brain System, and Molecular Interactions. In *Neural Plasticity* (Vol. 2017). <https://doi.org/10.1155/2017/3750307>
- Arellano Pérez, A. D., Popik, B., & de Oliveira Alvares, L. (2020). Rewarding information presented during reactivation attenuates fear memory: Methylphenidate and fear memory updating. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108107>
- Balsevich, G., Petrie, G. N., & Hill, M. N. (2017). Endocannabinoids: Effectors of glucocorticoid signaling. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 47). <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.07.005>
- Beckers, T., & Kindt, M. (2017). Memory Reconsolidation Interference as an Emerging Treatment for Emotional Disorders: Strengths, Limitations, Challenges, and Opportunities. *Annual Review of Clinical Psychology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032816-045209>
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. <https://doi.org/10.1037/h0027676>
- Blundell, J., Kouser, M., & Powell, C. M. (2008). Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.12.004>
- Bouton, M. E. (2002). Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. In *Biological Psychiatry*. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01546-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01546-9)
- Chaudhury, D., & Colwell, C. S. (2002). Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behavioural Brain Research*, 133(1). [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00471-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00471-5)
- Chauveau, F., Tronche, C., Piérard, C., Liscia, P., Drouet, I., Coutan, M., & Béracochea, D. (2010). Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus*, 20(1). <https://doi.org/10.1002/hipo.20605>

- Cordero, M. I., & Sandi, C. (1998). A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain research*, 786(1-2), 11–17. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01420-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01420-0)
- Cordero, M. I., Kruyt, N. D., Merino, J. J., & Sandi, C. (2002). Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 5(1), 73–79. <https://doi.org/10.1080/1025389029000124404>
- Crestani, A. P., Zaccouteguy Boos, F., Haubrich, J., Ordoñez Sierra, R., Santana, F., Molina, J. M. D., Cassini, L. D. F., Alvares, L. D. O., & Quillfeldt, J. A. (2015). Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep13633>
- Dalm, S., Enthoven, L., Meijer, O. C., Van Der Mark, M. H., Karssen, A. M., De Kloet, E. R., & Oitzl, V. M. S. (2005). Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology*, 81(6). <https://doi.org/10.1159/000089555>
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>
- De Oliveira Alvares, Lucas, & Do-Monte, F. H. (2021). Understanding the dynamic and destiny of memories. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 125). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.009>
- De Quervain, D. J. F., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, 394(6695). <https://doi.org/10.1038/29542>
- Dębiec, J., & LeDoux, J. E. (2006). Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: Treatment implications for PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1071. <https://doi.org/10.1196/annals.1364.056>
- Eckel-Mahan, K. L., Phan, T., Han, S., Wang, H., Chan, G. C. K., Scheiner, Z. S., & Storm, D. R. (2008). Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: Implications for memory persistence. *Nature Neuroscience*, 11(9). <https://doi.org/10.1038/nn.2174>
- Gaëlle, D., Nadia, H., Thomas, P., Vincent, D., Jean-Louis, G., Catherine, B., Nicole, M., & Daniel, B. (2019). Sustained corticosterone rise in the prefrontal cortex is a key factor for chronic stress-induced working memory deficits in mice. *Neurobiology of Stress*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100161>
- Garren, M. V., Sexauer, S. B., & Page, T. L. (2013). Effect of Circadian Phase on Memory Acquisition and Recall: Operant Conditioning vs. Classical Conditioning. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058693>
- Hasegawa, S., Fukushima, H., Hosoda, H., Serita, T., Ishikawa, R., Rokukawa, T., Kawahara-Miki, R., Zhang, Y., Ohta, M., Okada, S., Tanimizu, T., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Kida, S. (2019). Hippocampal clock regulates memory retrieval via Dopamine and PKA-induced GluA1 phosphorylation. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13554-y>
- Haubrich, J., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Santana, F., Sierra, R. O., De O. Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2015). Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.174>
- Kindt, M., & Soeter, M. (2018). Pharmacologically induced amnesia for learned fear is time and sleep dependent. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03659-1>
- Lee, J. L. C. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in Neurosciences*, 32(8). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.002>
- Lee, J. L. C., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: Inhibition and potentiation. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2466-06.2006>

- Lee, J. L. C., Nader, K., & Schiller, D. (2017). An Update on Memory Reconsolidation Updating. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 21, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.tics.2017.04.006>
- Lunardi, P., de Souza, L. W., dos Santos, B., Popik, B., & de Oliveira Alvares, L. (2020). Effect of the Endocannabinoid System in Memory Updating and Forgetting. *Neuroscience*, *444*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.07.045>
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascioli, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., & Lutz, B. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, *418*(6897). <https://doi.org/10.1038/nature00839>
- Meir Drexler, S., & Wolf, O. T. (2017). The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *142*, 126–134. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2016.11.008>
- Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, *36*(3). [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00976-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00976-5)
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Park, C. R., Campbell, A. M., Woodson, J. C., Smith, T. P., Fleshner, M., & Diamond, D. M. (2006). Permissive influence of stress in the expression of a U-shaped relationship between serum corticosterone levels and spatial memory errors in rats. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, *4*(1), 55–74. <https://doi.org/10.2203/dose-response.004.01.005>.
- Parsons, R. G., & Ressler, K. J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. In *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nm.3296>
- Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Lotz, F. N., & Alvares, L. D. O. (2018). Periodical reactivation under the effect of caffeine attenuates fear memory expression in rats. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25648-6>
- Popik, B., Amorim, F. E., Amaral, O. B., & Alvares, L. de O. (2020). Shifting from fear to safety through deconditioning-update. *eLife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.51207>
- Roozendaal, B., Bohus, B., & McGaugh, J. L. (1996). Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology*, *21*(8). [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(96\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(96)00028-5)
- Sachser, R. M., Crestani, A. P., Quillfeldt, J. A., Souza, T. M. E., & De Oliveira Alvares, L. (2015). The cannabinoid system in the retrosplenial cortex modulates fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction. *Learning and Memory*, *22*(12). <https://doi.org/10.1101/lm.039891.115>
- Segall, L. A., Perrin, J. S., Walker, C. D., Stewart, J., & Amir, S. (2006). Glucocorticoid rhythms control the rhythm of expression of the clock protein, Period2, in oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in rats. *Neuroscience*, *140*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.03.037>
- Sierra, R. O., Cassini, L. F., Santana, F., Crestani, A. P., Duran, J. M., Haubrich, J., De Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learning and Memory*, *20*(7). <https://doi.org/10.1101/lm.030023.112>
- Souza, R. R., Dal Bó, S., de Kloet, E. R., Oitzl, M. S., & Carobrez, A. P. (2014). Paradoxical mineralocorticoid receptor-mediated effect in fear memory encoding and expression of rats submitted to an olfactory fear conditioning task. *Neuropharmacology*, *79*, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.017>
- Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P. W., & Kida, S. (2008). Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.888808>

- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Wang, S. H., de Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature neuroscience*, 12(7), 905–912. <https://doi.org/10.1038/nn.2350>
- Woodruff, E. R., Greenwood, B. N., Chun, L. E., Fardi, S., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. (2015). Adrenal-dependent diurnal modulation of conditioned fear extinction learning. *Behavioural Brain Research*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.006>

Figures

Fig. 1.

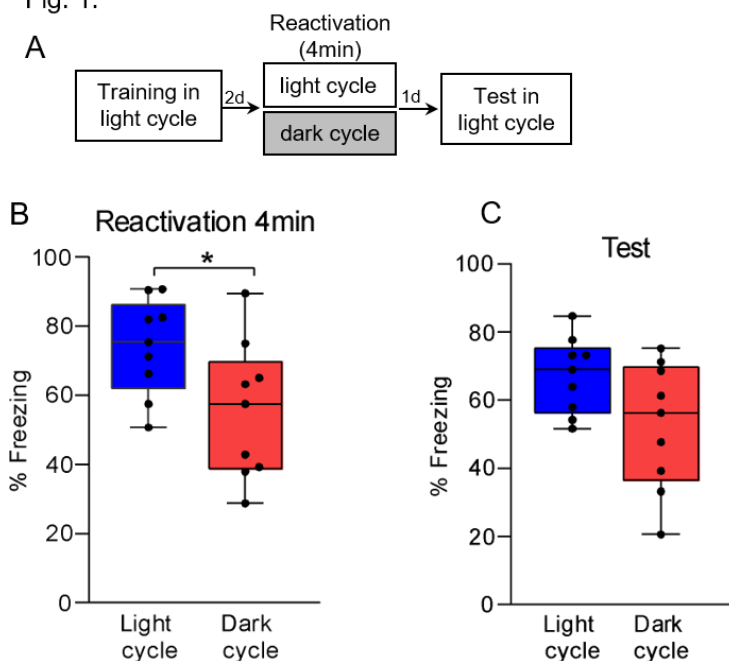


Figure 1. A brief reactivation in the dark cycle attenuates fear memory expression within session, but not in the test (A) Experimental design. Rats were trained in the light cycle, 48hrs later fear memory was reactivated (4 minutes) in either the light ($n = 9$) or dark ($n = 9$) cycle. The test session was performed 24hrs later. **(B)** Freezing levels during reactivation were reduced in the dark cycle group. **(C)** No differences were observed between the groups in the test. For each box, the bold inner line shows the median, the interquartile range (IQR) bounded by the 25th and 75th percentiles; the whiskers are represented by the 5th and 95th percentiles; data points along the distribution represent individual results. * $p < 0.05$.

Fig. 2.

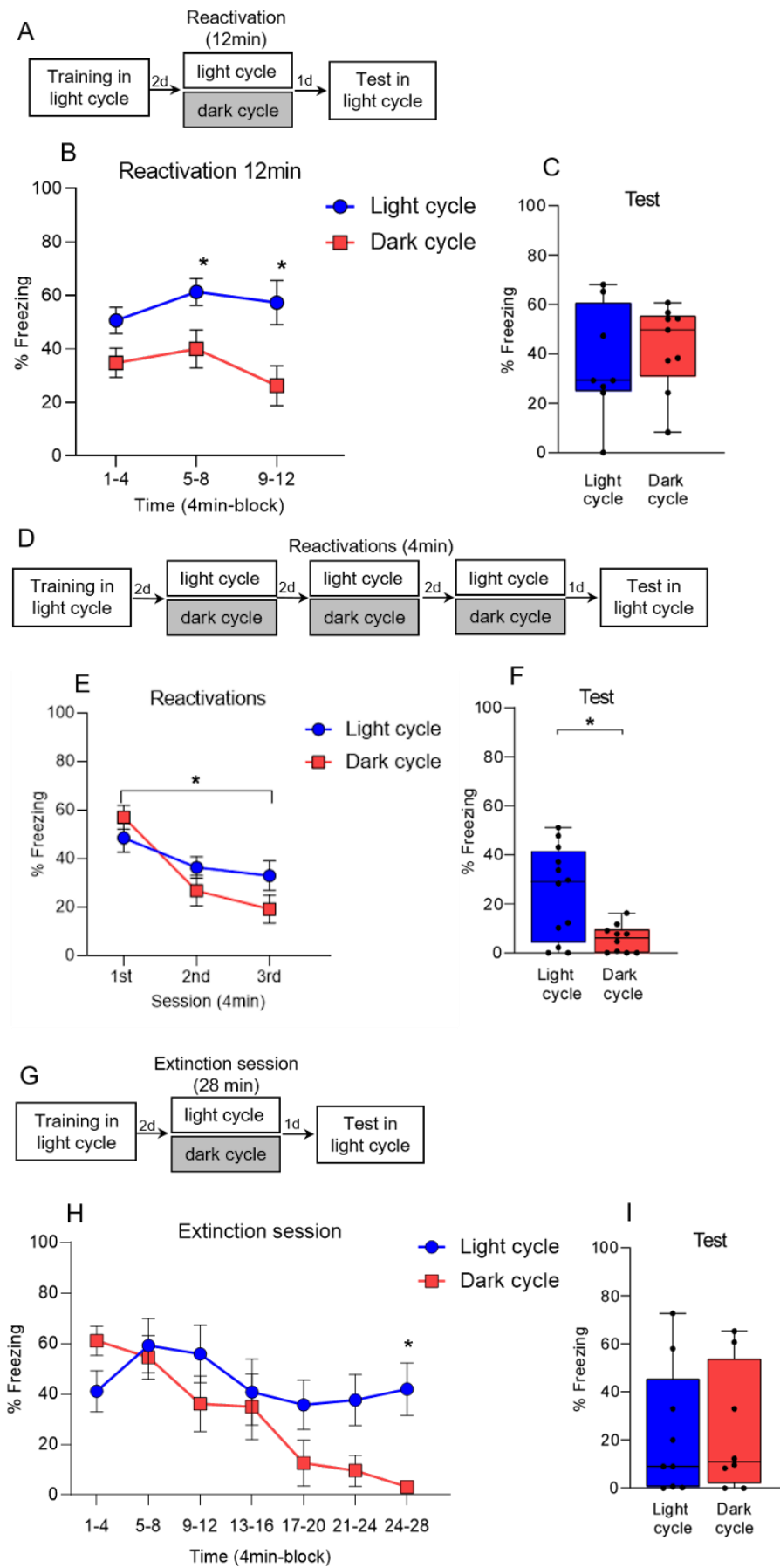


Figure 2. Successive reactivations, but not a long-lasting one, in the dark cycle, lead to attenuation of fear memory. (A) Experimental design. Rats were trained in the light cycle, 48hrs later fear memory was reactivated in either the light ($n = 8$) or dark ($n = 9$) cycle. The test session was performed 24hrs later. (B) The reactivation session time (12 minutes) shows the freezing expression in three 4-minute blocks. The freezing levels were lower in the second and third blocks for the group reactivated in the dark cycle compared to the group reactivated in the light cycle. (C) No differences were found between groups in the test. (D) Experimental design. Rats were trained in the light cycle, 48 hours later the fear memory was reactivated through three sessions (4 minutes) at an interval of 2 days for each, in the light ($n = 12$) or dark ($n = 10$) cycle. The test session was performed 24 hours after the last reactivation session. (E) The reactivations are expressed in three 4-minute sessions. The dark cycle reactivated group showed a reduction of fear throughout sessions. (F) Animals reactivated in the dark cycle showed a lower level of freezing compared to the group reactivated in the light cycle in the test. (G) Experimental design. Rats were trained in the light cycle, 48hrs later fear memory was reactivated in an extinction session in either the light ($n = 9$) or dark ($n = 8$) cycle. The test session was performed 24 hours after the last reactivation session. (H) The extinction session time (28 minutes) is expressed in 4-min blocks. Animals reactivated in the dark cycle showed a freezing reduction within the session compared to the group reactivated in the light cycle. (I) No differences were found between groups in the test. Bars represent mean \pm SEM. For each box, the bold inner line shows the median, the interquartile range (IQR) bounded by the 25th and 75th percentiles; the whiskers are represented by the 5th and 95th percentiles; data points along the distribution represent individual results. * $p < 0.05$.

Fig. 3.

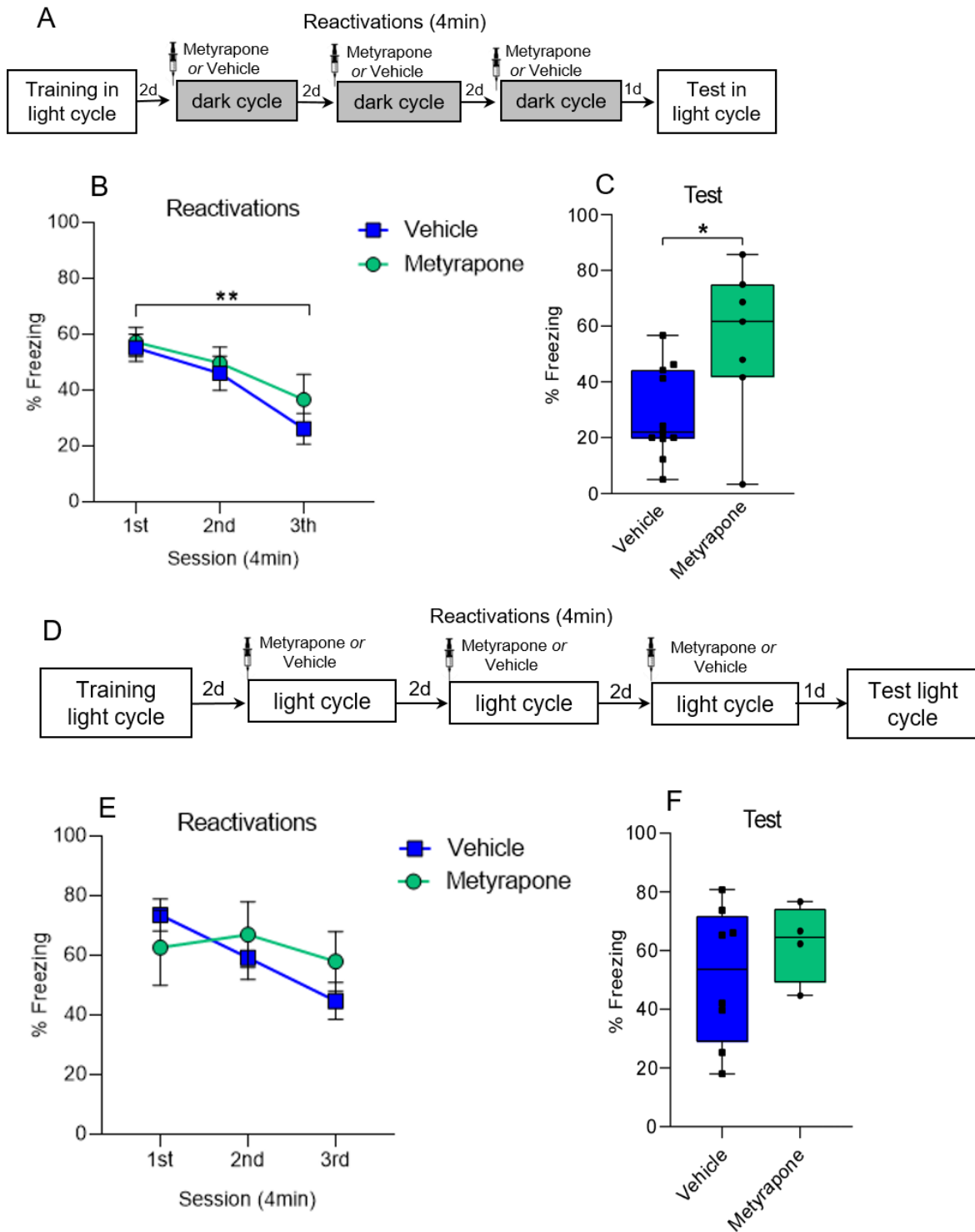


Figure 3. Fear memory attenuation through reactivations in the dark cycle is attenuated by glucocorticoids synthesis inhibition. (A) Experimental design. Rats were trained in the light cycle, and 48hrs later fear memory was reactivated in the dark cycle through three sessions (4 minutes) at an interval of 2 days for each. Metyrapone ($n = 11$) or vehicle ($n = 11$) was injected 50min before each session. The test session was performed 24 hours after the last reactivation session. (B) The reactivations are expressed in three 4-minute sessions. Both groups showed a decrease in fear memory across sessions. (C) The vehicle group showed a lower level of freezing compared to the group reactivated with Metyrapone in the test session. (D) Experimental design. Rats were trained in the light cycle, and 48hrs later fear memory was reactivated in the light cycle through three sessions (4

minutes) at an interval of 2 days for each. Metyrapone ($n = 4$) or vehicle ($n = 8$) was injected 50min before each session. The test session was performed 24 hours after the last reactivation session. Metyrapone or vehicle was injected 50min before each reactivation. **(E)** The reactivations are expressed in three 4-minute sessions. The groups show no differences between the reactivation sessions. **(F)** Test session, no differences between the groups were found. Bars represent mean \pm SEM. For each box, the bold inner line shows the median, the interquartile range (IQR) bounded by the 25th and 75th percentiles; the whiskers are represented by the 5th and 95th percentiles; data points along the distribution represent individual results.

** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.

Fig. 4.

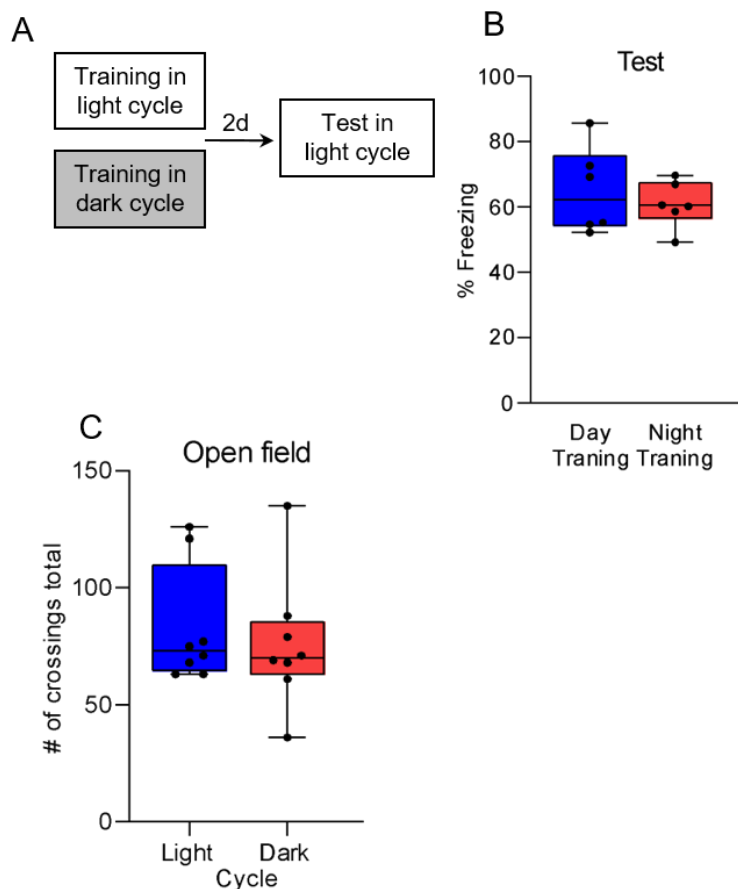


Figure 4. The circadian cycle does not interfere with fear memory formation or locomotor activity. **(A)** Experimental design. Rats were trained either in the light ($n = 6$) or dark ($n = 6$) cycle. 48hrs later fear memory was tested in the light cycle **(B)** In the test session, no differences were found between the conditioned groups either in the light or dark cycle. **(C)** Open field. Rats were exposed to an open field, either in the light ($n = 8$) or dark cycle ($n = 8$) for 5 min, and crossings between sectors were measured. No difference in the number of crossings in the open field was observed between the groups. For each box, the bold inner line shows the median, the interquartile range (IQR) bounded by the 25th and 75th percentiles; the whiskers are represented by the 5th and 95th percentiles; data points along the distribution represent individual results.

7. DISCUSSÃO

Estudos feitos em nosso grupo de pesquisa demonstram que a reativação de memórias de medo concomitante com a apresentação de um estímulo de valência gratificante ou um distrator, conduz à atenuação de memórias de medo através da reconsolidação (Arellano Perez et al., 2020; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018). Assim, aproveitando o estado lábil após sua reativação, as memórias são susceptíveis de interferências ou mudanças através da incorporação de nova informação, ou um novo estado emocional produto da reativação: quando a memória é evocada o traço mnemônico é desestabilizado e reestabilizado novamente, nessa janela de tempo a memória se torna maleável e suscetível a intervenções.

As descobertas dos trabalhos anteriormente citados deram a base para a proposta dos estudos realizados nesta tese. Aqui, foi avaliado o efeito de intervenções promissoras reportadas na literatura para a atenuação de memórias aversivas. No **capítulo 1**, foi usado MFD, um fármaco bem conhecido pela sua ação psicoestimulante e com efeitos amplamente reportados na literatura para o tratamento de TDAH, assim como para o tratamento de TEPT. Inicialmente, foram testadas várias doses (0,5 mg/kg — 10 mg/kg) e tempos de administração (5, 10 e 20min) (dados preliminares não mostrados). Conforme o que foi demonstrado em trabalhos anteriores, o efeito do fármaco foi dependente do tempo de administração (Fig. 4). Aqui, encontramos que MFD na dose de 3 mg/kg e 10 mg/kg, 10min antes da reativação gerou um efeito na atenuação do congelamento durante a reativação (Fig. 1), sendo um efeito que ocorreu só durante a sessão e foi específico quando MFD foi administrado antes da sessão.

Este achado inicial nos levou a pensar que sessões sucessivas poderiam ser efetivas para incorporar na memória esse novo estado emocional associado a um efeito antiaversivo ou pelo aumento da locomoção. Efetivamente, três sessões foram suficientes para atenuar a memória de medo, como mostrado no teste e 20 dias após, além disso, o efeito foi independente dos mecanismos da reconsolidação (Fig. 2). De maneira interessante, quando MFD foi testado antes da sessão de extinção a memória apresentou um prejuízo no teste para a dose de 3 mg/kg (Fig. 3). Por último, foi comprovado que as doses aqui utilizadas de MFD geram um efeito de preferência contextual e um aumento da atividade locomotora só na dose de 10 mg/kg. Os resultados deste primeiro trabalho mostraram que sessões periódicas sob o efeito de MFD permitiram a atualização da memória, seja pelo estado positivo associado com a valência gratificante da droga durante a reativação, ou pelo aumento da atividade locomotora na dose de 10 mg/kg.

Até aqui, os achados encontrados sustentam o postulado que a reativação de uma memória de medo através de várias sessões sobre um estado emocional gratificante conduz a sua

reconsolidação. Para o próximo trabalho foi pensado uma categoria de intervenção não farmacológica, considerando-se as variações do ciclo circadiano, considerando trabalhos prévios que indicam que durante a fase ativa os ratos expressam um nível de congelamento menor, apresentam aumento nos níveis de corticosterona e maior liberação de alguns neurotransmissores.

No **capítulo II** nos perguntamos se sessões de reativação da memória durante a fase ativa (ciclo escuro) seriam melhores que durante a fase inativa (ciclo claro) para atenuar a memória de medo. Ratos foram treinados no CAC durante o ciclo claro e a memória de medo foi reativada no ciclo claro ou escuro, e posteriormente testada no dia seguinte no ciclo claro. Durante a reativação da memória no ciclo escuro, os ratos mostraram uma diminuição da expressão de congelamento em comparação com o grupo controle (ciclo claro), mas sem efeito no teste (Fig. 1). Em seguida, realizou-se uma reexposição de tempo maior para avaliar algum efeito na aceleração de extinção, mas o resultado foi o mesmo: sem efeito no teste (Fig. 2B). Isto sugere que durante o ciclo escuro a memória é evocada com uma diminuição na expressão de congelamento, efeito que nos levou a pensar que através de reativações sucessivas a memória poderia ser atualizada; assim, foi encontrado que ao longo das reativações a expressão de congelamento foi decaindo, apresentando um nível menor no teste, comparado com o outro grupo (Fig. 2F). Curiosamente, no experimento seguinte avaliamos esta intervenção na memória de extinção, embora quando o grupo reativado de noite teve uma aceleração na atenuação do congelamento, no teste mostrou ter o mesmo efeito que o grupo que passou pela extinção no ciclo claro.

Como mencionado anteriormente, o aumento dos glicocorticóides durante a fase ativa seria o principal candidato para explicar os efeitos encontrados no ciclo escuro; assim, avaliou-se a administração de um inibidor (metirapona) antes de cada sessão de reativação, conseqüentemente, encontrou-se que o efeito na atenuação da memória reativada durante o ciclo escuro foi revertido (Fig. 3). Finalmente, controles foram feitos para avaliar se o condicionamento da memória poderia ser afetado pelo ciclo em que animal recebeu o treino, e se teria alguma diferença na atividade locomotora. Aqui, foi encontrado que independente do ciclo que o treino foi realizado não há interferência na formação da memória, isto concorda com as descobertas da literatura, mas não foram observadas diferenças na atividade locomotora entre ciclos, o que poderia ser devido ao registro metodológico utilizado nesse experimento. Nesse último trabalho foi mostrado que aproveitando a atenuação da expressão da memória na fase que os ratos são mais ativos e quando os níveis de corticosterona estão elevados, foi possível atenuar a expressão da memória de medo.

Para a seguinte intervenção realizada nesta tese consideraram-se estudos que reportaram os efeitos do suporte social na inibição da expressão do medo. A hipótese principal era que a exposição de uma fêmea durante a reativação de uma memória aversiva em machos representaria um estímulo gratificante, tendo em vista sua valência social e sexual, potencial para atenuar a memória aversiva e promover sua atualização.

Para testar nossa hipótese no **capítulo III**, desenhou-se uma sessão de reativação da memória de medo de 12 minutos: exposição prévia do rato treinado por 3 minutos e depois a apresentação de um coespecífico pelos próximos 9 minutos. Os primeiros 3 minutos para evocar a memória ao contexto serviriam como gatilho para desestabilizar/labilizar seu traço e assim favorecer os mecanismos da reconsolidação com a incorporação do coespecífico ao contexto. Considerando o efeito da familiaridade, um grupo de machos passou por uma sessão de interação com uma fêmea um dia após o treino (fêmea familiar) por 30 minutos, ou até o dia seguinte (fêmea até o próximo dia/*overnight*) separados só antes da reativação. 48 horas após o treino, os machos foram reexpostos ao CAC (sem choque) para a sessão de reativação (sozinhos por 3 minutos seguido pela apresentação da fêmea: familiar, *overnight*, ou não conhecida), o grupo controle não passou pela interação social, só foi exposto ao CAC sozinho (Fig. 1A). Foi mostrado que durante a exposição da fêmea, os machos apresentaram atenuação do congelamento, mas só o grupo exposto com a fêmea familiar ou durante a noite teve uma atenuação da memória de medo no teste, sem retorno dela em testes posteriores (Fig. 1 C, D). Considerou-se que a familiaridade através da sessão de interação social ou durante a noite tinha o mesmo efeito, assim, para próximos experimentos foi realizado só o protocolo de interação social para o grupo com fêmeas familiares.

Com o propósito de avaliar esse efeito em uma sessão mais longa, no próximo experimento realizou-se uma sessão de 15 minutos, com as mesmas condições experimentais anteriormente mencionadas. De maneira interessante, o mesmo efeito foi encontrado na sessão de teste, o grupo que passou pela reativação com uma fêmea familiar teve uma atenuação da memória de medo (Fig. 1 E, G).

No próximo experimento avaliamos se o efeito encontrado anteriormente poderia ser também facilitado pela apresentação de outro macho, assim, para corroborar nossa hipótese inicial, mesmas condições experimentais foram mantidas (Fig. 1H). Durante a reativação os machos treinados com exposição do coespecífico expressaram uma atenuação do congelamento, tratando-se de uma resposta temporal, pois os efeitos não foram encontrados no teste (Fig. 1I-K). Esses resultados corroboraram nossa hipótese, o que nos levou a testar se esse efeito na memória com apresentação de um coespecífico familiar do sexo oposto também poderia estar presente em

fêmeas (Fig. 1L). Assim, fêmeas expostas a machos familiares durante a reativação, expressaram um nível de congelamento menor ao grupo controle, mas não foram encontrados efeitos no teste (Fig. 1M, N). Os resultados encontrados até aqui permitiram-nos demonstrar que este efeito da atenuação da memória era específico em machos com exposição para fêmeas familiares. Desde que esse efeito foi encontrado quando a fêmea foi apresentada no CAC após a reativação da memória aversivo no macho, nos próximos experimentos nos perguntamos se a evocação da memória no contexto de medo era necessária antes da exposição da fêmea (Fig. 2).

Assim, foi demonstrado que a reativação da memória no macho era necessária antes da exposição da fêmea, pois quando eles foram re-expostos em simultâneo, não foram encontrados efeitos na sessão de teste (Fig. 2B, C). Considerou-se que a atenuação da memória poderia ser consequência de um efeito isolado dos mecanismos de suporte social (tamponamento do medo) e se só a exposição da fêmea fora do contexto poderia ter algum efeito (Fig. 2D, G) após os 12 ou 3 minutos de reativação. Aqui, foi demonstrado que a apresentação concomitante da fêmea no contexto aversivo era necessária para conduzir à atualização da memória de medo (Fig. 2F, I). Validando nossa hipótese que o efeito encontrado na atenuação da memória de medo seria conduzido pelos mecanismos da reconsolidação.

Por outro lado, foi importante responder se a atenuação da memória nos machos expostos com fêmeas poderia ser também conduzida através de uma sessão de extinção (Fig. 3A). Curiosamente, a formação da memória de extinção foi prejudicada no grupo exposto com fêmeas, na sessão de teste realizada um dia após (Fig. 3B, C).

Finalmente, buscamos responder os mecanismos envolvidos na atualização da memória dos machos com exposição das fêmeas (Fig. 4). Os principais candidatos mencionados na literatura foram a ocitocina e a dopamina. Para testar seus efeitos, as mesmas condições experimentais foram mantidas, um antagonista seletivo de receptores do tipo dopamina D1 (SCH) foi administrado intra-HPC antes da sessão de reativação (Fig. 4A). Consequentemente, o bloqueio dos receptores de dopamina impediu o efeito na atenuação da memória (Fig. 4AB-C). Em seguida, o mesmo protocolo foi realizado e um bloqueador dos receptores de OT foi administrado (atosiban) (Fig. 4D), seu efeito inibiu a atenuação da memória de medo, como registrado na sessão de teste (Fig. 4 E, F). Com o propósito de corroborar esse último achado e testar se a liberação da OT era dependente da exposição da fêmea, no último experimento OT foi infundida no HPC antes da sessão de reativação simulando o efeito da fêmea (Fig. 4G, H). Resultados na sessão de teste mostraram que o grupo infundido com OT teve uma redução do congelamento comparada ao grupo controle (Fig. 4 I). Os resultados deste último experimento permitem concluir que a

ativação dos receptores de dopamina (D1, D5) e ocitocina no hipocampo medeiam o efeito na atualização das memórias de medo em machos que passaram pela reativação com a exposição de uma fêmea conhecida.

Tendo em conta os efeitos encontrados com a administração de OT no hipocampo na atenuação da memória e a escassa literatura avaliando este efeito, decidimos estudar sua participação na memória de medo contextual.

O **capítulo IV** buscou estudar o papel da ocitocina no hipocampo no protocolo de condicionamento aversivo ao contexto. No primeiro experimento deste capítulo avaliou-se o papel da ocitocina na aquisição da memória, utilizando duas doses a partir de dados registrados na literatura (Fig. 1 A). Encontrou-se que a dose mais baixa de OT (0,033) teve um efeito de prejuízo na aquisição da memória (Fig. 1B), sendo esta a dose utilizada para os próximos experimentos. Para avaliar se esse efeito da OT no teste poderia ser observado também na consolidação da memória a curto prazo, OT foi administrada após treino e a sessão de teste foi realizada 2 horas após (Fig. 1C), mas não foram encontrados efeitos (Fig. 1D.). Em seguida, avaliamos se o efeito na consolidação seria dependente do sexo, para isso as mesmas condições experimentais foram feitas e OT pré-treino foi infundida em fêmeas (Fig. 1E); não obstante, efeitos não foram encontrados na sessão de teste (Fig. 1F). Posteriormente, para avaliar os efeitos da OT após reativação da memória, realizou-se uma sessão curta de reativação e uma sessão de 12 minutos e OT foi infundida no HPC imediatamente após (Fig. 2A, D). Na sessão de 6 minutos, OT não teve efeito na sessão de teste (Fig. 2C), enquanto após a reativação de 12 minutos, efeitos significativos foram encontrados no teste, e o grupo que recebeu OT teve uma atenuação da memória (Fig. 2F). No experimento seguinte foi avaliado o efeito de OT no hipocampo, na aquisição e na consolidação da memória do medo (Fig. 3A, D). Os resultados sugerem que o grupo que recebeu OT antes da sessão de extinção não teve efeito algum, assim como, na sessão de teste (Fig. 3B, C), o que não diferiu quando OT foi administrada após treino de extinção, os grupos não mostraram diferenças no teste (Fig. 3 E, F).

Uma vez descrito os resultados encontrados nesta tese, surgem diversas questões que necessitam discussão. Primeiramente discutiremos se as intervenções utilizadas aqui apresentam elementos em comum que estariam conduzindo à atenuação da memória.

7.1 Atenuando a expressão de medo com estímulos gratificantes: efeitos na atualização da memória

Como descrito anteriormente, aproveitando o estado lábil de uma memória durante sua reativação, ela é susceptível a incorporar um novo estado emocional, atenuando conseqüentemente sua expressão. A base das intervenções avaliadas aqui tinha em comum o fato de serem estímulos com propriedades gratificantes ou recompensadoras com efeitos associados a um aumento do estado de alerta e amortizador da resposta de estresse. Assim, nossa hipótese principal foi que a apresentação desses estímulos durante a reativação conduziria a memória para sua atualização.

No **capítulo 1**, foi usado MFD, um psicoestimulante que inibe a recaptação de dopamina e noradrenalina, com efeitos gratificantes reportados para as doses usadas aqui, 3 e 10 mg/kg. No **capítulo 2**, reativações no ciclo escuro ou fase ativa dos ratos, ciclo caracterizado pelo aumento da liberação de glicocorticóides e de neurotransmissores como dopamina, noradrenalina e serotonina. O **capítulo 3**, evidenciou o efeito da exposição de uma fêmea durante a reativação da memória de medo em ratos machos, propriedades gratificantes associadas pela interação social e sexual, ativando a liberação de dopamina e oxitocina no hipocampo. Quanto ao **capítulo 4**, foi mostrado o efeito da OT no hipocampo na reativação de medo ao contexto, associada principalmente pelas suas propriedades gratificantes na interação social, e pelas suas sinalizações para o NAc.

Estudos prévios reportam a participação da dopamina, noradrenalina, glicocorticóides e ocitocina na reconsolidação de memórias aversivas (Wideman et al., 2018), mas intervenções comportamentais como as realizadas aqui com exposição de coespecífico do sexo oposto e reativações da memória na fase ativa dos ratos são as primeiras nessa linha, trazendo uma contribuição significativa para o estudo de terapias não farmacológicas.

É importante mencionar que o efeito encontrado na atualização da memória respondeu a um planejamento da dose, tempo e configuração da sessão de reativação para cada uma das intervenções utilizadas aqui:

No caso de MFD no **capítulo I** o efeito encontrado na atenuação da memória foi específico para as doses de 3 e 10 mg/kg, curiosamente, MFD 3 mg/kg teria o efeito terapêutico equivalente à dose usada em humanos (Kuczenski & Segal, 2005; Gerasimov et al., 2000); o tempo de administração foi 10 minutos antes da sessão de reativação, tempo onde as concentrações máximas de dopamina são alcançadas após sua administração (Shimizu et al.,

2019). De maneira interessante, quando a droga foi administrada 30 minutos antes na prova de preferência contextual, ou antes, da sessão de reativação, não foram encontrados efeitos. Isso demonstra que enquanto o MFD gerou um estado gratificante no contexto aversivo facilitou a atualização da memória.

No **capítulo II**, as sessões de reativações no ciclo escuro foram realizadas a partir das 20 h quando os glicocorticóides atingem níveis altos (Pace-Schott et al., 2013), assim como a liberação de neurotransmissores próprios do ciclo circadiano associados com o aumento da dopamina, serotonina e noradrenalina; isto corrobora com que o estado endógeno do animal durante a reativação levou à atenuação da memória. De fato, como demonstrado nos resultados, quando os ratos receberam um inibidor da síntese de glicocorticóides (metirapona) o efeito na atenuação da memória foi bloqueado.

Para o **capítulo III**, a incorporação de uma fêmea familiar durante a reativação de uma memória de medo em machos após sua evocação conduz a atenuação da memória de medo, sendo um efeito mediado pelos receptores de dopamina e ocitocina no hipocampo. Aqui, nossa hipótese foi que a apresentação da fêmea como estímulo gratificante para o macho conduziria a reconsolidação da memória, três minutos de evocação prévia nos machos foram pensados para levar à memória para desestabilizar/labilizar seu traço mnemônico. Interessantemente, este efeito esteve ausente em fêmeas quando machos foram apresentados, o que será discutido em um próximo tópico. Finalmente no **capítulo IV**, estudando o efeito de OT no hipocampo, encontrou-se um prejuízo na consolidação da memória apenas em machos e um efeito na atenuação da memória aversiva quando administrada pós-reativação.

Uma consideração importante sobre os resultados deste trabalho foi o efeito dependente das intervenções concomitante com a exposição ao contexto aversivo, no caso de MFD (Capítulo I) e a exposição com fêmea familiar (capítulo III). Na administração de MFD efeitos não foram encontrados pós-reativação ou sem a exposição ao contexto, embora MFD apresente propriedades de reforço cognitivo, aqui poderíamos salientar suas propriedades gratificantes que concomitantemente com a exposição ao contexto levou à atualização da memória aversiva ou associadas com o aumento da atividade locomotora para a dose de 10 mg/kg.

No caso da exposição com fêmea, sua apresentação prévia ou depois do contexto não gerou efeitos na memória, demonstrando que não se tratava de um efeito de suporte social fora do contexto, como já foi registrado na literatura com o uso de coespecíficos (Kiyokawa & Hennessy, 2018; Liu, 2016; Mikami et al., 2020); inclusive, a apresentação da fêmea durante toda a sessão de reativação (12 minutos) não gera efeito algum, tendo em vista que a memória

precisou estar em um estado potencial para labilizar-se e só depois a exposição da fêmea no contexto aversivo levou à atualização da memória. Os resultados apresentados aqui concordam com trabalhos anteriores do nosso grupo, onde a administração da cafeína e apresentação de chocolate concomitantes com a exposição ao contexto foram necessários para a atualização da memória (Haubrich et al., 2015; Pedraza et al., 2018).

Para ter um efeito na atualização da memória, sessões sucessivas foram necessárias com MFD e reativações no ciclo escuro, enquanto a exposição com fêmea apenas uma sessão foi suficiente. Uma das possíveis interpretações estaria associada com as modulações endógenas na manutenção do efeito em cada intervenção e a expectância do erro de predição.

O erro de predição pode determinar o destino da memória após sua evocação sendo a diferença entre o esperado (estímulo incondicionado) e o encontrado, um maior erro de predição estaria associado a formação da memória de extinção, enquanto um menor erro levaria a sua atualização, porém existe um estado chamado “limbo” onde o destino da memória pode não ser específico (Merlo et al., 2014; Sevenster et al., 2014).

Assim, o MFD (ativação de um estado interno) e uso do ciclo escuro envolvem estímulos internos, enquanto a apresentação da fêmea um estímulo externo; ambos inibem a expressão de medo, mas os efeitos endógenos no estado emocional poderiam ser mantidas de forma diferenciada. O efeito do estado emocional nas duas primeiras intervenções tanto gratificante, poderia ser, mais flutuante na sua manutenção que a representação de um estímulo externo como a apresentação de uma fêmea, o estado emocional pode ser mantido por mais tempo tornando-se menos susceptível de variáveis endógenas para sua manutenção.

É importante salientar que o efeito com a exposição da fêmea, só foi encontrado quando a memória no macho foi reativada previamente, isso quer dizer que ainda quando a incorporação do estímulo gratificante seja mantido durante a sessão, a memória precisa ser labilizada. Diferentemente nos capítulos I e II onde o efeito foi junto a exposição ao contexto. Outro fator para considerar a modulação do erro de predição. A apresentação da fêmea no contexto enquanto estímulo gratificante (externo) poderia ter levado para um menor erro de predição, enquanto às duas primeiras intervenções sem evocação previa da memória e mais susceptíveis de flutuações endógenas, a predição do erro poderia ter sido leve porém mais inespecífica.

Em conclusão, a incorporação do estímulo com propriedades gratificantes (nos diferentes capítulos) foi modulada por sua força e intensidade, gerando um estado emocional diferenciado durante a exposição ao contexto.

Assim, estímulos endógenos precisariam de mais sessões com a reativação da memória para ela se tornar susceptível de incorporar essa nova informação ou estado emocional e ser atualizada enquanto usando um estímulo externo a atualização da memória foi mais imediata

(Chen et al., 2021). Isto levanta a questão se o efeito quantitativo ou qualitativo do estímulo apresentado poderia mediar a mudança na valência da memória e posteriormente sua atualização.

7.2. Interferindo na atualização ou acelerando a extinção

Segundo a literatura, não está claro se as intervenções baseadas no contracondicionamento para a atualização de memórias se tratam de um mecanismo que permitiria a facilitação de extinção ou do fato do contracondicionamento estar gerando uma reconsolidação da memória (Keller et al., 2020). Entretanto, o tempo de reativação da memória pode designar seu destino. Assim, sessões curtas levam à desestabilização da memória, 4 minutos conduziria para sua reconsolidação, 12 minutos pode entrar em um estado de limbo (extinção ou reconsolidação), e sessões de 30 minutos geram extinção (Suzuki et al., 2004).

Uma observação metodológica nos experimentos foi o uso do protocolo de recuperação espontânea e reinstalação como testes controles para avaliar a suscetibilidade do retorno da memória de medo após as intervenções, mesmo quando o grupo controle passou ou não por um protocolo de formação de memória de extinção.

Esta consideração precisa ser discutida em nossos protocolos, embora no uso do MFD e nas reativações no ciclo escuro e várias reativações foram necessárias, acreditamos que nossos resultados suportam a ideia que intervenções contracondicionantes estariam agindo na reconsolidação da memória. No caso de MFD foi mostrado que no teste de recuperação espontânea a memória não teve retorno, inclusive, como apresentado através das reativações, o grupo controle não teve uma queda do congelamento ao longo das reativações, indicador que o protocolo não levaria a uma atenuação do congelamento assim como quando foi usado um inibidor da desestabilização (nimodipina), efeitos não foram encontrados. No caso das reativações no ciclo escuro ambos os grupos tiveram uma diminuição do congelamento ao longo das sessões (Fig. 2 D), mas quando testados no ciclo onde foram treinados (claro) só o grupo reativado no ciclo escuro teve um nível de congelamento mais baixo. Porém, sessões posteriores não foram realizadas para testar o efeito na extinção, aqui acreditamos que os mecanismos poderiam ser reconsolidação considerando dois fatores, primeiro os níveis de corticosterona além do estado gratificante próprio do ciclo escuro seriam um gatilho para sua atualização, por outro lado, o tempo de reativação entre sessões foi de 2 dias, tratando-se de reativações periódicas e não crônicas, o que facilitaria o processo de reconsolidação (Elsley & Kindt, 2018; de Oliveira Alvares et al., 2013). Interessantemente, inicialmente um estudo piloto foi realizado com um intervalo de 24 horas entre as reativações, e resultados no teste não mostraram diferenças entre os grupos, pelo que foi preciso aumentar o tempo entre as reativações.

7.3. Atenuação da expressão de medo e prejuízo na extinção

Um resultado em comum dos capítulos I e III foi o efeito na sessão de extinção. Em ambos casos, a administração de metilfenidato ou a exposição de uma fêmea na sessão de extinção prejudicaram a formação da memória de extinção, como observado pelo aumento do congelamento na sessão de teste. Nossas descobertas são as primeiras desse reportadas na literatura usando coespecífico de diferente sexo. Embora tenha sido um efeito que nós esperávamos encontrar, seus efeitos podem ser atribuídos ao mecanismo de ação das intervenções, em ambos os casos, um aumento dos níveis de dopamina e noradrenalina estariam sendo liberados durante a sessão. A literatura reporta que o comportamento de tipo estressor e o aumento da liberação de noradrenalina em conjunto com a amígdala participam na modulação da memória de extinção, pelo que níveis altos podem prejudicar sua formação (Giustino & Maren, 2018). De fato, nos machos a interação com fêmeas pode acarretar um aumento nos níveis de glicocorticóides e se tornar uma experiência benéfica ou de prejuízo, dependendo do tempo de interação (Garrat et al., 2016).

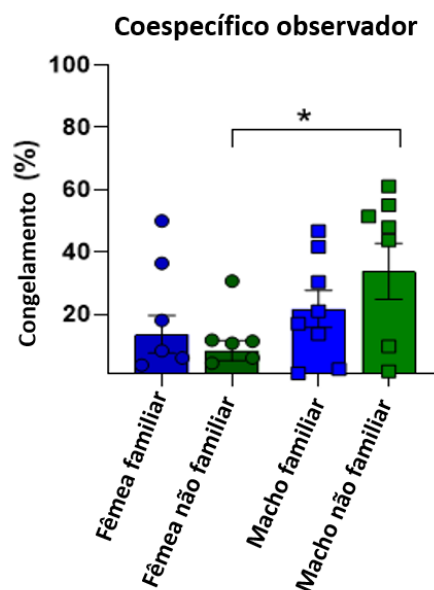
Por outro lado, uma das características principais para prever a reconsolidação ou extinção na reativação de memórias aversivas é o tempo de reativação e como consequência o erro de predição como descrito anteriormente, assim, um erro de predição leve facilita a reconsolidação, enquanto um erro de predição alto leva a formação de memória de extinção (Sevenster, et al., 2014).

Nos resultados do MFD, é possível observar que os animais na dose de 3 mg/kg tiveram uma atenuação do congelamento ao longo da sessão, enquanto na dose de 10 mg/kg a expressão do congelamento foi inibida, mesmo no caso da apresentação da fêmea. Em ambos experimentos os níveis do grupo intervenção foram altos em comparação com o grupo controle gerando um prejuízo na consolidação da memória de extinção, embora a diferença estatística de MFD foi na dose de 3 mg/kg. Aqui, os efeitos cognitivos do MFD poderiam ter conduzido a uma alteração do erro de predição, prejudicando a memória da extinção, assim mesmo, no caso da inibição da expressão do medo para MFD na dose de 10 mg/kg (aumento da atividade locomotora) e da exposição da fêmea na sessão de extinção, interferido a aquisição da memória de extinção como observado ao longo da sessão. Cabe salientar que nossos achados podem ser considerados para seu uso em humanos, repensando sua aplicação em terapias de exposição.

7.4. Fêmeas são o melhor suporte para atenuar o medo em machos?

Descobertas anteriores mostram que a apresentação de uma fêmea para um macho representa um estímulo atraente, tanto social quanto sexual, capaz de diminuir a resposta de ansiedade e medo como demonstrado em estudos de suporte social (Yost et al., 2019; Chari, 2020). Este efeito de suporte também tem sido demonstrado entre machos e entre fêmeas, mostrando efeitos promissores entre coespecíficos familiares. Os resultados mostrados no capítulo III mostram que a apresentação de uma fêmea familiar na reativação da memória de medo em machos gera um efeito na atualização da memória. Mas o fato de não encontrar esse efeito em fêmeas ou mesmo entre machos levanta questões que devem ser respondidas.

Em primeiro lugar, deve se ter em conta que nos protocolos de interação social no comportamento de medo, estão presentes dois paradigmas, um efeito de tamponamento onde o coespecífico observador reduz o medo do rato que expressa resposta de estresse, e um efeito de contágio emocional onde o coespecífico treinado gera uma resposta de estresse no observador, o que aumenta nele a resposta de medo. Resultados na literatura sugerem que o contágio emocional entre sexos não apresenta diferenças, embora entre interações de sexo diferente não fica claro (Dumais & Veenema, 2016). Com o propósito de avaliar esta variável, o coespecífico observador foi exposto à câmara de condicionamento, 48 horas após da sessão de exposição com o rato treinado, níveis de congelamento foram registrados e comparados entre os grupos de ratos que foram observadores. Aqui foi encontrado que os níveis de congelamento entre os observadores machos foi maior, mas estatisticamente só entre machos e fêmeas não familiares.



Anexo 1. Comportamento de medo no coespecífico observador.

Este indicador sugere que os machos são mais susceptíveis a expressar contágio emocional que as fêmeas, o que sugere que as fêmeas poderiam ter maiores recursos para atenuar as respostas de medo em machos e incorporar menos a resposta de medo deles. O que poderia ser corroborado pelas diferenças na expressão de ocitocina (Dumais & Veenema, 2016). Agora, isso poderia responder o porquê as fêmeas não conseguiram atualizar a memória de medo considerando o fator de interesse social.

Tanto machos quanto fêmeas evitam interagir com um coespecífico não familiar, entretanto, existem algumas variações para familiares. Por exemplo, fêmeas demonstram uma preferência para interagir com coespecíficos familiares, inclusive se estão estressados, enquanto machos os evitam (Rogers-Carter et al., 2018). No entanto, trabalhos sugerem que as fêmeas consideram as interações do mesmo sexo mais gratificantes do que os machos (Borland, et al. 2019). Considere-se que as fêmeas sejam mais sensíveis às propriedades compensadoras e aversivas das interações sociais do que os machos, de forma que seria necessária menos interação social para produzir os mesmos níveis de recompensa social, em comparação com os machos. Esse sistema de recompensa teria seus efeitos em forma de U invertida, no aumento de OT na VTA, assim, machos são menos sensíveis aos efeitos de aumento de OT, e que concentrações crescentes de OT aumentam inicialmente a recompensa, mas podem posteriormente conduzir a uma resposta aversiva em concentrações mais elevadas.

As considerações anteriormente descritas podem responder que efetivamente as fêmeas podem se tornar mais susceptíveis a atenuar a resposta da memória de medo em machos por um menor contágio do medo, e por representar um estímulo gratificante tanto social pelo aumento dos níveis de oxitocina no macho quanto sexual pelos mecanismos da dopamina. Interessantemente, em modelos animais a preferência condicionada por parceiros sociais/sexuais do mesmo sexo pode desenvolver-se durante a coabitação sobre uma atividade D2 ou OT reforçada (Triana-Del Rio et al., 2015). Uma pergunta que ficaria por responder em fêmeas treinadas ao CAC é se a exposição de outra fêmea familiar poderia ser melhor que um macho para conduzir a atenuação da resposta de medo em uma sessão curta de extinção.

7.5. Ocitocina modula a aquisição de memórias aversivas, efeito dependente do sexo

Ocitocina é necessária para a formação da memória de extinção, mas seus efeitos dependente do sexo não parece estar claro. No capítulo IV, quando OT foi administrada após a sessão de treino de CAC, em ratos machos gerou um prejuízo na consolidação, enquanto em fêmeas teve um ligeiro aumento nos níveis de congelamento comparado com o grupo controle (diferenças não significativas), assim seria importante trazer algumas considerações reportadas na literatura.

Os parâmetros de ocitocina segundo o sexo em ratos, não tem sido quantificado, embora, fêmeas mostram frequentemente uma maior expressão, enquanto machos mostram maior quantidade de receptores (Dumais & Veenema, 2016), pelo que níveis mais baixos em fêmeas devem ser considerados para conseguir efeitos similares de OT quando usada em machos (Lu & Hu, 2021). Outra consideração seria a distribuição de U invertida, níveis maiores para gerar uma resposta ótima, podem gerar uma resposta de estresse ou aversiva nesses animais (Borland et al., 2019).

Assim, seria importante estudar o efeito dose dependente de OT para machos e fêmeas especialmente no hipocampo, onde não se encontra com literatura suficiente, e nossos achados representam os primeiros nessa área.

7.6. Alcance das intervenções em pesquisa com humanos.

O uso de estímulos gratificantes, ou seja, a indução de um estado positivo após a reativação de memórias aversivas, resulta em um importante alvo de intervenção em humanos para estudar os mecanismos de reconsolidação de memórias com intervenções baseadas no contracondicionamento. Inclusive, tem sido demonstrado que a ativação de um engrama de memória positiva é suficiente para conter a expressão de memórias negativas e facilitar sua atualização com uma valência menos aversiva (Ramirez et al., 2015; Redondo et al., 2014).

A manipulação da memória durante a reconsolidação abriu oportunidades para atualizar memórias indesejadas. Em humanos, o foco de intervenções encontra-se nas memórias episódicas. Até agora, as memórias autobiográficas têm demonstrado ser passíveis de reconsolidação (St. Jacques et al., 2013). Intervenções mostraram que a utilização de tarefas geradoras de estresse ou novas aprendizagens durante a reativação de memórias autobiográficas prejudicou a sua reconsolidação, apenas em neutras (Schwabe & Wolf, 2009, 2010); em outro trabalho, foi demonstrado que um período de sono após a evocação pode beneficiar a reconsolidação adaptativa de memórias autobiográficas aversivas (Azza et al., 2022). Na linha de intervenções contracondicionantes, Piñeyro et al. (2018) utilizou estímulos positivos (imagens) após a evocação de memórias autobiográficas negativas e mostrou ser possível reconsolidar a representação negativa para estas memórias, mas apenas em mulheres. Estas descobertas apresentadas até aqui realçam as propriedades dinâmicas das memórias autobiográficas, e sua susceptibilidade para a reconsolidação do seu conteúdo (Lempert et al., 2017).

8. CONCLUSÕES

A figura a seguir mostra os resultados de acordo com cada capítulo





Capítulo/ Resposta na memória	Reconsolidação	Extinção	Mecanismos envolvidos
1 	↓ memória de medo (3 sessões)	↑ memória de medo	↑ Preferência de lugar condicionada ↑ atividade locomotora
2 	↓ memória de medo (3 sessões)	—	✗ Inibição da síntese dos glicocorticóides.
3 	↓ —	↑ memória de medo	✗ Bloqueio dos receptores hipocampais D1/D5 e oxitocina
4 	↓	—	Aquisição da memória ↓

Figura 7. Conclusões por capítulo

Capítulo 1. Reativações sucessivas sob o efeito da administração de metilfenidato levaram à atenuação da memória do medo por meio da reconsolidação, enquanto em uma sessão de extinção foi encontrada um prejuízo; entre os mecanismos envolvidos encontrase o efeito de preferência condicionada e o aumento da atividade locomotora.

Capítulo 2. Foi demonstrado que sucessivas reativações da memória do medo no ciclo escuro levam à atenuação da memória de medo treinada e testada no ciclo claro, não foram encontrados efeitos na extinção; o principal mecanismo envolvido foi explicado pela inibição da síntese de glicocorticóides no início do ciclo escuro.

Capítulo 3. A apresentação de um co-específico de sexo oposto familiar é capaz de atualizar a memória do medo somente em machos. Enquanto em uma sessão de extinção, prejudica a aquisição da memória de extinção. Este efeito foi prevenido pela inibição dos receptores D1-dopamina e da ocitocina no hipocampo.

Capítulo 4. A administração de ocitocina no hipocampo após uma sessão de reativação da memória gerou um prejuízo na reconsolidação, entretando, não foram encontrados efeitos na extinção. Quando OT foi administrada na aquisição da memória do medo em machos e fêmeas, gerou um prejuízo na consolidação da memória somente em machos.

Os resultados apresentados nesta tese abrem novos caminhos de intervenções que poderiam ser utilizadas em humanos para atenuar a expressão de memórias aversivas, especialmente em programas com suporte social, ou através da reativação da memória de acordo com o ciclo circadiano e a liberação de glucocorticóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, A. D., Cunningham, C. L., & Lattal, K. M. (2012). Methylphenidate enhances extinction of contextual fear. *Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.024752.111>
- Acheson, D., Feifel, D., de Wilde, S., McKinney, R., Lohr, J., & Risbrough, V. (2013). The effect of intranasal oxytocin treatment on conditioned fear extinction and recall in a healthy human sample. *Psychopharmacology*, 229(1), 199–208. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3099-4>
- Aga-Mizrachi, S., Cymerblit-Sabba, A., Gurman, O., Balan, A., Shwam, G., Deshe, R., Miller, L., Gorodetsky, N., Heinrich, N., Tzezana, O., Zubedat, S., Grinstein, D., & Avital, A. (2014). Methylphenidate and desipramine combined treatment improves PTSD symptomatology in a rat model. *Translational psychiatry*, 4(9), e447. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.82>
- Ago, Y., Hasebe, S., Nishiyama, S., Oka, S., Onaka, Y., Hashimoto, H., Takuma, K., & Matsuda, T. (2015). The Female Encounter Test: A Novel Method for Evaluating Reward-Seeking Behavior or Motivation in Mice. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 18(11), pyv062. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv062>
- Albrecht, A., & Stork, O. (2017). Circadian Rhythms in Fear Conditioning: An Overview of Behavioral, Brain System, and Molecular Interactions. *Neural plasticity*, 2017, 3750307. <https://doi.org/10.1155/2017/3750307>
- Amiri, S., Jafarian, Z., Vafaei, A. A., Motaghed-Larijani, Z., Samaei, S. A., & Rashidy-Pour, A. (2015). Glucocorticoids interact with cholinergic system in impairing memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Basic and Clinical Neuroscience*, 6(3).
- Arellano Pérez, A. D., Popik, B., & de Oliveira Alvares, L. (2020). Rewarding information presented during reactivation attenuates fear memory: Methylphenidate and fear memory updating. *Neuropharmacology*, 171, 108107. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108107>
- Ayers, L. W., Missig, G., Schulkin, J., & Rosen, J. B. (2011). Oxytocin reduces background anxiety in a fear-potentiated startle paradigm: peripheral vs central administration. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(12), 2488–2497. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.138>
- Azza, Y., Wilhelm, F. H., Seifritz, E., Junghanns, K., Kleim, B., & Wilhelm, I. (2022). Sleep's role in updating aversive autobiographical memories. *Translational psychiatry*, 12(1), 117. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01878-1>
- Bai, H. Y., Cao, J., Liu, N., Xu, L., & Luo, J. H. (2009). Sexual behavior modulates contextual fear memory through dopamine D1/D5 receptors. *Hippocampus*, 19(3), 289–298. <https://doi.org/10.1002/hipo.20505>
- Baldi, E., Costa, A., Rani, B., Passani, M. B., Blandina, P., Romano, A., & Provensi, G. (2021). Oxytocin and Fear Memory Extinction: Possible Implications for the Therapy of Fear Disorders?. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 10000. <https://doi.org/10.3390/ijms221810000>
- Bazaz, A., Ghanbari, A., Vafaei, A. A., Khaleghian, A., & Rashidy-Pour, A. (2022). Oxytocin in dorsal hippocampus facilitates auditory fear memory extinction in rats. *Neuropharmacology*, 202, 108844. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108844>
- Boccia, M. L., Petrusz, P., Suzuki, K., Marson, L., & Pedersen, C. A. (2013). Immunohistochemical localization of oxytocin receptors in human brain. *Neuroscience*, 253, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.048>
- Borland, J. M., Rilling, J. K., Frantz, K. J., & Albers, H. E. (2019). Sex-dependent regulation of social reward by oxytocin: an inverted U hypothesis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), 97–110. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0129-2>

- Brem, A. K., Ran, K., & Pascual-Leone, A. (2013). Learning and memory. *Handbook of clinical neurology*, 116, 693–737. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53497-2.00055-3>
- Campbell-Smith, E. J., Holmes, N. M., Lingawi, N. W., Panayi, M. C., & Westbrook, R. F. (2015). Oxytocin signaling in basolateral and central amygdala nuclei differentially regulates the acquisition, expression, and extinction of context-conditioned fear in rats. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), 22(5), 247–257. <https://doi.org/10.1101/lm.036962.114>
- Carmack, S. A., Block, C. L., Howell, K. K., & Anagnostaras, S. G. (2014b). Methylphenidate enhances acquisition and retention of spatial memory. *Neuroscience letters*, 567, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.029>
- Carmack, S. A., Howell, K. K., Rasaei, K., Reas, E. T., & Anagnostaras, S. G. (2014a). Animal model of methylphenidate's long-term memory-enhancing effects. *Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.033613.113>
- Cavalli, J., Ruttorf, M., Pahi, M. R., Zidda, F., Flor, H., & Nees, F. (2017). Oxytocin differentially modulates pavlovian cue and context fear acquisition. *Social cognitive and affective neuroscience*, 12(6), 976–983. <https://doi.org/10.1093/scan/nsx028>
- Chari, T., Griswold, S., Andrews, N. A., & Fagiolini, M. (2020). The Stage of the Estrus Cycle Is Critical for Interpretation of Female Mouse Social Interaction Behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 113. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00113>
- Chaudhury, D., & Colwell, C. S. (2002). Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behavioural brain research*, 133(1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00471-5](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00471-5)
- Chen, W., Li, J., Xu, L., Zhao, S., Fan, M., & Zheng, X. (2021). Destabilizing Different Strengths of Fear Memories Requires Different Degrees of Prediction Error During Retrieval. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 598924. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.598924>
- Clark, J. W., Hoyer, D., Cain, S. W., Phillips, A., Drummond, S., & Jacobson, L. H. (2020). Circadian disruption impairs fear extinction and memory of conditioned safety in mice. *Behavioural brain research*, 393, 112788. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112788>
- Crestani, A. P., Zacouteguy Boos, F., Haubrich, J., Ordoñez Sierra, R., Santana, F., Molina, J. M., Cassini, L., Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2015). Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Scientific reports*, 5, 13633. <https://doi.org/10.1038/srep13633>
- Daan S. (2000). Learning and circadian behavior. *Journal of biological rhythms*, 15(4), 296–299. <https://doi.org/10.1177/074873000129001396>
- Dalm, S., Enthoven, L., Meijer, O. C., van der Mark, M. H., Karssen, A. M., de Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2005). Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology*, 81(6), 372–380. <https://doi.org/10.1159/000089555>
- De Oliveira Alvares, L., & Do-Monte, F. H. (2021). Understanding the dynamic and destiny of memories. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 125, 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.009>
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, 244, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>
- De Quervain, D., Wolf, O. T., & Roozendaal, B. (2019). Glucocorticoid-induced enhancement of extinction-from animal models to clinical trials. *Psychopharmacology*, 236(1), 183–199. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5116-0>
- de Quervain, D., Wolf, O. T., & Roozendaal, B. (2019). Glucocorticoid-induced enhancement of extinction-from animal models to clinical trials. *Psychopharmacology*, 236(1), 183–199.

- <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5116-0>
- Dölen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W., & Malenka, R. C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*, *501*(7466), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature12518>
- Donovan, M., Liu, Y., & Wang, Z. (2018). Anxiety-like behavior and neuropeptide receptor expression in male and female prairie voles: The effects of stress and social buffering. *Behavioural brain research*, *342*, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.015>
- Dudai Y. (1996). Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron*, *17*(3), 367–370. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80168-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80168-3)
- Dumais, K. M., & Veenema, A. H. (2016). Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*, *40*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.04.003>
- Dumais, K. M., & Veenema, A. H. (2016). Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*, *40*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.04.003>
- Elsej, J., Van Ast, V. A., & Kindt, M. (2018). Human memory reconsolidation: A guiding framework and critical review of the evidence. *Psychological bulletin*, *144*(8), 797–848. <https://doi.org/10.1037/bul0000152>
- Ernst, M., Lago, T., Davis, A., & Grillon, C. (2016). The effects of methylphenidate and propranolol on the interplay between induced-anxiety and working memory. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4390-y>
- Faraone S. V. (2018). The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *87*, 255–270. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.02.001>
- Feduccia, A. A., & Mithoefer, M. C. (2018). MDMA-assisted psychotherapy for PTSD: Are memory reconsolidation and fear extinction underlying mechanisms?. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, *84*(Pt A), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.03.003>
- Feldman R. (2012). Oxytocin and social affiliation in humans. *Hormones and behavior*, *61*(3), 380–391. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.01.008>
- Frijling J. L. (2017). Preventing PTSD with oxytocin: effects of oxytocin administration on fear neurocircuitry and PTSD symptom development in recently trauma-exposed individuals. *European journal of psychotraumatology*, *8*(1), 1302652. <https://doi.org/10.1080/20008198.2017.1302652>
- Furini, C. R. G., Behling, J. A. K., Zinn, C. G., Zanini, M. L., Assis Brasil, E., Pereira, L. D., Izquierdo, I., & de Carvalho Myskiw, J. (2017). Extinction memory is facilitated by methylphenidate and regulated by dopamine and noradrenaline receptors. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.027>
- Fuzzo, F., Matsumoto, J., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Ono, T., & Nishijo, H. (2015). Social buffering suppresses fear-associated activation of the lateral amygdala in male rats: behavioral and neurophysiological evidence. *Frontiers in neuroscience*, *9*, 99. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00099>
- Garratt, M., Kee, A. J., Palme, R., & Brooks, R. C. (2016). Male Presence can Increase Body Mass and Induce a Stress-Response in Female Mice Independent of Costs of Offspring Production. *Scientific reports*, *6*, 23538. <https://doi.org/10.1038/srep23538>
- Gerasimov, M. R., Franceschi, M., Volkow, N. D., Gifford, A., Gatley, S. J., Marsteller, D., Molina, P. E., & Dewey, S. L. (2000). Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *The Journal of pharmacology*

- and experimental therapeutics*, 295(1), 51–57.
- Giustino, T. F., & Maren, S. (2018). Noradrenergic Modulation of Fear Conditioning and Extinction. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12, 43. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00043>
- Godfrey, J. (2009). Safety of therapeutic methylphenidate in adults: A systematic review of the evidence. In *Journal of Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/0269881108089809>
- Grinevich, V., & Neumann, I. D. (2021). Brain oxytocin: how puzzle stones from animal studies translate into psychiatry. *Molecular psychiatry*, 26(1), 265–279. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0802-9>
- Hagewoud, R., Whitcomb, S. N., Heeringa, A. N., Havekes, R., Koolhaas, J. M., & Meerlo, P. (2010). A time for learning and a time for sleep: the effect of sleep deprivation on contextual fear conditioning at different times of the day. *Sleep*, 33(10), 1315–1322. <https://doi.org/10.1093/sleep/33.10.1315>
- Han, Y., Bruls, R., Soyman, E., Thomas, R. M., Pentaraki, V., Jelinek, N., Heinemans, M., Bassez, I., Verschooren, S., Pruis, I., Van Lierde, T., Carrillo, N., Gazzola, V., Carrillo, M., & Keyzers, C. (2019). Bidirectional cingulate-dependent danger information transfer across rats. *PLoS biology*, 17(12), e3000524. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000524>
- Harrison, E. M., Carmack, S. A., Block, C. L., Sun, J., Anagnostaras, S. G., & Gorman, M. R. (2017). Circadian waveform bifurcation, but not phase-shifting, leaves cued fear memory intact. *Physiology & behavior*, 169, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.033>
- Hartsock, M. J., & Spencer, R. L. (2020). Memory and the circadian system: Identifying candidate mechanisms by which local clocks in the brain may regulate synaptic plasticity. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 118, 134–162. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.023>
- Hasan, M. T., Althammer, F., Silva da Gouveia, M., Goyon, S., Eliava, M., Lefevre, A., Kerspern, D., Schimmer, J., Raftogianni, A., Wahis, J., Knobloch-Bollmann, H. S., Tang, Y., Liu, X., Jain, A., Chavant, V., Goumon, Y., Weislogel, J. M., Hurlemann, R., Herpertz, S. C., Pitzer, C., ... Grinevich, V. (2019). A Fear Memory Engram and Its Plasticity in the Hypothalamic Oxytocin System. *Neuron*, 103(1), 133–146.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.029>
- Herbst, E., McCaslin, S., & Kalapatapu, R. K. (2017). Use of stimulants and performance enhancers during and after trauma exposure in a combat veteran: A possible risk factor for posttraumatic stress symptoms. *American Journal of Psychiatry*. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.16010014>
- Hoge, E., Bui, E., Rosencrans, P., Orr, S., Ross, R., Ojserkis, R., & Simon, N. (2019). Influence of intranasal oxytocin on fear consolidation in healthy humans. *General psychiatry*, 32(6), e100131. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2019-100131>
- Hou, Y., Zhao, L., Zhang, G., & Ding, L. (2015). Effects of oxytocin on the fear memory reconsolidation. *Neuroscience letters*, 594, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.030>
- Hou, Y., Zhao, L., Zhang, G., & Ding, L. (2015). Effects of oxytocin on the fear memory reconsolidation. *Neuroscience letters*, 594, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.030>
- Houlihan, D. J. (2011). Psychostimulant treatment of combat-related posttraumatic stress disorder. *Journal of Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/0269881110385600>
- Hu, J., Wang, Z., Feng, X., Long, C., & Schiller, D. (2019). Post-retrieval oxytocin facilitates next day extinction of threat memory in humans. *Psychopharmacology*, 236(1), 293–301. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5074-6>
- Infurna, R. N., Steinert, P. A., & Spear, N. E. (1979). Ontogenetic changes in the modulation of taste aversion learning by home environmental cues in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(6), 1097–1108. <https://doi.org/10.1037/h0077625>
- Ishii, A., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2016). Social buffering ameliorates conditioned fear responses in female rats. *Hormones and behavior*, 81, 53–58.

- <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.03.003>
- Katche, C., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2013). Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiology of learning and memory*, *106*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.018>
- Keller, N. E., Hennings, A. C., & Dunsmoor, J. E. (2020). Behavioral and neural processes in counterconditioning: Past and future directions. *Behaviour research and therapy*, *125*, 103532. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2019.103532>
- Kelliher, P., Connor, T. J., Harkin, A., Sanchez, C., Kelly, J. P., & Leonard, B. E. (2000). Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. *Physiology & behavior*, *69*(4-5), 531–539. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(00\)00213-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00213-4)
- Kim, M., de la Peña, J. B., Cheong, J. H., & Kim, H. J. (2018). Neurobiological Functions of the Period Circadian Clock 2 Gene, *Per2*. *Biomolecules & therapeutics*, *26*(4), 358–367. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.131>
- Kiyokawa Y. (2017). Social Odors: Alarm Pheromones and Social Buffering. *Current topics in behavioral neurosciences*, *30*, 47–65. https://doi.org/10.1007/7854_2015_406
- Kiyokawa, Y., & Hennessy, M. B. (2018). Comparative studies of social buffering: A consideration of approaches, terminology, and pitfalls. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *86*, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.12.005>
- Kiyokawa, Y., Hiroshima, S., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2014b). Social buffering reduces male rats' behavioral and corticosterone responses to a conditioned stimulus. *Hormones and behavior*, *65*(2), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.12.005>
- Kiyokawa, Y., Honda, A., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2014a). A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behavioural brain research*, *267*, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.043>
- Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2007). Two types of social buffering differentially mitigate conditioned fear responses. *The European journal of neuroscience*, *26*(12), 3606–3613. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05969.x>
- Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Nishihara, M., & Mori, Y. (2009). Main olfactory system mediates social buffering of conditioned fear responses in male rats. *The European journal of neuroscience*, *29*(4), 777–785. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06618.x>
- Kiyokawa, Y., Wakabayashi, Y., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2012). The neural pathway underlying social buffering of conditioned fear responses in male rats. *The European journal of neuroscience*, *36*(10), 3429–3437. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08257.x>
- Klinzing, J. G., Niethard, N., & Born, J. (2019). Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nature neuroscience*, *22*(10), 1598–1610. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0467-3>
- Kuczenski, R., & Segal, D. S. (2005). Stimulant actions in rodents: implications for attention-deficit/hyperactivity disorder treatment and potential substance abuse. *Biological psychiatry*, *57*(11), 1391–1396. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.036>
- Kumar, T., & Jha, S. K. (2012). Sleep deprivation impairs consolidation of cued fear memory in rats. *PloS one*, *7*(10), e47042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047042>
- Lamont, E. W., Robinson, B., Stewart, J., & Amir, S. (2005). The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(11), 4180–4184. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500901102>
- Lazzari, V. M., Becker, R. O., de Azevedo, M. S., Morris, M., Rigatto, K., Almeida, S., Lucion, A. B., & Giovenardi, M. (2013). Oxytocin modulates social interaction but is not essential for sexual behavior in male mice. *Behavioural brain research*, *244*, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.025>
- Le Dorze, C., Borreca, A., Pignataro, A., Ammassari-Teule, M., & Gisquet-Verrier, P. (2020). Emotional remodeling with oxytocin durably rescues trauma-induced behavioral and neuro-morphological changes in rats: a promising treatment for PTSD. *Translational psychiatry*,

- 10(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0714-0>
- Le Dorze, C., Borreca, A., Pignataro, A., Ammassari-Teule, M., & Gisquet-Verrier, P. (2020). Emotional remodeling with oxytocin durably rescues trauma-induced behavioral and neuro-morphological changes in rats: a promising treatment for PTSD. *Translational psychiatry*, 10(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0714-0>
- Lee, J. L., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(39), 10051–10056. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2466-06.2006>
- Lempert, K. M., Speer, M. E., Delgado, M. R., & Phelps, E. A. (2017). Positive autobiographical memory retrieval reduces temporal discounting. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 12(10). <https://doi.org/10.1093/scan/nsx086>
- Levin, A. P., Kleinman, S. B., & Adler, J. S. (2014). DSM-5 and posttraumatic stress disorder. *The journal of the American Academy of Psychiatry and the Law*, 42(2), 146–158.
- Lieberwirth, C., & Wang, Z. (2016). The neurobiology of pair bond formation, bond disruption, and social buffering. *Current opinion in neurobiology*, 40, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.05.006>
- Liu, H., & Yuan, T. F. (2016). Physical Interaction Is Required in Social Buffering Induced by a Familiar Conspecific. *Scientific reports*, 6, 39788. <https://doi.org/10.1038/srep39788>
- Loewen, S. P., Baimoukhametova, D. V., & Bains, J. S. (2020). Sex-Specific Vasopressin Signaling Buffers Stress-Dependent Synaptic Changes in Female Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(46), 8842–8852. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1026-20.2020>
- Love T. M. (2018). The impact of oxytocin on stress: the role of sex. *Current opinion in behavioral sciences*, 23, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.06.018>
- Lozic M., Ludwig M. (2021) Oxytocin. In: Offermanns S., Rosenthal W. (eds) Encyclopedia of Molecular Pharmacology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57401-7_145
- Lu, Q., & Hu, S. (2021). Sex differences of oxytocin and vasopressin in social behaviors. *Handbook of clinical neurology*, 180, 65–88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00005-7>
- Malikowska-Racia, N., & Salat, K. (2019). Recent advances in the neurobiology of posttraumatic stress disorder: A review of possible mechanisms underlying an effective pharmacotherapy. In *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.02.001>
- McAllister, T. W., Zafonte, R., Jain, S., Flashman, L. A., George, M. S., Grant, G. A., He, F., Lohr, J. B., Andaluz, N., Summerall, L., Paulus, M. P., Raman, R., & Stein, M. B. (2016). Randomized Placebo-Controlled Trial of Methylphenidate or Galantamine for Persistent Emotional and Cognitive Symptoms Associated with PTSD and/or Traumatic Brain Injury. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.282>
- Melo, I., & Ehrlich, I. (2016). Sleep supports cued fear extinction memory consolidation independent of circadian phase. *Neurobiology of learning and memory*, 132, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.04.007>
- Menon, J., Nolten, C., Achterberg, E., Joosten, R., Dematteis, M., Feenstra, M., Drinkenburg, W., & Leenaars, C. (2019). Brain Microdialysate Monoamines in Relation to Circadian Rhythms, Sleep, and Sleep Deprivation - a Systematic Review, Network Meta-analysis, and New Primary Data. *Journal of circadian rhythms*, 17, 1. <https://doi.org/10.5334/jcr.174>
- Merlo, E., Milton, A. L., Goozée, Z. Y., Theobald, D. E., & Everitt, B. J. (2014). Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(7), 2422–2431. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4001-13.2014>
- Mikami, K., Kiyokawa, Y., Ishii, A., & Takeuchi, Y. (2020). Social buffering enhances extinction

- of conditioned fear responses by reducing corticosterone levels in male rats. *Hormones and behavior*, 118, 104654. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.104654>
- Missig, G., Ayers, L. W., Schulkin, J., & Rosen, J. B. (2010). Oxytocin reduces background anxiety in a fear-potentiated startle paradigm. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(13), 2607–2616. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.155>
- Mitchell, J. M., Bogenschutz, M., Lilienstein, A., Harrison, C., Kleiman, S., Parker-Guilbert, K., Ot'abora G. M., Garas, W., Paleos, C., Gorman, I., Nicholas, C., Mithoefer, M., Carlin, S., Poulter, B., Mithoefer, A., Quevedo, S., Wells, G., Klaire, S. S., van der Kolk, B., Tzarfaty, K., ... Doblin, R. (2021). MDMA-assisted therapy for severe PTSD: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Nature medicine*, 27(6), 1025–1033. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01336-3>
- Miyamoto, H., Nakamaru-Ogiso, E., Hamada, K., & Hensch, T. K. (2012). Serotonergic integration of circadian clock and ultradian sleep-wake cycles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(42), 14794–14803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0793-12.2012>
- Monfils, M. H., Cowansage, K. K., Klann, E., & LeDoux, J. E. (2009). Memoria y reconsolidación de dos procesos distintos.
- Morozov, A., & Ito, W. (2019). Social modulation of fear: Facilitation vs buffering. *Genes, brain, and behavior*, 18(1), e12491. <https://doi.org/10.1111/gbb.12491>
- Nader, K., & Einarsson, E. O. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1191, 27–41. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x>
- Naja, W. J., & Aoun, M. P. (2017). Oxytocin and Anxiety Disorders: Translational and Therapeutic Aspects. *Current psychiatry reports*, 19(10), 67. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0819-1>
- Neumann, I. D., & Landgraf, R. (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in neurosciences*, 35(11), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.08.004>
- Neumann, I. D., Wigger, A., Torner, L., Holsboer, F., & Landgraf, R. (2000). Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. *Journal of neuroendocrinology*, 12(3), 235–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00442.x>
- Pace-Schott, E. F., Germain, A., & Milad, M. R. (2015). Effects of sleep on memory for conditioned fear and fear extinction. *Psychological bulletin*, 141(4), 835–857. <https://doi.org/10.1037/bul0000014>
- Pace-Schott, E. F., Spencer, R. M., Vijayakumar, S., Ahmed, N. A., Verga, P. W., Orr, S. P., Pitman, R. K., & Milad, M. R. (2013). Extinction of conditioned fear is better learned and recalled in the morning than in the evening. *Journal of psychiatric research*, 47(11), 1776–1784. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.07.027>
- Piñeyro, M., Ferrer Monti, R. I., Díaz, H., Bueno, A. M., Bustos, S. G., & Molina, V. A. (2018). Positive emotional induction interferes with the reconsolidation of negative autobiographical memories, in women only. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 508–518. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2018.08.003>
- Quillfeldt J. A. (2019). Temporal Flexibility of Systems Consolidation and the Synaptic Occupancy/Reset Theory (SORT): Cues About the Nature of the Engram. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 11, 1. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2019.00001>
- Raio, C. M., & Phelps, E. A. (2014). The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. *Neurobiology of stress*, 1, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.004>
- Ramirez, S., Liu, X., MacDonald, C. J., Moffa, A., Zhou, J., Redondo, R. L., & Tonegawa, S. (2015). Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. *Nature*,

- 522(7556). <https://doi.org/10.1038/nature14514>
- Rasie Abdullahi, P., Eskandarian, S., Ghanbari, A., & Rashidy-Pour, A. (2018). Oxytocin receptor antagonist atosiban impairs consolidation, but not reconsolidation of contextual fear memory in rats. *Brain research*, *1695*, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.05.034>
- Rawashdeh, O., Jilg, A., Maronde, E., Fahrenkrug, J., & Stehle, J. H. (2016). Period1 gates the circadian modulation of memory-relevant signaling in mouse hippocampus by regulating the nuclear shuttling of the CREB kinase pP90RSK. *Journal of neurochemistry*, *138*(5), 731–745. <https://doi.org/10.1111/jnc.13689>
- Redondo, R. L., Kim, J., Arons, A. L., Ramirez, S., Liu, X., & Tonegawa, S. (2014). Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature*, *513*(7518). <https://doi.org/10.1038/nature13725>
- Ritov, G., & Richter-Levin, G. (2017). Pre-trauma Methylphenidate in rats reduces PTSD-like reactions one month later. *Translational psychiatry*, *7*(1), e1000. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.277>
- Rogers-Carter, M. M., Djerdjaj, A., Culp, A. R., Elbaz, J. A., & Christianson, J. P. (2018). Familiarity modulates social approach toward stressed conspecifics in female rats. *PloS one*, *13*(10), e0200971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200971>
- Rudy, J. W., & Pugh, C. R. (1998). Time of conditioning selectively influences contextual fear conditioning: further support for a multiple-memory systems view of fear conditioning. *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes*, *24*(3), 316–324. <https://doi.org/10.1037//0097-7403.24.3.316>
- Sánchez-Vidaña, D. I., Chan, N. M., Chan, A. H., Hui, K. K., Lee, S., Chan, H. Y., Law, Y. S., Sze, M. Y., Tsui, W. C., Fung, T. K., Lau, B. W., & Lai, C. Y. (2016). Repeated treatment with oxytocin promotes hippocampal cell proliferation, dendritic maturation and affects socio-emotional behavior. *Neuroscience*, *333*, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.005>
- Schwabe, L., & Wolf, O. T. (2009). New episodic learning interferes with the reconsolidation of autobiographical memories. *PLoS ONE*, *4*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007519>
- Schwabe, L., & Wolf, O. T. (2010). Stress impairs the reconsolidation of autobiographical memories. *Neurobiology of Learning and Memory*, *94*(2). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.05.001>
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2014). Prediction error demarcates the transition from retrieval, to reconsolidation, to new learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *21*(11), 580–584. <https://doi.org/10.1101/lm.035493.114>
- Sharma V. K. (2003). Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology international*, *20*(6), 901–919. <https://doi.org/10.1081/cbi-120026099>
- Shellenberg, T. P., Stoops, W. W., Lile, J. A., & Rush, C. R. (2020). An update on the clinical pharmacology of methylphenidate: therapeutic efficacy, abuse potential and future considerations. *Expert review of clinical pharmacology*, *13*(8), 825–833. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1796636>
- Shimizu, R., Horiguchi, N., Yano, K., Sakuramoto, M., Kanegawa, N., Shinohara, S., & Ohnishi, S. (2019). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of brain dopamine levels based on dopamine transporter occupancy after administration of methylphenidate in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 78–87. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.252262>
- Singewald, N., & Holmes, A. (2019). Rodent models of impaired fear extinction. *Psychopharmacology*, *236*(1), 21–32. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5054-x>
- Spencer, R. C., Klein, R. M., & Berridge, C. W. (2012). Psychostimulants act within the prefrontal cortex to improve cognitive function. *Biological Psychiatry*, *72*(3), 221–227.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.12.002>
- Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), a021766. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021766>
- St. Jacques, P. L., Olm, C., & Schacter, D. L. (2013). Neural mechanisms of reactivation-induced updating that enhance and distort memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49). <https://doi.org/10.1073/pnas.1319630110>
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Toledano, D., & Gisquet-Verrier, P. (2014). Only susceptible rats exposed to a model of PTSD exhibit reactivity to trauma-related cues and other symptoms: an effect abolished by a single amphetamine injection. *Behavioural brain research*, 272, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.039>
- Toth, I., Neumann, I. D., & Slattery, D. A. (2012). Central administration of oxytocin receptor ligands affects cued fear extinction in rats and mice in a timepoint-dependent manner. *Psychopharmacology*, 223(2), 149–158. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2702-4>
- Triana-Del Río, R., van den Burg, E., Stoop, R., & Hegoburu, C. (2019). Acute and long-lasting effects of oxytocin in cortico-limbic circuits: consequences for fear recall and extinction. *Psychopharmacology*, 236(1), 339–354. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5030-5>
- Warfvinge, K., Krause, D., & Edvinsson, L. (2020). The distribution of oxytocin and the oxytocin receptor in rat brain: relation to regions active in migraine. *The journal of headache and pain*, 21(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s10194-020-1079-8>
- Watarai, A., Tao, K., Wang, M. Y., & Okuyama, T. (2021). Distinct functions of ventral CA1 and dorsal CA2 in social memory. *Current opinion in neurobiology*, 68, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.12.008>
- Weiss, J. T., & Donlea, J. M. (2022). Roles for Sleep in Neural and Behavioral Plasticity: Reviewing Variation in the Consequences of Sleep Loss. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 15, 777799. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.777799>
- Wideman, C. E., Jardine, K. H., & Winters, B. D. (2018). Involvement of classical neurotransmitter systems in memory reconsolidation: Focus on destabilization. *Neurobiology of learning and memory*, 156, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.11.001>
- Woodruff, E. R., Chun, L. E., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. (2016). Diurnal Corticosterone Presence and Phase Modulate Clock Gene Expression in the Male Rat Prefrontal Cortex. *Endocrinology*, 157(4), 1522–1534. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1884>
- Woodruff, E. R., Greenwood, B. N., Chun, L. E., Fardi, S., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. (2015). Adrenal-dependent diurnal modulation of conditioned fear extinction learning. *Behavioural brain research*, 286, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.006>
- Wooters, T. E., Walton, M. T., & Bardo, M. T. (2011). Oral methylphenidate establishes a conditioned place preference in rats. *Neuroscience letters*, 487(3), 293–296. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.040>
- Zheng, X., Liu, F., Wu, X., & Li, B. (2008). Infusion of methylphenidate into the basolateral nucleus of the amygdala or anterior cingulate cortex enhances fear memory consolidation in rats. *Science in China. Series C, Life sciences*, 51(9), 808–813. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0105-x>