

**JULIANO GENARO PERFETTO**

**A influência tardia do estresse agudo único na extinção da memória emocional  
em ratos Wistar.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

São Paulo

2022

## RESUMO

**PERFETTO, J.G.** A influência tardia do estresse agudo único na extinção da memória emocional em ratos Wistar. [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

O estresse, causa importante de inúmeros transtornos de ansiedade, desencadeia diversas transformações endócrinas, comportamentais e neuronais. Uma dessas alterações é a ativação do eixo HPA (Hipotálamo-Hipófise-Adrenal), com a liberação de glicocorticoides (GCs) e epinefrina/norepinefrina (Epi/NE). No sistema nervoso central (SNC), as modificações mnemônicas de conteúdo aversivo provocadas pelo estresse são alvo de investigações em inúmeros trabalhos recentes, sendo que regiões como o córtex pré-frontal (CPF) e o complexo basolateral da amígdala (BLA) desempenham papéis-chave nesse processo. Tanto o BLA (centro de regulação autonômica, comportamental e hormonal pós-estresse) quanto o CPF (região encefálica que coordena respostas cognitivas, emocionais e comportamentais a estímulos ameaçadores) são elementos cruciais no remodelamento sináptico, na atividade neuronal e em tarefas comportamentais relacionados aos processos mnemônicos como a extinção da memória de conteúdo aversivo. Entretanto, a participação dessas estruturas pós-estresse na extinção da memória aversiva ainda é alvo de inúmeros estudos. Além disso, faltam investigações sobre a influência tardia do estresse sobre a extinção desse tipo de memória. Desse modo, utilizamos ratos Wistar (220-250 g, 60 dias de idade) e realizamos o estresse de contenção de 2 hs seguido da extinção da memória em 2 momentos: 24 hs e 10 dias após o estresse. Para a atividade de neurônios do BLA e CPF, realizamos ensaio de imuno-histoquímica (EGR1) no pós-choque e ao final da extinção, além de dosagens séricas do hormônio Corticosterona (CORT). Nossos resultados mostraram que o estresse de contenção de 2 hs causa um prejuízo na extinção da memória emocional após 10 dias, mas não após 24 hs, com alterações na excitabilidade de estruturas como BLA e subdivisões do CPFm. Assim, este trabalho sugere que estresse pode modular, tardiamente, a extinção de uma memória aversiva e que o BLA e o CPFm participam da coordenação desse processo mnemônico.

**Palavras-chave:** estresse, memória aversiva, extinção, TEPT, amígdala, córtex cerebral.

## ABSTRACT

**PERFETTO, J.G.** The late influence of single acute stress on aversive memory extinction in Wistar rats. [Tese (Doutorado em farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

Stress, one of the fundamental causes of numerous anxiety disorders, triggers several endocrine, behavioral, and neuronal transformations. One of them is the HPA (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal) axis activation, with the release of glucocorticoids (GCs) and epinephrine/norepinephrine (Epi/NE). In the central nervous system (CNS), the stress-induced mnemonic alterations of aversive content are the subject of investigations in numerous recent studies, and areas such as the medial prefrontal cortex (mPFC) and the basolateral amygdala complex (BLA) play critical roles in this process. The BLA (the post-stress autonomic, behavioral, and hormonal regulatory center) and the mPFC (that coordinates cognitive, emotional, and behavioral responses to threatening stimuli) are crucial elements in stress-related synaptic remodeling, neuronal activity, and behavioral tasks. However, the participation of these structures in the extinction of aversive memory is still the subject of numerous studies. More importantly, investigations about the late influence of stress on the extinction of this type of memory are lacking. Thus, we used Wistar rats (220-250 g, 60 days of age) and 2h of restraint stress, followed by contextual fear extinction initiated at 2 crucial moments: 24 h and 10 days after the stress. To address BLA and CPF neuronal activities, we analyzed EGR1 protein expression by immunohistochemistry 90 minutes after the unconditioned stimulus (US) presentation (footshock 0,5 mA, 1sec) and after the extinction test (6<sup>th</sup> day of daily contextual exposure) and serum corticosterone (CORT) levels in different time-points during restraint stress, US presentation and extinction test. Our results showed that the 2 h restraint stress causes extinction memory impairment after 10 days, but not after 24 h, with changes in the neuronal excitability in the BLA and infra-limbic (IL) and pre-limbic (PL) mPFC subdivisions. Therefore, our study suggests that a single acute stress experience can modulate the late aversive memory extinction and that the BLA and the IL- and PL-mPFC crucially coordinate this stress-induced effect in this mnemonic process.

**Keywords:** stress, aversive memory, extinction, PTSD, amygdala, cerebral cortex.

## **1. INTRODUÇÃO**

Segundo o Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Brasil, 23% da população brasileira terá algum tipo de distúrbio relacionado ao estresse ao longo da vida. Importante notar que, apesar da maioria da população vivenciar situações de estresse cotidianamente, somente uma parcela dela desenvolverá tais distúrbios<sup>1</sup>. Um desses distúrbios, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), provoca reações disfuncionais intensas e desagradáveis que têm início após um evento extremamente traumático, caracterizado por sintomas duradouros como irritabilidade e comportamento de esquiva devido aos eventos de ameaça à vida ou traumas graves (1). A prevalência desse distúrbio fica em torno de 7% na população mundial (2).

Uma qualidade natural e benéfica dos seres humanos que os prepara para inúmeras situações emergenciais ou de grande impacto é a ansiedade. No entanto, a ansiedade patológica é definida como sensações difusas semelhantes ao medo, muitas vezes sem a presença de um perigo real. Essas sensações são, na maioria dos casos, exageradas quanto à intensidade e duração (3-6) e podem surgir por meio de pistas prévias (recordações de eventos estressantes) ou podem simplesmente aparecer sem qualquer pista aparente (crises de ansiedade). Esse estado alterado é causado por diferentes tipos de estresse (7), a citar: excesso de trabalho, excesso de informações (infodemia), falta de lazer, trânsito intenso, ou seja, estresses de uma rotina na vida urbanizada que cada vez mais torna-se parte substancial no cotidiano das pessoas. O mesmo ocorre com o TEPT, em que situações de grande impacto emocional como, por exemplo, um acidente automobilístico, a morte de um parente estimado, um evento de furto ou roubo, entre inúmeros outros incidentes, podem desencadear o início desse transtorno.

Fisiologicamente, situações de intensa valência emocional (perigo/estresse) ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), liberando hormônios como os

---

<sup>1</sup> Fonte: Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Ipq-HCFMUSP).

glicocorticoides (GCs – cortisol em humanos e corticosterona em roedores), importantes no desenvolvimento das alterações neuronais e comportamentais associadas à resposta ao estresse (3-5). Uma vez liberados sistemicamente, os GCs, por atravessarem a barreira hemato-encefálica, exercem efeitos diretamente sobre estruturas do sistema nervoso central (SNC) tal como o complexo basolateral da amígdala (BLA), córtex pré-frontal medial (CPFm) e hipocampo (HIP) (8), sendo que o BLA exerce um efeito estimulatório do eixo, enquanto o HIP e CPFm, um efeito inibitório (9). Além dos GCs, o estresse ativa o sistema nervoso simpático, desencadeando a liberação de epinefrina (Epi) e norepinefrina (NE) da medula da glândula adrenal e NE dos terminais dos nervos simpáticos distribuídos pelo corpo (8), levando ao aumento da pressão arterial e batimentos cardíacos, ao aporte de energia estocada para os músculos e inibição da digestão, dentre outros (10). Entretanto, diferentemente dos GCs, as catecolaminas liberadas periféricamente não atravessam a barreira hemato-encefálica e, por isso, não influenciam diretamente a atividade das estruturas encefálicas envolvidas na regulação da atividade do sistema simpatoadrenal (11).

A comunicação da periferia com o SNC é via núcleo do trato solitário (NTS) (12), que recebe aferências do nervo vago e distribui tais informações para outros núcleos do tronco encefálico como o *locus ceruleos* (LC, principal região liberadora de NE no SNC) e para estruturas como tálamo, HIP, amígdala e CPFm (13). O LC é um pequeno núcleo celular localizado no tronco encefálico e diversas funções em respostas ao estresse, principalmente aquelas mediadas pela NE, têm sido relatadas. Muitos trabalhos mostram um aumento pronunciado de NE em inúmeras estruturas do SNC após um evento de estresse, dado que a coloca como neurotransmissor fundamental para a remodelação neuroanatômica e funcional dos eventos aversivos de estresse/trauma (4). Além disso, o LC possui extensa conexão (projeções) com outras estruturas também relacionadas aos eventos pós-estresse, tais como o CPFm, o núcleo central da amígdala (CeA) e o HIP (14, 15).

Do mesmo modo, tem-se evidenciado um papel bastante importante da CORT nos eventos de estresse. Mitra et al (2008) demonstraram, em ratos, que uma única administração sistêmica de CORT (10 mg/kg, i.p.) foi capaz de induzir um comportamento do tipo ansioso após 12 dias, além de provocar hipertrofia dentritica no BLA (16). Um outro estudo mostrou a ativação dos receptores de glicocorticoides

(GR) no BLA em momentos específicos do condicionamento melhora a consolidação da memória aversiva, efeito não visto quando bloqueadores de receptores noradrenérgicos como propranolol, atenolol e zinterol são administrados também no BLA (17-19). Estes estudos convergem para a importância da sinalização noradrenérgica e dos GCs nas estruturas supracitadas, motivo pelo qual existem intensos estudos em andamento na atualidade.

Em estudos que investigam aspectos mnemônicos e seus moduladores, como é o caso do presente trabalho, é fundamental conhecer os conceitos pavlovianos de condicionamento de medo, que são frequentemente usados em modelos animais de processos de memória e aprendizagem (20). Uma pista neutra (estímulo condicionado, EC, como o som ou o ambiente) é pareado com um estímulo aversivo incondicionado (EI, como o choque nas patas). A apresentação subsequente do EC é capaz de promover uma resposta de medo, como o *freezing* (congelamento), aumento de batimentos cardíacos e aumento da frequência respiratória, dentre outras (21). Portanto, essa ferramenta laboratorial de aprendizagem representa muitas situações reais de seres humanos em que estímulos aversivos são vivenciados com estímulos neutros cotidianamente (20). A extinção da memória, definida como a gradativa redução da resposta de medo mediante às apresentações sucessivas do EC na ausência do EI (22, 23), pode ser uma manobra experimental utilizada clinicamente como terapia cognitivo comportamental importante na busca de qualidade de vida ao indivíduo que passou por um estresse intenso e incapacitante das funções diárias básicas motoras e psicológicas. Alguns estudos relatam que a consolidação da extinção requer a síntese de proteínas no CPFm e HIP (24, 25), dado que reforça ser a extinção a formação de uma nova memória, ou ainda, uma aprendizagem de evitar a recuperação da memória aversiva (20, 21, 26).

Uma estrutura chave na resposta ao estresse é a amígdala. Esta estrutura tanto recebe aferências do LC, CPF, tálamo e HIP quanto emite eferências que promovem ativação de diversas áreas como hipotálamo, CPF, HIP, sistema nervoso parassimpático, entre outras (7, 27). O BLA, uma subdivisão da amígdala, é composto pelos núcleos basal e lateral e é considerado um centro de integração de informações ambientais e decisivo para a organização de respostas comportamentais como luta/fuga e reações de medo/ansiedade (28). Este complexo também exerce função crucial na aquisição, consolidação e extinção de memórias, principalmente aversivas

(8, 27, 28), além de regular positivamente o eixo HPA. Portanto, esta estrutura regula, de maneira decisiva, respostas autonômicas, comportamentais e hormonais, além de modular diferentes regiões envolvidas na memória e aprendizagem (29-31). Isso confere ao BLA um protagonismo na coordenação de informações no contexto do estresse/trauma (27) vindas de outras regiões encefálicas, e por isso, sua atividade está bastante implicada nos distúrbios desencadeados por estresse, como a síndrome do pânico (32, 33), o TEPT (34, 35) e ansiedade (36, 37).

Alguns estudos demonstraram alta densidade de GR no BLA (38, 39) e evidências sugerem que os efeitos do estresse agudo ou crônico se devam às ações dos GCs nessa área (3, 6, 16) associada a outros neurotransmissores. Foi observado também alta expressão de receptores adrenérgicos (RA) do tipo  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  que atuam de modo importante no desenvolvimento da ansiedade (40, 41) e em processos mnemônicos (31, 42).

O grau de ativação do BLA é fundamental para a modulação dos processos mnemônicos em situações aversivas. Especificamente, em relação aos paradigmas experimentais de condicionamento aversivo, o BLA tem papel crucial na convergência sensorial do EC (contexto, luz, odores) e do EI (choques, barulhos) e em outros contextos da situação vivenciada (43). Já foi observado a melhora na consolidação, mas não na aquisição, da memória aversiva pela administração intra-BLA de GCs e Epi/NE (17-19). A administração intra-BLA de NBQX (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo-quinoxalina), um antagonista NMDA, impediu a aquisição e expressão, além da extinção e reconsolidação, da memória aversiva (44-50), enquanto a D-cicloserina, um agonista parcial de receptor NMDA, administrados sistemicamente ou intra-BLA, melhorou a extinção desta memória (51). A infusão intra BLA de biculina, um antagonista GABA (principal neurotransmissor inibitório do SNC), resultou em aumento da consolidação da extinção (52) e a administração de agonistas GR como a dexametasona e RU28362 facilitaram a extinção da memória aversiva (53).

Outra estrutura igualmente importante em respostas comportamentais ao estresse é o CPF. Esta região coordena respostas cognitivas, emocionais e comportamentais a estímulos ameaçadores e controla o eixo HPA (12). Assim como o BLA, devido a alta densidade de GR nesta estrutura, o CPF é altamente responsivo às variações na concentração de GC. Enquanto o aumento na concentração de CORT, seja por administração direta ou por estresse, modifica a arquitetura de

neurônios do CPF, reduzindo o número e tamanho de ramificações dendríticas apicais (54, 55), no BLA observa-se efeito oposto, com o aumento de espinhos e ramificações (3, 6, 16).

A divisão dorsomedial do CPF recebe aferências de outras áreas corticais e de áreas associadas aos núcleos talâmicos representativos de modalidades sensoriais (56). Já a divisão ventromedial do CPF tem conexões recíprocas com estruturas límbicas como amígdala, HIP ventral, hipotálamo lateral e o núcleo intersticial da estria terminal (BNST) (57). Por isso, a divisão ventromedial (em roedores, chamadas de áreas pré-límbica -PL e infra-límbica-IL) é central na modulação da rede de eferências de neurônios límbicos e monoaminérgicos envolvidos na regulação de humor, estresse e emoção (57). Por exemplo, estímulos estressores agudos aumentam a expressão da proteína FOS e a mobilização de glicose em todas as subdivisões do CPF medial (58). Em relação à memória, sabe-se que a ativação (por optogenética) de neurônios do IL durante o treinamento de extinção reduziu a expressão de medo e melhorou a memória de extinção no dia seguinte. Já o silenciamento desta região não alterou a extinção, dentro da mesma sessão, mas prejudicou a recuperação da memória no dia seguinte (59). Alinhado a isso, por meio da técnica de eletrofisiologia, também foi demonstrado que os disparos de neurônios do IL somente ocorrem na extinção 24 hs após o condicionamento, o que não foi visto durante o condicionamento seguido da extinção (mesma sessão). Em conjunto, tais informações indicam que o mCPF pode armazenar memória de extinção à longo prazo (23). Outros estudos mostram que lesões no mCPF prejudicam a retenção (60) e a recuperação da extinção (23) e que o processo de consolidação da extinção requer a integridade do mCPF, uma vez que essa consolidação ocorreria com um aumento da atividade neuronal dessa região. Porém, também há a informação de que outros circuitos podem ser recrutados em condições em que essa hiperexcitabilidade não está presente (61).

Sabe-se que BLA e CPF possuem projeções neurais recíprocas (62), que evidenciam forte relação interestruturas (8, 16, 28, 38, 63). Em humanos, alguns estudos com imagens de ressonância magnética também mostraram notável interação dessas regiões, reforçando a importância delas nos distúrbios de ansiedade (64). Sabe-se que projeções da porção ventromedial do CPF são majoritariamente glutamatérgicas e fazem extensas sinapses com populações de neurônios inibitórios no BLA (65). A estimulação do CPFm, portanto, diminui a atividade neuronal no BLA



(66), sendo esta comunicação de fundamental importância para regulação das alterações pós-estresse. O TEPT, por exemplo, está associado à diminuição da atividade neuronal no CPF e aumento dessa atividade no complexo amigdalár (67).

Como já mencionado, o choque nas patas é um estímulo estressor muito utilizado nos estudos de memória e aprendizagem. Por ele, inicia-se uma ativação no LC que se distribui amplamente pelo SNC, sendo o CPF e BLA umas das principais regiões ativadas pós-choque (8, 28, 31, 68, 69). No que tange à discussão mnemônica, Bloodgood et al, 2018, mostraram aumento da excitabilidade de neurônios de projeções do CPFm (notadamente do IL) para o BLA durante a extinção da memória aversiva, indicando que essa via é crucial nesse processo (70). Além disso, projeções convergentes tanto do HIP quanto do PL-CPFm para o BLA medeiam o controle contextual de medo após extinção (71).

O estresse provoca mudanças na arquitetura e na densidade de espinhos dendríticos dos neurônios de determinadas regiões (16, 27). No entanto, diferenças na intensidade e tipos de estresses produzem diferentes modificações morfológicas. Por exemplo, no BLA de ratos, o estresse agudo (imobilização por 2 hs) aumentou gradualmente a densidade de espinhos em ramificações primárias somente após 10 dias do estresse e nenhuma alteração na arborização dendrítica (3). Já o estresse crônico (2 hs de imobilização por 10 dias consecutivos) provocou um intenso aumento da densidade de espinhos em ramificações primárias e secundárias (3, 6). Nessa mesma região, ocorre hipertrofia dendrítica permanente após estresses repetidos (21 dias) mesmo 3 semanas após o estresse (72). Em relação à influência do estresse na atividade neuronal, Rosenkranz et al (2010) mostraram, por registro eletrofisiológico in vivo em ratos, que ocorre uma hiperexcitabilidade no núcleo lateral da amígdala após estresse crônico (20 min de contenção por dia durante 9 dias) (66), fato que pode ser associado a distúrbios pós-estresse. Outros trabalhos, entretanto, em relação ao estresse crônico previsível por 10 dias, evidenciaram aumento no tamanho dos dendritos, pontos de ramificações, número e tamanhos dos espinhos no BLA, mas não na região central da amígdala (6). Já o estresse agudo (2 horas de contenção) não provocou alongação dendrítica, porém promoveu formação gradual de novos espinhos com o decorrer do tempo (6) e o estresse prolongado único (2 horas de contenção seguido de nado forçado por 20 minutos) provocou alterações dendríticas semelhantes às aquelas causadas pelo estresse crônico durante 10 dias (73). No

entanto, diferentemente do que ocorre no BLA, estresse crônico (2 hs de contenção por 10 dias) ou a administração crônica de CORT provocou atrofia dendrítica no HIP e no CPF relacionada ao prejuízo na memória operacional e comportamental (72, 74), além de um prejuízo no processo de neurogênese e redução do tamanho e das ramificações nos dendritos dos neurônios dessas regiões (6, 8, 28, 35, 39, 75, 76). Esses dados sugerem, portanto, que as mudanças morfológicas e na excitabilidade neuronais no BLA e HIP/CPF induzidas pelo estresse têm diferenças importantes e podem estar fortemente associadas ao estado ansioso e alterações mnemônicas observadas em animais e humanos (27, 77, 78).

Há também evidências de que muitos fatores relacionados à plasticidade neuronal como as neurotrofinas BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) (79) e NGF (fator de crescimento neuronal, do inglês *nerve growth factor*) e o fator de transcrição CREB (do inglês *cAMP response element binding*) são recrutados durante o evento estressor. Porém, as mudanças morfológicas e/ou comportamentais produzidas por estes fatores requerem um determinado tempo para manifestar seus efeitos (3, 8, 16, 80). Além disso, o estresse pode regular a sinalização intracelular das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos). O estresse agudo (imobilização ou contenção de 2 hs), por exemplo, ativa a enzima ERK1/2 em diversas áreas do SNC, sendo essa ativação componente essencial no controle dos circuitos neurais em respostas emocionais (28). Podemos destacar, também, o envolvimento dessa quinase na ativação da amígdala e hipocampo após o condicionamento de medo (77, 78, 81, 82) e inibição da consolidação da memória aversiva no paradigma do condicionamento pavloviano após bloqueio da sua fosforilação. Um alvo *downstream* à ativação de ERK é o fator de transcrição CREB, que uma vez fosforilado, migra para o núcleo e se liga aos elementos responsivos (sítios CRE) nos genes por ele modulados como, por exemplo, o EGR1. Este é um gene de expressão imediata cujos níveis proteicos se correlacionam à excitabilidade de neurônios. Além do EGR1, outro importante indicador de atividade neuronal é o proto-oncogene c-fos, que é expresso em neurônios após despolarização (83, 84).

As alterações morfológicas e comportamentais provocadas pelo estresse têm um componente temporal fundamental. Isto indica que muitas das mudanças provocadas pelo estresse podem se iniciar imediatamente, mas somente ter

alterações comportamentais e mnemônicas quando decorridos determinado intervalo de tempo (3, 8, 16, 73, 85). Nesse sentido, faltam estudos que elucidem essas transformações tardias (10 dias) na extinção de memórias aversivas e se estruturas como BLA e CPFm estão envolvidas no processo de extinção. Desse modo, considerando a importância do estresse como indutor dos transtornos de ansiedade e as suas consequências comportamentais e mnemônicas, este estudo teve como objetivo investigar a influência a curto prazo e tardia da exposição ao estresse agudo de contenção de 2hs na extinção da memória aversiva (24 hs e 10 dias após o estresse, respectivamente). Nossa hipótese é que o estresse pode modular, tardiamente, o processo de extinção da memória aversiva e que estruturas como BLA, CPFm e HIP participam dessa extinção.

(no momento do estresse). Essa alteração do BLA coordenaria, então, o processo de extinção, possivelmente pela comunicação recíproca com diversas estruturas, destacando-se o CPFm e HIP.

## **6. CONCLUSÕES**

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que:

- o estresse único de contenção de 2 horas prejudica a extinção da memória aversiva contextual após 10 dias
- Quando a extinção ocorre 24 hs após o estresse de contenção, não há o prejuízo na extinção como observado quando o condicionamento se inicia após 10 dias.
- O BLA e o CPF (subdivisões infra-límbica e pré-límbica) mostram ser um dos alvos do processo de extinção, tendo em vista as alterações promovidas pelo estresse, como o aumento da atividade neuronal do BLA após a apresentação do EI e no grupo não estressado durante o processo de extinção; a diminuição da atividade neuronal do IL-CPFm após 6 dias de teste de extinção e aumento da atividade neuronal do PL-CPFm nesse mesmo momento.

Desse modo, nós sugerimos neste trabalho que o estresse pode modular, tardiamente, a extinção de uma memória aversiva e que o BLA e o CPFm participam da coordenação desse processo mnemônico.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

1. Wu ZM, Yang LH, Cui R, Ni GL, Wu FT, Liang Y. Contribution of Hippocampal 5-HT<sub>3</sub> Receptors in Hippocampal Autophagy and Extinction of Conditioned Fear Responses after a Single Prolonged Stress Exposure in Rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(4):595-606.
2. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62(6):593-602.
3. Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(26):9371-6.
4. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, et al. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2005;29(8):1214-24.
5. Schelling G, Kilger E, Roozendaal B, de Quervain DJ, Briegel J, Dagge A, et al. Stress doses of hydrocortisone, traumatic memories, and symptoms of posttraumatic stress disorder in patients after cardiac surgery: a randomized study. *Biological psychiatry*. 2004;55(6):627-33.
6. Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(15):6810-8.
7. Chang CH, Grace AA. Amygdala beta-noradrenergic receptors modulate delayed downregulation of dopamine activity following restraint. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(4):1441-50.
8. Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annual review of neuroscience*. 2009;32:289-313.
9. Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(4):292-8.
10. McCarty R, Gold PE. Catecholamines, stress, and disease: a psychobiological perspective. *Psychosom Med*. 1996;58(6):590-7.
11. Hardebo JE, Owman C. Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursors at the blood-brain interface. *Ann Neurol*. 1980;8(1):1-31.
12. McLaughlin RJ, Hill MN, Gorzalka BB. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;42:116-31.
13. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci*. 2000;85(1-3):1-17.

---

<sup>2</sup>\*De acordo com Estilo Vancouver

14. Aston-Jones G, Waterhouse B. Locus coeruleus: From global projection system to adaptive regulation of behavior. *Brain research*. 2016;1645:75-8.
15. Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, et al. beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(17):6277-88.
16. Mitra R, Sapolsky RM. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(14):5573-8.
17. Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(25):14048-53.
18. Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of learning and memory*. 1997;67(2):176-9.
19. Roozendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL. Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *The European journal of neuroscience*. 2002;15(3):553-60.
20. Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. *Physiological reviews*. 2016;96(2):695-750.
21. Giustino TF, Maren S. Noradrenergic Modulation of Fear Conditioning and Extinction. *Front Behav Neurosci*. 2018;12:43.
22. Maren S, Holmes A. Stress and Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):58-79.
23. Milad MR, Quirk GJ. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*. 2002;420(6911):70-4.
24. Santini E, Ge H, Ren K, Pena de Ortiz S, Quirk GJ. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(25):5704-10.
25. Vianna MR, Igaz LM, Coitinho AS, Medina JH, Izquierdo I. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*. 2003;79(3):199-203.
26. McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science*. 2000;287(5451):248-51.
27. Rodriguez Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(38):8725-34.
28. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*. 2000;23:155-84.
29. McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual review of neuroscience*. 2004;27:1-28.

30. McGaugh JL, Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current opinion in neurobiology*. 2002;12(2):205-10.
31. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(6):423-33.
32. Shekhar A, Sajdyk TS, Keim SR, Yoder KK, Sanders SK. Role of the basolateral amygdala in panic disorder. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;877:747-50.
33. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2006;8(4):383-95.
34. Rauch SL, Whalen PJ, Shin LM, McNerney SC, Macklin ML, Lasko NB, et al. Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. *Biological psychiatry*. 2000;47(9):769-76.
35. Thierry AM, Gioanni Y, Degenetais E, Glowinski J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*. 2000;10(4):411-9.
36. Kirby ED, Friedman AR, Covarrubias D, Ying C, Sun WG, Goosens KA, et al. Basolateral amygdala regulation of adult hippocampal neurogenesis and fear-related activation of newborn neurons. *Molecular psychiatry*. 2012;17(5):527-36.
37. Shekhar A, Truitt W, Rainnie D, Sajdyk T. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress*. 2005;8(4):209-19.
38. Gray TS, Bingaman EW. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. *Critical reviews in neurobiology*. 1996;10(2):155-68.
39. Joels M. Corticosteroid actions in the hippocampus. *Journal of neuroendocrinology*. 2001;13(8):657-69.
40. Grissom NM, Bhatnagar S. The basolateral amygdala regulates adaptation to stress via beta-adrenergic receptor-mediated reductions in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase. *Neuroscience*. 2011;178:108-22.
41. Wislowska-Stanek A, Lehner M, Skorzewska A, Maciejak P, Szyndler J, Turzynska D, et al. Corticosterone modulates fear responses and the expression of glucocorticoid receptors in the brain of high-anxiety rats. *Neuroscience letters*. 2013;533:17-22.
42. Hatfield T, Spanis C, McGaugh JL. Response of amygdalar norepinephrine to footshock and GABAergic drugs using in vivo microdialysis and HPLC. *Brain research*. 1999;835(2):340-5.
43. Herry C, Johansen JP. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nature neuroscience*. 2014;17(12):1644-54.
44. Adamec R, Hebert M, Blundell J, Mervis RF. Dendritic morphology of amygdala and hippocampal neurons in more and less predator stress responsive rats and more and less spontaneously anxious handled controls. *Behavioural brain research*. 2012;226(1):133-46.
45. Bishop SJ, Duncan J, Lawrence AD. State anxiety modulation of the amygdala response to unattended threat-related stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(46):10364-8.

46. Isoardi NA, Bertotto ME, Martijena ID, Molina VA, Carrer HF. Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs. *The European journal of neuroscience*. 2007;26(4):1036-44.
47. Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*. 2011;147(3):509-24.
48. Nieminen SA, Sirvio J, Teittinen K, Pitkanen A, Airaksinen MM, Riekkinen P. Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. *Physiology & behavior*. 1992;51(4):845-9.
49. Sanders SK, Shekhar A. Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1995;52(4):701-6.
50. Zimmerman JM, Maren S. NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats. *The European journal of neuroscience*. 2010;31(9):1664-70.
51. Walker DL, Ressler KJ, Lu KT, Davis M. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(6):2343-51.
52. Belau DJ, McGaugh JL. Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiology of learning and memory*. 2006;86(2):123-32.
53. Yang YL, Chao PK, Lu KT. Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2006;31(5):912-24.
54. Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of neurobiology*. 2004;60(2):236-48.
55. Nava N, Treccani G, Alabsi A, Kaastrup Mueller H, Elfving B, Popoli M, et al. Temporal Dynamics of Acute Stress-Induced Dendritic Remodeling in Medial Prefrontal Cortex and the Protective Effect of Desipramine. *Cerebral cortex*. 2017;27(1):694-705.
56. Hoover WB, Vertes RP. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain structure & function*. 2007;212(2):149-79.
57. Heidbreder CA, Groenewegen HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(6):555-79.
58. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. 1995;64(2):477-505.
59. Do-Monte FH, Manzano-Nieves G, Quinones-Laracuente K, Ramos-Medina L, Quirk GJ. Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(8):3607-15.



60. Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(16):6225-31.
61. Garcia R, Chang CH, Maren S. Electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex do not interfere with long-term memory of extinction of conditioned fear. *Learning & memory*. 2006;13(1):14-7.
62. Kim MJ, Loucks RA, Palmer AL, Brown AC, Solomon KM, Marchante AN, et al. The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. *Behavioural brain research*. 2011;223(2):403-10.
63. Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Critical reviews in neurobiology*. 1996;10(3-4):371-94.
64. Myers B, Greenwood-Van Meerveld B. Corticosteroid receptor-mediated mechanisms in the amygdala regulate anxiety and colonic sensitivity. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2007;292(6):G1622-9.
65. Ghashghaei HT, Hilgetag CC, Barbas H. Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. *NeuroImage*. 2007;34(3):905-23.
66. Rosenkranz JA, Venheim ER, Padival M. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biological psychiatry*. 2010;67(12):1128-36.
67. Knox D, Perrine SA, George SA, Galloway MP, Liberzon I. Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentrations in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience letters*. 2010;480(1):16-20.
68. Singewald N, Salchner P, Sharp T. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biological psychiatry*. 2003;53(4):275-83.
69. Uematsu A, Tan BZ, Ycu EA, Cuevas JS, Koivumaa J, Junyent F, et al. Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nature neuroscience*. 2017;20(11):1602-11.
70. Bloodgood DW, Sugam JA, Holmes A, Kash TL. Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):60.
71. Orsini CA, Kim JH, Knapska E, Maren S. Hippocampal and prefrontal projections to the basal amygdala mediate contextual regulation of fear after extinction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(47):17269-77.
72. Vyas A, Pillai AG, Chattarji S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*. 2004;128(4):667-73.
73. Cui H, Sakamoto H, Higashi S, Kawata M. Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. *Neuroscience*. 2008;152(3):703-12.
74. Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(11):2781-7.

75. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature reviews Neuroscience*. 2002;3(6):453-62.
76. Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 2000;97(2):253-66.
77. Pelletier JG, Likhtik E, Filali M, Pare D. Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learning & memory*. 2005;12(2):96-102.
78. Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends in neurosciences*. 2001;24(9):540-6.
79. Chhatwal JP, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ. Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nature neuroscience*. 2006;9(7):870-2.
80. Rattiner LM, Davis M, French CT, Ressler KJ. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(20):4796-806.
81. Alonso M, Viola H, Izquierdo I, Medina JH. Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*. 2002;77(1):119-24.
82. Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature neuroscience*. 1998;1(7):602-9.
83. Blancas A, Gonzalez-Garcia SD, Rodriguez K, Escobar C. Progressive anticipation in behavior and brain activation of rats exposed to scheduled daily palatable food. *Neuroscience*. 2014;281:44-53.
84. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*. 1990;296(4):517-30.
85. Vyas A, Jadhav S, Chattarji S. Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. 2006;143(2):387-93.
86. Novaes LS, Bueno-de-Camargo LM, Munhoz CD. Environmental enrichment prevents the late effect of acute stress-induced fear extinction deficit: the role of hippocampal AMPA-GluA1 phosphorylation. *Transl Psychiatry*. 2021;11(1):18.
87. Fanselow MS, Bolles RC. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1979;93(4):736-44.
88. Myskiw JC, Izquierdo I, Furini CR. Modulation of the extinction of fear learning. *Brain research bulletin*. 2014;105:61-9.
89. Leuner B, Shors TJ. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? *Neuroscience*. 2013;251:108-19.
90. Novaes LS, Dos Santos NB, Perfetto JG, Goosens KA, Munhoz CD. Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxiety-related behavior but not changes in basolateral amygdala spine density. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;98:6-10.

91. Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behavioral neuroscience*. 1996;110(6):1321-34.
92. Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain research*. 1994;639(1):167-70.
93. Raio CM, Brignoni-Perez E, Goldman R, Phelps EA. Acute stress impairs the retrieval of extinction memory in humans. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;112:212-21.
94. Raio CM, Phelps EA. The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. *Neurobiol Stress*. 2015;1:134-46.
95. Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(21):5733-8.
96. Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*. 2014;505(7481):92-6.
97. Duvarci S, Pare D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(16):4482-91.