

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**FATORES QUE MODIFICAM A CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS: INTENSIDADES DE TREINO E
APRENDIZADOS SUBSEQUENTES GUIANDO A PRECISÃO E
QUALIDADE DA MEMÓRIA**

LIZETH KATHERINE PEDRAZA CORREA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas De Oliveira Alvares

Porto Alegre, 2016

DEDICAÇÃO

Em memória

Ào meu pai e herói Alonso Pedraza

R.I.P

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por terem me dado o presente mais valioso do universo: A vida. Pelo amor, pelos ensinamentos, pela amizade que existe, por vocês estarem sempre comigo, e por esse nosso amor estar sempre presente para me dar força no dia a dia.

Agradeço especialmente ao **Rodrigo Sierra**, meu esposo. Ninguém melhor do que você conhece minha história na ciência e eu somente posso te agradecer por tudo, pelo apoio incondicional, por acreditar em mim sempre, por cuidar de mim todo dia, por me ensinar as coisas mais bonitas da vida, desde humildade até como ser uma excelente pesquisadora, obrigada por me ensinar sobre a filosofia da ciência, pela infinita paciência, por fazer da minha vida, um mundo de mil cores. Sou infinitamente agradecida porque você é o melhor colega e o melhor amigo que eu poderia ter, e porque ninguém melhor do que você pra eu chamar de “Mestre”, nunca esquecerei que se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de gigantes como tu

Quero agradecer a todos meus colegas do LNM e LPBNC

Ao professor **Jorge Quillfeldt**, você deixa um imenso crescimento em mim, em você eu encontrei um amigo pra falar da arte, da música, da história, e da filosofia, você é um cientista e um professor que admiro profundamente.

E por último, e não menos importante, pelo contrário, fazendo um agradecimento especial, agradeço ao meu orientador o **Prof. Dr. Lucas De Oliveira Alvares**, obrigada por acreditar em mim, desde o primeiro momento em que a gente se conheceu, por me apoiar incondicionalmente no laboratório, a gente se encontrou na vida no momento certo, no momento em que começariam importantes mudanças nas nossas vidas de cientistas, a gente se encontrou na vida com ideais parecidos, com o mesmo amor pela ciência, pela ética, pela sabedoria e nesse caminho que a gente tem percorrido você, além de ser um exemplo de cientista, tornou-se meu amigo, meu colega, aquele que sempre está disposto a escutar as minhas ideias. Sou totalmente agradecida a ti e te respeito e admiro profundamente.

Agradeço à Senhora Zelma Almeida que cuidou dos meus ratos o tempo todo, obrigada por cuidar deles e das minhas coisas com tanta dedicação.

Agradeço à CAPES pela bolsa.

Finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Nas últimas décadas o processo da consolidação sistêmica da memória tem sido descrito como um processo de reorganização dependente do tempo, envolvendo redes hipocampais e neocorticais que sustentam o armazenamento e a recuperação da memória. Está bem estabelecido que a memória de medo contextual se mantém dependente do hipocampo para sua evocação logo após o aprendizado, mas ao longo do tempo vai se tornando independente dessa estrutura para sua evocação. Alguns estudos sugerem que a independência hipocampal correlaciona-se com a perda de precisão da memória; no entanto, esta estreita relação ainda não foi bem esclarecida. Estudos prévios de nosso laboratório foram capazes de demonstrar que a consolidação sistêmica é um processo altamente dinâmico ao invés de ser um processo passivo apenas dependente do tempo. Aqui, investigamos se a intensidade do treino e os aprendizados subsequentes preveem a decadência gradual da dependência hipocampal durante a evocação da memória e a qualidade da representação contextual ao longo do tempo.

Na primeira parte de nosso estudo, numa tarefa de condicionamento aversivo ao contexto encontramos que uma intensidade de treino forte (8 choques de 1,0 mA) modula o decaimento progressivo da dependência hipocampal e a precisão da memória. O protocolo forte utilizado nesses experimentos acelera a consolidação sistêmica e a generalização da memória. Os mecanismos subjacentes a este efeito se mostraram mediados pela liberação de glicocorticóides e noradrenalina durante o treino.

Usando uma abordagem muito semelhante, aprendizados subsequentes foram capazes de produzir os mesmos resultados numa forma dependente da intensidade do treino. Descobrimos que os aprendizados subsequentes fortes (choques de alta intensidade, 0,8 mA) durante o condicionamento aversivo contextual induzem seletivamente a generalização do primeiro aprendizado e mantém a precisão da memória do segundo em um momento específico do tempo. Este fenômeno foi prevenido pela reativação periódica da memória, que foi efetiva em manter a precisão da memória previamente generalizada. Além disso, esse efeito mostrou-se mediado por mecanismos de reconsolidação.

Estes resultados sugerem que os níveis de ativação do estresse durante o aprendizado agem como um interruptor, determinando o destino da qualidade da memória e a dependência hipocampal durante um aprendizado ou durante aprendizados subsequentes. A natureza dinâmica e a função biológica da consolidação sistêmica são discutidos baseados nestas evidências.

ABSTRACT

In the last decades, systems consolidation has been described as a time-dependent reorganization process involving the neocortical and hippocampal networks underlying memory storage and retrieval. It is well established that contextual fear memory relies on the hippocampus for expression shortly after learning, but it becomes hippocampus-independent at a later time point. Some studies suggest that hippocampal/dependency is correlated to loss of memory precision; however, this close relationship remains elusive. Previous studies of our lab were able to demonstrate that systems consolidation is a very dynamic process directly associated with learning conditions, rather than a merely time-dependent passive process. Here, we investigated whether training intensity and sequential learning modulates the gradual decay of the hippocampal dependency for retrieving memory and the quality of the contextual memory representation over time.

In our first set of experiments, we found that training intensity modulates the progressive decay of the hippocampal dependency and memory precision. Strong training intensity accelerates systems consolidation and memory generalization in remarkably matching time periods. The mechanisms underpinning such process are triggered by glucocorticoid and noradrenaline released during training.

Using a very similar approach, sequential learning was able to produce the same results in a training intensity-dependent way. We found that sequential learning with high intensity shocks during contextual fear conditioning selectively induces, generalization of the first learning and maintenance of memory precision of the second learning in a specific time-

frame. This phenomenon was prevented by periodical memory reactivation which induced greater precision of the previously generalized memory, which also seems to be mediated by reconsolidation.

These results suggest that the stress/arousal levels during emotional learning act as a switch, determining the fate of memory quality and hippocampal dependency during single and sequential learning. The dynamic nature and the biological role of systems consolidation are discussed based on this evidence.

SUMÁRIO

Agradecimentos

Dedicação

Resumo

Abstract

Índice de Figuras

Lista de Abreviaturas

Introdução	1
1. Memória	5
1.1. Definição e classificação da memória	5
1.2. Fases da Memória	9
1.3. Consolidação sináptica da memória... ..	12
1.4. Consolidação Sistêmica da Memória	19
1.4.1 Memória normal e patológica: evidencias da consolidação sistêmica em humanos	19
1.4.2 Modelos animais: evidencias da reorganização de memórias dependentes do hipocampo	23
1.4.3 Teorias Explicativas da Consolidação Sistêmica da Memória.....	25

1.4.3.1 Modelo <i>padrão</i> da Consolidação Sistêmica.....	26
1.4.3.2 Modelo dos Múltiplos Traços	29
1.4.3.3 Hipótese da Transformação da Memória	31
1.4.4 Fatores que Modificam a Consolidação Sistêmica de Memórias aversivas	33
1.4.4.1 Aprendizados Subsequentes	33
1.4.4.2 Reativação periódica da memória	35
1.4.5 Papel Biológico da Consolidação Sistêmica da Memória.....	36
1.4.5.1 Fenômeno de “clereance”	36
1.4.5.2 Esquemas	41
1.5. Avaliando precisão da memória.....	45
2. Objetivos Artigo 1.....	
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos Específicos	48
Objetivos Artigo 2.....	51
2.3 Objetivo Geral	51

2.4 Objetivos Específicos	51
Resultados	
3.0 Artigo 1.	54
4.0. Artigo 2.	55
5. Discussão Geral	56
5.1. Considerações finais e direções futuras	67
6. Referências Complementares	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1.1 Classificação da memória segundo a sua natureza associativa ou não associativa.....	8
Figura 1.2 Fases do processamento da memória.....	12
Figura 1.3 Modelo padrão da Consolidação Sistêmica da Memória	28
Figura 1.4 Modelo dos Múltiplos Traços	30
Figura 1.5 Modelo de Transformação da Memória	32

Discussão Geral

Figura 5.1 Modelo explicativo dos resultados provenientes de aprendizados subsequentes igualmente fortes no CAC	65
Figura 5.2 Modelo explicativo dos resultados provenientes de aprendizados subsequentes igualmente fracos ou diferentes no CAC.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA (Receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico)

BDNF (Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo)

CA1 (Corno de Amon 1)

CA3 (Corno de Amon 3)

CAC (Condicionamento Aversivo ao Contexto)

CAMK II (Cinase cálcio-calmodulina tipo II)

CCA (Córtex Cingulado Anterior)

CNQX (Antagonista do receptor AMPA/Cainato)

CPFm (Córtex Pré-frontal Medial)

CREB (Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc)

CRH (Hormônio liberador de corticotropina)

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

DLD (Depressão de Longa Duração)

EC (Estimulo condicionado)

GKAP (Proteínas cinases associadas Shank e Guanilato)

IGF-II (Hormônio Semelhante à Insulina Tipo II)

LVGCC (Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L)

MAPK (Proteínas cinases ativados por mitógenos)

MMT (Modelo dos Múltiplos Traços)

MLD (Memória de longa duração)

NMDAR (Receptor N-metil-D-aspartato)

PLD (Potenciação de Longa Duração)

PKA (Proteína cinase dependente de AMPc)

PKC (Proteína cinase dependente de cálcio)

PKM- ζ (Isoforma atípica da PKC)

PKG (Proteína cinase dependente de GMPc)

RGs (Receptor de Glicocorticoides)

RO (Reconhecimento de Objetos)

TEPT (Transtorno de Estresse Pós-traumático)

INTRODUÇÃO

O estudo da neurobiologia da memória tem permitido estabelecer parcialmente as bases celulares, moleculares e estruturais que permitem o processamento de novas informações após o aprendizado. Por mais de um século, a chamada “Teoria da Consolidação” tem dominado a área como um paradigma que permite explicar o processo gradual de aquisição, armazenamento, recuperação e manutenção da memória no encéfalo. As bases deste paradigma têm seus começos entre 1882 e 1900, anos nos quais os alemães Muller e Pilzecker descreveram o curso natural de novos aprendizados em humanos (McGaugh, 2000). Diversos estudos permitiram demonstrar que informações recém-adquiridas passam por um processo de estabilização onde interferências externas podem influenciar o conteúdo da memória e mesmo definir se esta será ou não armazenada de forma permanente. No entanto, esta vulnerabilidade se mostrou restrita a uma janela temporal: passado um período crítico, essas interferências perdiam sua capacidade de prejudicar prévios aprendizados. Esta janela, e depois de amplas verificações ao longo dos anos, é o que conhecemos como “consolidação da memória” (Lechner et al., 1999).

O refinamento da neurociência comportamental, e principalmente da neurofarmacologia/psicofarmacologia, permitiu estabelecer a partir desses primeiros experimentos as estruturas encefálicas, redes neuronais, sistemas de neurotransmissores, cascatas de sinalização e processos de transcrição/tradução de proteínas essenciais para a formação da memória. São esses avanços que hoje permitem definir, com um grau de precisão considerável, que a janela de vulnerabilidade estende-se até 6 a 8 horas após o

treino, um período de “consolidação celular” em que as principais mudanças produto do aprendizado ocorrem no encéfalo (Izquierdo and Medina, 1997).

Um conhecimento aprofundado sobre a consolidação da memória e as principais estruturas envolvidas neste processo abriram novas perguntas na área. O hipocampo, umas das regiões do lobo temporal medial mais importantes para aquisição, consolidação, recuperação e manutenção de memórias contextuais, tem sido o alvo de grande número dos estudos que visam entender processos mnemônicos. Provavelmente, uma das histórias clínicas mais significativas dentro das neurociências é o caso do paciente Henry Molaison, melhor conhecido como H.M. Um quadro de crises epiléticas, com etiologia ainda não esclarecida, que começaram aos 10 anos de idade, levaria o paciente H.M a uma intervenção cirúrgica conduzida pelo neurocirurgião William Beecher Scoville, que tinha por objetivo diminuir a frequência e severidade das crises, que se mostravam resistentes aos tratamentos clássicos com anticonvulsivantes. O procedimento cirúrgico consistia na remoção bilateral do lobo temporal medial e, conseqüentemente, do hipocampo. O procedimento conseguiu controlar as crises; no entanto, os efeitos cognitivos desta intervenção foram ainda mais devastadores que a própria doença. O paciente H.M tornou-se incapaz de reconhecer as pessoas envolvidas no procedimento realizado e de se lembrar do seu passado mais próximo e dos novos acontecimentos que ocorriam na sua vida diária, manifestações de uma profunda amnésia retrógrada (incapacidade de lembrar eventos anteriores à cirurgia) e anterógrada (perda de memória para eventos que ocorreram posterior à cirurgia, isto é, deficiência em formar novas memórias). Características tais como personalidade, fala e habilidades em tarefas procedimentais (motoras) pareciam conservadas; no entanto, a memória episódica (fatos e eventos; memória autobiográfica) ficou bastante prejudicada (Deweert et al., 2016).

Brenda Milner, estudante de doutorado sob orientação de Donald Hebb, e Suzanne Corkin seriam umas das principais pesquisadoras do caso H.M. Aproximadamente cinco décadas de estudo deste famoso caso e outros semelhantes permitiram desvendar importantes características do hipocampo em processos mnemônicos. Provavelmente os pontos mais importantes foram: a) memórias de procedimentos (não dependentes do hipocampo) podem ser conservadas na ausência desta estrutura; b) memórias imediatas ou também chamadas de trabalho são menos prejudicadas por lesões hipocampais; c) a amnésia tem uma janela temporal que se mostra associada à extensão da lesão; e d) devem existir sistemas paralelos de memória, já que mesmo com lesão do hipocampo, memórias remotas (de anos ou décadas) podem ser preservadas. De fato, o paciente H.M conseguia se lembrar de eventos pessoais bastante antigos; no entanto, relatos e estudos recentes sugerem que mesmo esta aparente persistência de memórias remotas estava acompanhada de um enfraquecimento progressivo destas informações (Deweer et al., 2016). Este último ponto, a existência de sistemas paralelos de memória, gerou algumas perguntas que conduziram por novos caminhos a pesquisa em memória. Se memórias remotas podem ser preservadas na ausência do hipocampo, qual é o destino final destas informações? Poderia ser o hipocampo uma estrutura com limitado espaço físico que precisa da assistência de regiões encefálicas adicionais para o armazenamento e manutenção da memória? E se estes sistemas paralelos existem, seriam estas memórias qualitativamente diferentes daquelas dependentes do hipocampo?

Atualmente algumas destas perguntas têm uma resposta aproximada e outras ainda estão esperando ser avaliadas; no entanto, sabemos que além da consolidação celular da memória após o aprendizado, mudanças drásticas em circuitos hipocampais e extrahipocampais

acontecem ao longo do tempo para permitir a reorganização de memórias inicialmente dependentes do hipocampo, processo conhecido como “consolidação sistêmica” da memória.

Com uma compreensão provavelmente menor em comparação com a consolidação celular, a consolidação sistêmica encontra-se no centro de um forte debate entre diferentes teorias que tentam explicar como as memórias poderiam “migrar”, completa ou parcialmente do hipocampo, para que sejam estruturas corticais as envolvidas na manutenção e recuperação da informação. Estas teorias e uma revisão das principais características neurobiológicas associadas com a consolidação sistêmica da memória serão abordadas nesta dissertação, e mostraremos os resultados obtidos em nosso laboratório que aportam novas perspectivas à natureza dinâmica da memória e à comunicação entre hipocampo e córtex ao longo da formação de memórias aversivas contextuais.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Definição e classificação da memória*

O aprendizado refere-se a uma mudança no comportamento, que resulta da aquisição de conhecimentos acerca do mundo, e a memória é o processo pelo qual esse conhecimento é codificado, armazenado e posteriormente evocado (Kandel, 2014).

A memória é uma das características cognitivas altamente preservadas capaz de direcionar o comportamento, permitindo-nos ter a capacidade de aprender, lembrar e construir uma história de vida; o acervo de nossas memórias faz com que cada um de nós seja o que é: um indivíduo, para o qual não existe outro idêntico (Izquierdo I, 2011; Kandel, 2014).

De acordo com Izquierdo I, 2011 a classificação da memória pode ser feita pelo seu tipo de conteúdo ou pela característica temporal.

Classificando as memórias segundo o seu conteúdo, existem memórias declarativas ou explícitas, as quais são memórias associadas a eventos ou conhecimentos gerais. Aquelas de conhecimentos gerais (qual é a capital da Colômbia?) são chamadas memórias semânticas. E as memórias que registram fatos (como foi o nascimento do seu filho? Ou como foi o seu casamento?) são denominadas memórias episódicas. É importante ressaltar

que uma das características chave das memórias declarativas, no caso dos humanos, é a possibilidade de serem verbalizadas, fato que facilita sua identificação. No caso de outros animais não-humanos onde a informação não pode ser verbalizada tem sido feitos estudos utilizando diferentes metodologias visando avaliar a existência da memória, como é o caso dos estudos realizados por Babb and Crystal, 2006; Crystal, 2009, onde tentam padronizar medidas eficientes de memória episódica em ratos.

A memória pode também ser classificada de acordo ao tempo que ela persiste. A capacidade de manter representações atuais, embora transitórias, de conhecimentos relevantes para determinados objetivos, é o que conhecemos por memória de trabalho (Kandel, 2014). Quando as informações são mantidas por mais tempo, no entanto por um período curto (minutos até algumas horas) são denominadas memórias de curta duração e quando a disponibilização da informação é maior (horas ou anos) são chamadas memórias de longa duração. Dentro destas de longa duração, podemos ter memórias pouco ou muito persistentes; de fato, algumas das nossas memórias podem permanecer a vida inteira- essas memórias são chamadas de memórias remotas (Nadel et al., 2000).

É amplamente conhecida a independência existente entre a memória de curta e de longa duração, para uma memória ser de longa duração não precisa ter sido expressa como memória de curta duração, e igualmente uma memória de curta duração não necessariamente vai ser consolidada como memória de longa duração. (Izquierdo et al., 1999; Medina et al., 1999; Vianna et al., 2000; Izquierdo et al., 2002).

Existe outro tipo de memória, que participa da lembrança das habilidades motoras e executivas, muito importantes na realização das tarefas diárias. Este tipo de memória é adquirida e ao mesmo tempo age num nível inconsciente ou automático, por meio de comportamentos motores, e este tipo de memória é conhecido como memórias procedurais ou implícitas (Izquierdo I, 2011). A avaliação da memória é feita com exemplos demonstrativos; de fato, é mais fácil demonstrar como dançar samba do que ensinar com palavras como se dança samba. Alguns métodos de aprendizado observacional estão baseados na ideia de que habilidades motoras só podem ser demonstradas na prática; por exemplo, o método Suzuki para aprender a tocar instrumentos musicais requer que crianças desenvolvam comandos motores que facilitam o subsequente aprendizado do instrumento em questão. Estas memórias podem ser evocadas sem a necessidade de prestar atenção nelas, em outras palavras numa forma inconsciente. Esse desligamento da atenção durante tarefas motoras explica como podemos ocupar nossa mente em outras tarefas ao mesmo tempo em que dirigimos o carro ou andamos de bicicleta. As memórias implícitas trabalham em paralelo a outros processos cognitivos que requerem atenção constante (Izquierdo I, 2011).

Extrapolar um sistema de classificação da memória fundamentado em humanos é um dos grandes desafios da ciência básica na hora de avaliar funções mnemônicas em outros animais.

A figura 1.1 mostra uma categorização da memória dependendo da sua natureza associativa ou não associativa e propõe como poderíamos avaliar, interpretando no comportamento, esses tipos de memória.

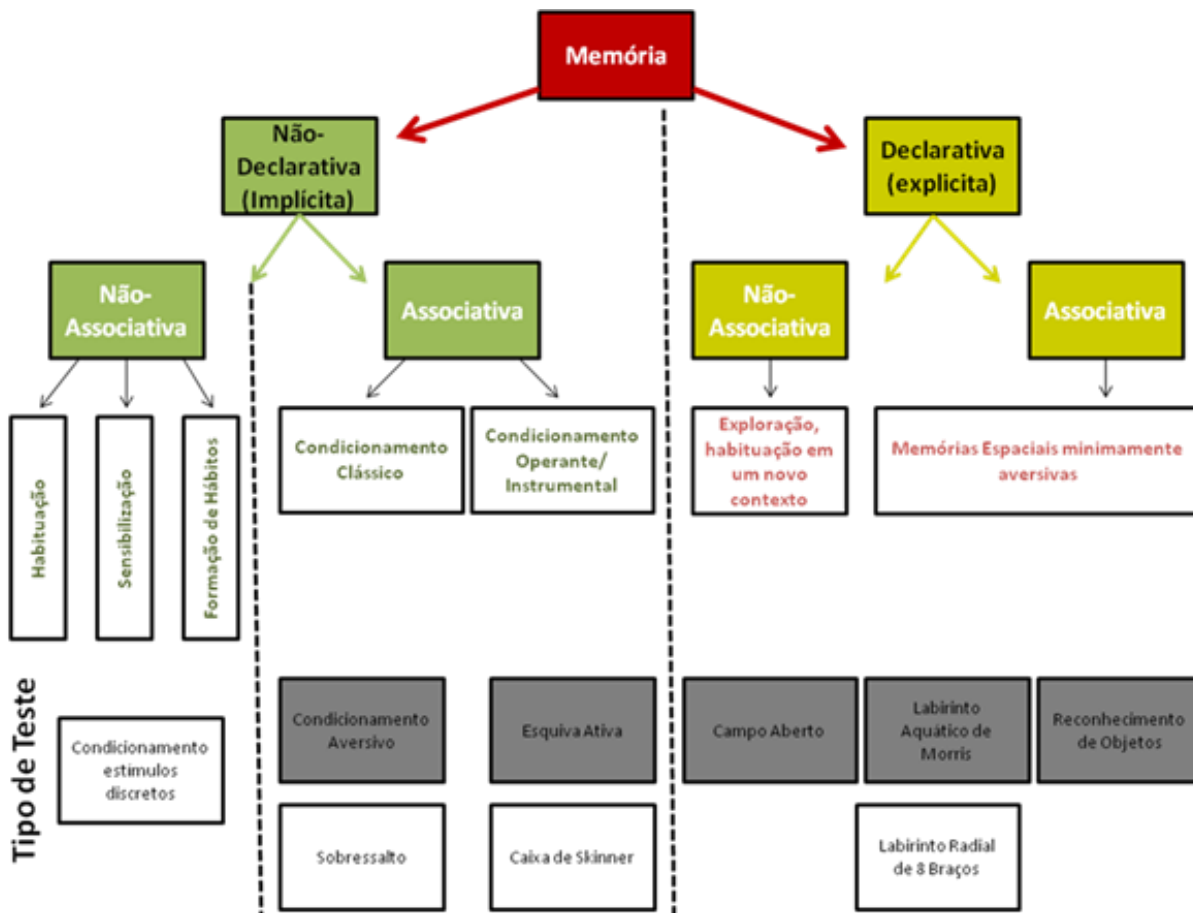


Figura 1.1.

Classificação da memória segundo a sua natureza associativa ou não associativa (Adaptado de Quillfeldt JA, 2006. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats, Em: Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research).

Como pode ser observado, cada tarefa comportamental permite que o comportamento seja avaliado como indicador da presença ou não de memória. Para a finalidade desta dissertação, as memórias associativas formadas na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) serão essenciais. Nesta tarefa Pavloviana, o ambiente no qual o animal se encontra se torna preditor de uma consequência aversiva. Em ausência de alternativa de escape, o animal exibe uma resposta de defesa caracterizada pela ausência de movimentos

sendo possível somente identificar aqueles associados com a respiração. Essa resposta, chamada de congelamento ou “freezing” em inglês, (Blanchard and Blanchard, 1969) permite avaliar se o animal lembra do evento aversivo que ocorreu em aquele contexto, sendo possível também implementar protocolos que permitem saber se o animal consegue distinguir entre o contexto aversivo e os contextos não aversivos (neutros). Neste trabalho centramos nossa atenção nos mecanismos associados com o processamento de memórias aversivas associativas de longa duração, adquiridas com diferentes intensidades de treino (forte e fraco) ou durante aprendizados subsequentes neste modelo de CAC.

1.2. Fases da Memória

A memória apresenta algumas fases que permitem identificar como diferentes experiências podem ou não ser transformadas em memórias duradouras. Essas fases são: aquisição, consolidação/armazenamento e evocação (ver Figura 1.2) (Izquierdo I, 2011). No dia a dia recebemos informações constantemente através de nossos sentidos; mas não armazenamos todas essas informações, ou seja, nem todas as informações adquiridas vão ser consolidadas ou armazenadas permanentemente de fato, muitas delas nem persistirão por mais de alguns segundos, como no caso da memória de trabalho. Além dessas fases iniciais da memória, após o armazenamento das informações outros processos podem ocorrer. Uma memória consolidada pode tomar um caminho que termina no esquecimento natural, no entanto, outras em ausência das contingências aprendidas podem ser simplesmente extintas, mas não esquecidas, onde um comportamento previamente reforçado deixa de ser expresso pela

ausência desse reforçador sob os estímulos pertinentes, essa memória pode voltar e tomar controle do comportamento (Ambroggi et al., 1993; Harris et al., 2000). Por exemplo, no caso do CAC, o rato que foi condicionado ao contexto, no processo de extinção no qual ele é exposto ao ambiente na ausência do choque, ele aprende que agora o contexto não significa choque, inibindo assim, a memória aversiva antiga (Brooks and Bouton, 1993; Morgan et al., 2003). Se por acaso o mesmo animal é exposto novamente ao choque no mesmo contexto ou em outro diferente, existe a possibilidade que todo o comportamento de medo volte. É importante salientar que a reexperimentação dos estímulos aversivos não é a única causa da reversibilidade da extinção; de fato, o simples passar do tempo pode trazer a memória aversiva de volta, efeito conhecido como recuperação espontânea (Brooks, 2000; Lubow and De la Casa, 2002; Quirk, 2002; Thompson, 1976; Bouton, 1993).

A extinção é um dos mecanismos que pode ocorrer como produto da evocação; no caso do CAC, da evocação constante em ausência do choque que motiva o comportamento de defesa. Além da extinção, outro fenômeno decorrente da evocação pode acontecer, a reconsolidação. Este fenômeno foi proposto em 1968 pelo grupo de Lewis e colegas (Misanin et al., 1968) mas foi no ano 2000 que o pesquisador Karim Nader retoma o estudo deste processo mostrando que a reativação de uma memória consolidada, seguindo alguns parâmetros específicos, deixa ela num estado lábil susceptível a interferências, por exemplo, farmacológicas e comportamentais, que vão afetar diretamente o traço original da memória. Em comparação com a extinção, interferir com esse processo faz com que a memória não seja suscetível a voltar com a exposição aos estímulos implicados no aprendizado (Monfils et al, 2009; Nader and Hardt, 2009; Lee, 2008). A possibilidade de

interferir com o conteúdo de uma memória via reconsolidação parece dependente do tempo, e como acontece durante a consolidação, depois de algumas horas da evocação as mesmas interferências não tem efeitos na memória (Hardt et al, 2010). Os mecanismos deste processo são muito semelhantes àqueles presentes na consolidação, no entanto diferem em pontos críticos que permite que sejam separados e estudados de forma isolada (Alberini, 2005).

Uma das grandes preocupações da neurobiologia da memória tem sido identificar os processos celulares e moleculares que subjazem ao aprendizado e estabilização de traços de memória no encéfalo. No caso da consolidação, o processo de estabilização após a aquisição tem sido amplamente estudado por meios farmacológicos com agentes que atuam em diferentes níveis do funcionamento celular e se mostram como interferentes ou melhoradores deste processo (Serota, 1971; Mah et al., 1972; Glaser et al., 2010). Durante a consolidação ocorrem diversos processos em diferentes estruturas encefálicas associadas com o armazenamento da memória, processos que parecem ser vitais nas primeiras 6h após o aprendizado (Izquierdo et al., 1997). Embora as informações não necessariamente sejam estabilizadas totalmente dentro de um período de tempo curto, em alguns tipos de memória, o processo pode continuar durante dias ou meses (Dudai, 2002). O processo de consolidação pode ser visto num nível celular ou sistêmico. Nesta primeira parte os principais processos decorrentes na consolidação celular serão descritos e em próximas seções, o nível sistêmico, o processo chave nesta dissertação, será explicado em detalhe. A Figura 1.2 mostra um esquema resumindo as diferentes fases da memória.

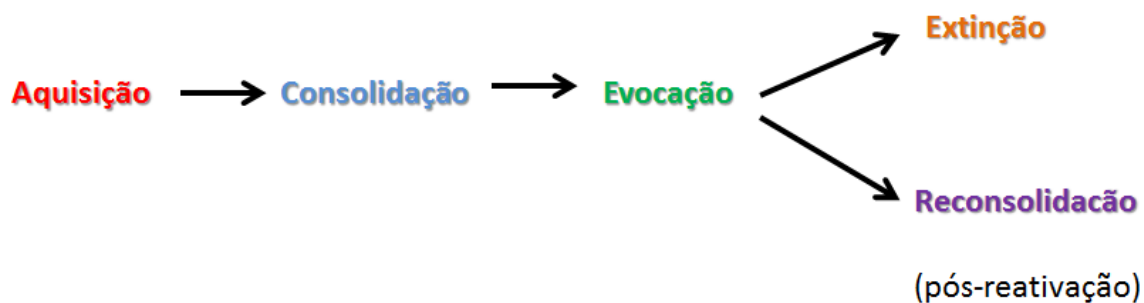


Figura 1.2.

Fases do processamento da memória. (Adaptado de Quillfeldt JA, 2006. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats, Em: Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research).

1.3. Consolidação sináptica da memória

A consolidação sináptica refere-se ao processo de transformação das informações após aquisição permitindo a formação de memórias de longa duração. A base que sustenta este processo são mudanças na força sináptica e reorganização de circuitos neuronais que codificam essa memória. O dogma atual da consolidação sináptica é a ativação de cascatas de sinalização intracelular que resulta em modificações pós-transcricionais, modulação da expressão genica e síntese proteica que altera a eficácia sináptica produto da experiência de aprendizagem (Dudai et al., 2015).

A consolidação sináptica existe em todos os animais com capacidade de mudar seu comportamento decorrente da experiência; de fato, o processo como tal emergiu da investigação molecular, celular, e fisiológica em invertebrados. A valência emocional também apresenta um componente essencial neste processo: memórias importantes (provenientes de uma experiência aversiva) são armazenadas de modo mais eficiente do que memórias “neutras” (Dudai et al., 2015) Isso ocorre porque os hormônios liberados em situações com determinados níveis de estresse facilitam a consolidação da memória (Roozendaal et al 2009).

Provavelmente, os descobrimentos dos mecanismos eletrofisiológicos que subjazem a formação da memória constitui um dos grandes avanços no entendimento da sua neurobiologia. A descoberta da “Potenciação de Longa Duração” (PLD), definida como o aumento persistente da resposta de neurônios à breve estimulação repetida de um axônio ou um conjunto de axônios que fazem sinapses com eles (Napolitano et al., 1999) permitiu um maior entendimento das mudanças permanentes que podem ser estabelecidas quando a força sináptica das sinapses é alterada, no caso da PLD, induzida pela estimulação de alta frequência. Um aumento da força sináptica resulta também na diminuição do limiar de excitabilidade da célula, permitindo que seja mais facilmente ativada. Um processo parecido, mas inibitório, também foi descoberto como produto da estimulação de baixa frequência, a “Depressão de Longa Duração” ou DLD. A DLD diminui a força sináptica de forma permanente, mas reversível (Stanton, 1996). Uma característica comum da PLD e DLD é que são respostas que poderiam durar por horas ou dias dependendo da metodologia utilizada. De fato, a duração dessas mudanças levou a pensar que provavelmente estes

processos poderiam estar associados com a memória de longa duração no caso da PLD, e com processos de esquecimento ou aprendizados inibitórios por meio da diminuição na força sináptica como visto durante a DLD (Teyler and Discenna, 1984).

Os mecanismos de PLD e DLD foram estudados principalmente no hipocampo (O'Mara et al., 2000). Com o tempo, a hipótese que a PLD e DLD eram a base eletrofisiológica da formação da memória foi parcialmente descartada pelo fato de que, mesmo compartilhando processos similares, a PLD/DLD não seriam suficientes para explicar todos os fenômenos decorrentes da formação da memória (Herry and Garcia, 2002);

No entanto, atualmente é bem aceito que mesmo não sendo processos totalmente idênticos, a PLD e DLD são processos identificáveis durante a formação de memórias de longa duração. Provavelmente o ponto de convergência mais claro entre PLD-DLD e as memórias de longa duração é a plasticidade sináptica decorrente por um lado, da estimulação elétrica e do outro pela exposição à experiência de aprendizado (Malleret et al., 2010).

Como mencionado anteriormente, a neurobiologia da memória tem se apoiado significativamente na farmacologia para desvendar os principais mecanismos envolvidos na formação da memória. A administração de substâncias logo após o aprendizado permitiu estudar a participação de receptores e cascatas de sinalização importantes na consolidação de distintas tarefas comportamentais em animais. Muitos desses tratamentos foram

aplicados no hipocampo, estrutura essencial em tarefas que envolvem a codificação de informações contextuais (Izquierdo and McGaugh, 2000).

Ao longo dos estudos em consolidação da memória, o receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Collingridge et al., 1992) se mostrou essencial na formação de memórias de longa duração. O receptor NMDA é regulado por coagonistas (glicina e poliaminas) que permitem seu normal funcionamento além da ligação do seu agonista direto glutamato ou aspartato (Cotman et al., 1988). O funcionamento do receptor NMDA depende da ligação conjunta da glicina e do glutamato (Albensi, 2007). Adicionalmente o receptor apresenta no seu interior sítios de ligação para o Mg^{++} , Zn^{++} e H^+ que regulam o influxo de cálcio ao interior da célula (Liu and Zhang, 2000). O receptor NMDA tem sido proposto como um detector de coincidências, principalmente pela necessidade de despolarização previa da membrana por meio de receptores ionotrópicos não-NMDA para a retirada do íon Mg^{++} do receptor permitindo assim o influxo de cálcio (Isaac et al., 1999).

Esse influxo de cálcio modula sinalizações intracelulares que têm por objetivo ativar cinases como a PKC (Rosenegger and Lukowiak, 2010) e a cálcio-calmodulina cinase tipo II (CAMK II) (Wayman et al., 2011). A principal função dessas cinases durante a consolidação da memória é fosforilar diversos tipos de receptores e fatores de transcrição (um dos mais conhecidos neste processo é a CREB) que podem aumentar ou diminuir a eficácia sináptica, modulando, por exemplo, a liberação quântica de neurotransmissor, a

endocitose ou exocitose de receptores na membrana e eventos mais estruturais como a geração de novos dendritos (Izquierdo and Medina, 1997). Levando em consideração que muitos dos mecanismos anteriormente mencionados são dependentes da síntese de proteínas (por exemplo, aumento da produção de um canal em particular) a consolidação da memória pode ser bloqueada por tratamentos que inibem este processo, abolindo os processos de plasticidade decorrentes do aprendizado (Kida et al., 2002).

Os processos que acontecem durante a janela de consolidação não somente vão definir se a memória vai se tornar de longa duração mas também estão diretamente implicados na sua persistência. Memórias de longa duração podem ou não ser persistentes: isso significa que memórias que se expressam depois de semanas podem não ser mais acessadas depois de anos (Izquierdo I, 2011). A persistência de uma memória pode ser modulada pelo tipo de informação consolidada (neutra vs emocionais), a intensidade do treino (condicionamentos com níveis de reforço diferentes) e também por vias farmacológicas, aumentando a persistência de forma artificial (Rossato et al., 2009; Pedraza et al., 2016). Experimentos na área têm mostrado que memórias aversivas dependem de um sistema de síntese de novas proteínas ativado 12h após a aquisição, mediado por transmissão dopaminérgica desde a área tegmental ventral até a região CA1 do hipocampo (Rossato et al., 2009). A estimulação de receptores dopaminérgicos D1 no hipocampo gera uma rápida síntese do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Bekinschtein et al., 2008b). O BDNF permite o fortalecimento das sinapses hipocámpais que participam do armazenamento da memória e promovem que memórias fracas se tornem tão persistentes quanto memórias produto de intensidades de treino maiores (Bekinschtein et al., 2008a). Por sua vez, o

bloqueio deste sistema vai prejudicar exclusivamente a persistência da memória mas não a sua expressão como memória de longa duração.

Mesmo com uma longa tradição de estudos que visam manipular a formação da memória dentro da janela de consolidação, alguns estudos têm mostrado que a memória pode se manter susceptível a interferências específicas, inclusive após as 6-8 desta janela. Chen et al., (2011) mostraram que a manipulação do hormônio semelhante à insulina tipo II (IGF-II) fora da janela clássica de consolidação poderia interferir com a formação da memória de longa duração.

Por outro lado, estudos sobre uma molécula específica, a (nome por extenso) (PKM- ζ) têm chamado atenção nos últimos tempos. PKM- ζ , uma isoforma atípica da Proteína quinase C (PKC) conhecida durante muito tempo como a molécula da memória ((Frankland and Josselyn. 2016), foi pensada como um elemento necessário para o armazenamento de memórias de longa duração. Esta enzima auxilia em ambos processos: manutenção da PLD e manutenção da MLD através da fosforilação contínua que aumenta de forma persistente os AMPAR pós-sinápticos e reconfigura o tráfego das subunidades (AMPAR trafficking) que medeiam a transmissão sináptica excitatória no encéfalo; de forma interessante a manutenção da PLD tardia é prejudicada através da inibição PKM ζ , mesmo quando os inibidores são aplicados algumas horas e dias após a indução da PDL, além disso esses efeitos podem ser verificados em diferentes regiões do encéfalo. A inibição farmacológica

da PKM ζ tem sido realizada por meio do peptídeo ZIP, que inibe o subtipo ζ (Pastalkova et al., 2006; Sacktor, 2011).

Em anos recentes, esses resultados foram questionados com estudos subsequentes mostrando que camundongos nos quais tinha sido eliminada a PKM ζ geneticamente apresentavam PLD normal e o ZIP conseguia ter efeitos similares do que nos animais controle que expressavam a enzima, revertendo a PLD e prejudicando a memória. Dessa forma, os efeitos amnésicos da inibição da PKM ζ deveriam ser ativados a traves de outro mecanismo compensatório (Lee et al., 2013; Volk et al., 2013), esses resultados abrem a possibilidade que em condições naturais a PKM ζ possa ser essencial na manutenção da PLD e persistência da memória, no entanto, não exclui que outras isoformas, ou mesmo enzimas de outras famílias consigam sustentar essas funções (Frankland and Josselyn. 2016; Sacktor et al., 2016). A essas evidencias podemos adicionar que o ZIP parece atuar inespecificamente, gerando diminuição da taxa de disparo neuronal e com um perfil muito similar á lidocaína (LeBlancq et al., 2016).

Esses mecanismos presentes não somente no hipocampo, mas em geral em todo o circuito responsável pela formação da memória tem recebido grande atenção na literatura científica; no entanto, o que acontece depois que a memória foi consolidada com sucesso? É o hipocampo o destino final das memórias que envolvem o contexto? Pode essa estrutura codificar e armazenar indefinidamente informações? Uma resposta para esses questionamentos surge da outra face da consolidação, a organização de sistemas que ocorre

com memórias de longa duração altamente persistentes, processo este chamado de consolidação sistêmica no qual entraremos na seguinte seção.

1.4. Consolidação sistêmica da memória

O gradiente temporal apresentado por pacientes com amnesia retrógrada permite concluir que mesmo com lesões hipocampais algumas informações podem persistir; conseqüentemente, o hipocampo deveria ser fundamental para a formação e consolidação inicial da memória mas dispensável após algum tempo (memórias mais antigas). A “Consolidação Sistêmica” da memória pode ser definida como um processo de reestruturação das conexões entre hipocampo e córtex que permitem a persistência da memória; desta forma, o hipocampo seria um repositório temporal da informação e o córtex o local de armazenamento final (Dash et al., 2004). A seguir, serão apresentadas algumas das evidências clínicas e experimentais que sustentam essa afirmação.

1.4.1. Memória normal e patológica: evidências da consolidação sistêmica em humanos

Provavelmente uma das primeiras observações do gradiente temporal da amnesia retrógrada provém da terapia com choque eletroconvulsivo em paciente com depressão refratária. Com efeito, essa intervenção usualmente induzia amnésia para eventos ocorridos 1 até 3 anos antes do choque, no entanto a perda de memória era temporal (Squire and Chace, 1975).

Estudos mais controlados têm permitido esclarecer essa janela temporal mostrando que a lesão bilateral restrita ao hipocampo pode gerar perda da memória para alguns anos antes do período pré-mórbido (Insausti et al., 2013).

O quadro de amnesia retrógrada pode ser agravado por lesões extrahipocampais do lobo temporal medial como aquelas que incluem o córtex entorrinal (Kapur and Brooks, 1999). Estudos com neuroimagem têm mostrado que a evocação de memórias autobiográficas gera diferentes padrões de atividade dependendo da idade da memória, assim memórias recentes (dias, meses e alguns anos) aumentam a atividade do hipocampo enquanto que memórias remotas (anos, décadas) aumentam a atividade de estruturas extrahipocampais (Smith and Squire., 2009). Por outro lado, Rosenbaum et al., (2005) mostrou que pacientes com lesões do córtex cingulado e temporal posterior tinham um déficit global de memória autobiográfica que impactava consideravelmente as informações remotas.

Além das abordagens com lesão, o estudo da memória não patológica por meio de neuroimagem tem permitido esclarecer a reorganização da memória ao longo do tempo. Ferramentas como a tomografia por emissão de positrões (PET; Positron Emission Tomography) e a ressonância magnética funcional (fMRI; Functional Magnetic Resonance), com uma resolução espacial e temporal aceitável, podem identificar estruturas que apresentam maior atividade durante a recuperação de memórias recentes e remotas. Alguns estudos têm mostrado que a atividade do lobo temporal medial aumenta com a evocação de informações recentes quando comparado com informações remotas (Haist et

al. 2001; Douville et al. 2005); no entanto, Maguire et al., (2001;2005) em dois estudos diferentes encontraram que a atividade dessas estruturas pode ser independente da idade da memória, gerando controvérsias sobre a defendida independência hipocampal durante a consolidação sistêmica.

Em um dos estudos melhor controlados para estudar o papel do hipocampo em memórias recentes e remotas, Yamashita et al., (2009) investigaram a atividade hipocampal e do neocórtex em participantes que aprenderam uma tarefa de imagens associadas (imagens em fractal) e avaliaram o desempenho imediatamente depois (memória recente) ou 8 semanas depois do treino (memória remota). Os resultados mostraram que uma região do hipocampo direito foi mais ativa durante a recuperação da memória recente quando comparado com a memória remota, no entanto, regiões do córtex temporal esquerdo apresentaram o padrão oposto durante o teste 8 semanas depois.

A forma na qual esse processo de independência hipocampal e aumento da atividade do córtex ocorre após o aprendizado tem sido tema de intensa pesquisa. Uma das principais hipóteses para explicar esse fenômeno é a reverberação neuronal ou “neuronal replay”. Esse processo se inicia durante o aprendizado com o estabelecimento de conexões intra e extrahipocampais que permitem inicialmente a codificação de novas informações (Gupta et al., 2010; Carr et al., 2011). Este circuito pode reverberar em períodos on e off line para fortalecer gradualmente conexões cortico-corticais que facilitariam a persistência da memória; de forma paralela, o mesmo processo enfraqueceria os circuitos hipocampais

envolvidos na recuperação desta informação, liberando a estrutura para a codificação de novas memórias (Squire et al., 2015). A reverberação pode ser verificada com um aumento significativo da atividade de estruturas envolvidas no momento da codificação da informação (Atherton et al., 2015). Sob esta perspectiva, o hipocampo seria uma estrutura de espaço de processamento limitado que deve selecionar a informação que vai ser armazenada (processo que poderia explicar o esquecimento normal) e, destas informações armazenadas, quais delas devem persistir (o fenômeno de consolidação sistêmica propriamente dita) (Hardt et al., 2013; Huijgen and Samson, 2015). Em seções posteriores serão revisados modelos animais e computacionais que aportam evidências a essa capacidade de processamento limitado do hipocampo.

Em humanos, a reverberação de circuitos, principalmente durante o sono, tem sido associado com a consolidação sistêmica. Rasch et al., (2007) durante uma tarefa associativa olfativa, revelaram que a presença de estímulos aprendidos durante a fase de ondas lentas aumenta a atividade hipocampal (avaliada por ressonância magnética funcional) que por sua vez diminui a probabilidade de esquecimento da informação durante testes subsequentes. Os autores interpretam esses resultados como um processo de reativação do traço mnemônico que pode fortalecer a comunicação dentro de circuitos hipocampais e entre hipocampo e córtex promovendo uma maior persistência da informação.

Processos de reverberação parecem não ser exclusivos de períodos do sono, e podem ser verificados em estado de repouso onde o hipocampo não está participando da codificação

de novas informações (Karlsson and Frank 2009; Mednick et al. 2011). A reverberação neuronal em humanos e sua frequência se mostram intimamente associados com o desempenho posterior em testes de memória (Staresina et al. 2013). As lesões do hipocampo e estruturas corticais em pacientes com amnesia poderiam interferir com estes mecanismos de fortalecimento entre hipocampo e córtex gerando dificuldades na codificação ou recuperação de memórias. Esta afirmação remonta a uma antiga discussão sobre a natureza da amnésia (é a amnésia um problema de codificação ou recuperação da informação?) porém, não será abordada durante esta dissertação devido a ser um problema que vai além de entender o curso natural da consolidação sistêmica.

1.4.2. Modelos animais: evidências da reorganização de memórias dependentes do hipocampo

Modelos animais permitiram nas ultimas décadas desenvolver um conhecimento mais aprofundado sobre as estruturas implicadas na consolidação celular e sistêmica da memória. Estudos em macacos mostraram que a lesão restrita ao hipocampo prejudicava as informações aprendidas imediatamente e até 12 semanas antes do procedimento; no entanto, a partir deste ponto, a probabilidade de recuperar memórias era maior (Zola-Morgan and Squire 1990). Em roedores, Kim et al., (1992) conseguiu demonstrar que lesões do hipocampo realizadas 28 dias após um condicionamento aversivo contextual eram incapazes de afetar o desempenho dos animais. Estudos parecidos mostrando um gradiente temporal do envolvimento do hipocampo na evocação da memória seriam publicados em

anos posteriores, reforçando o papel limitado de dita estrutura na memória remota (Maren et al., 1997; Anagnostaras et al., 1999). No entanto, como acontece no caso de estudos com humanos, alguns grupos de pesquisa não conseguiram identificar esse gradiente temporal (Broadbent and Clark 2013), fato que tem alimentado o debate se o envolvimento do hipocampo pode depender de finos parâmetros como o tipo de lesão, a tarefa utilizada e as condições do aprendizado (número de sessões). É possível concluir que, mesmo com resultados contraditórios, os estudos com lesão oferecem um método mais fidedigno para o estudo do envolvimento de estruturas encefálicas na evocação da memória, de fato, efeitos amnésicos induzidos farmacologicamente podem ser minimizados por meio da reativação do traço com estímulos condicionados (reminder effect) ou dicas internas (dependência de estado) (Sierra et al., 2013) durante experimentos de condicionamento aversivo, interferente pouco provável na ausência total da estrutura estudada.

Por outro lado, é importante salientar que aproximações farmacológicas e histológicas têm permitido desvendar as principais estruturas responsáveis pela evocação de memórias recentes e remotas. Animais treinados numa tarefa de aprendizado espacial dependente do hipocampo tiveram sua atividade cerebral monitorada usando uma medição da utilização e captação de glicose encefálica (14C) 2-deoxyglucose, mostrando que memórias espaciais recentes produziram uma ativação hipocampal mais robusta do que as memórias remotas. Em contraste, várias áreas corticais, incluindo diferentes estruturas do córtex pré-frontal medial (mPFC), mostraram o padrão oposto exibindo maior ativação durante a evocação de memórias remotas (Bontempi et al., 1999). De acordo com estas evidências, memórias recentes podem ser prejudicadas por tratamentos intrahipocampais enquanto memórias

remotas são resistentes a essas manipulações (Beeman et al., 2013; Kitamura and Inokuchi, 2014; Raybuck and Lattal, 2014).

Os resultados heterogêneos provenientes tanto da pesquisa básica quanto da pesquisa clínica sobre o envolvimento do hipocampo na expressão da memória remota, promoveram a segregação dentro desta área em dois grupos, por um lado, aqueles que defendem que o hipocampo não é necessário durante a expressão de memórias remotas e do outro, aqueles que propõem que esta estrutura é necessária independente do tempo. Como resultados desta divisão, alguns modelos explicativos surgiram, cada um com suas próprias evidências empíricas.

1.4.3. Teorias explicativas da consolidação sistêmica da memória

Nesta seção serão discutidos os 3 modelos predominantes da consolidação sistêmica a saber: o modelo *padrão*, o modelo dos múltiplos traços e a hipótese da transformação da memória. Estes modelos não são mutuamente exclusivos, na prática cada um deles incorpora informações do modelo anterior.

1.4.3.1 Modelo padrão da consolidação sistêmica da memória

As bases do modelo *padrão* da Consolidação Sistêmica (SCM; Standard Consolidation Model) foram estabelecidas por David Marr, um dos pioneiros na abordagem matemática e computacional da neurociência. Em 1971 ele publicaria sua teoria sobre o armazenamento de memórias no arquicórtex onde o hipocampo e estruturas associadas seriam um local de manutenção temporário de memórias antes de serem finalmente processadas pelo neocórtex, local final para toda informação inicialmente dependente do hipocampo (Willshaw et al., 2015). De acordo com este modelo, experiências de aprendizado podem ser codificadas de forma paralela em circuitos do hipocampo e córtex, no entanto, a reativação constante do circuito hipocampal ou replays levaria a um fortalecimento progressivo ou gradual dos circuitos cortico-corticais que eventualmente seriam suficientes para evocar a informação.

O processo terminaria com o enfraquecimento dos circuitos hipocampais e a incorporação da memória num arcabouço de informações já consolidadas no córtex (este fenômeno de integração de memórias corticais tem sido estudado recentemente como uma forma de explicar os “esquemas mentais” inicialmente contemplados pela psicologia cognitiva, o tema será abordado na seção “**Papel Biológico da Consolidação Sistêmica da Memória**”). Neste modelo, tanto memórias episódicas como semânticas passam pelo mesmo processo de reorganização, “migrando” do hipocampo para o córtex depois de algum tempo.

De forma recente, as predições de Marr têm sido testadas no laboratório. Alguns estudos sugerem que estruturas do córtex pré-frontal medial (CPFm) poderiam ter um papel modulador inibindo ativamente (por vias diretas ou indiretas) os circuitos hipocampais nos quais a memória foi inicialmente codificada, facilitando desta forma a evocação só por meio de módulos corticais (para detalhes de vias pré-frontais inibitória e evocação de memórias remotas, ver Frankland and Bontempi, (2005) (Figura 1.3). Trabalhos em humanos têm mostrado que essa inibição poderia ser um mecanismo de supressão ativa da recuperação de memórias, sendo uma via que levanta grande interesse pela sua possível função no bloqueio consciente de memórias indesejáveis como aquelas presentes no TEPT (Anderson et al., 2004; Anderson and Huddleston, 2012; Anderson and Hanslmayr, 2014). Estudos recentes com optogenética oferecem uma visão mais detalhadas destas vias. Usando um modelo de condicionamento aversivo contextual em camundongos, Rajasethupathy et al., (2015) mostraram que vias monossinápticas provenientes do (CPFm), predominantemente do córtex cingulado anterior, são capazes de modular o disparo das conexões entre CA3 e CA1 no hipocampo e a evocação de memórias contextuais. Mesmo com as evidências anatômicas anteriormente citadas, até o momento não existem estudos avaliando de forma direta o papel destas vias recíprocas entre hipocampo e córtex na reorganização da memória durante a consolidação sistêmica.

Modelo padrão da consolidação Sistêmica da memória

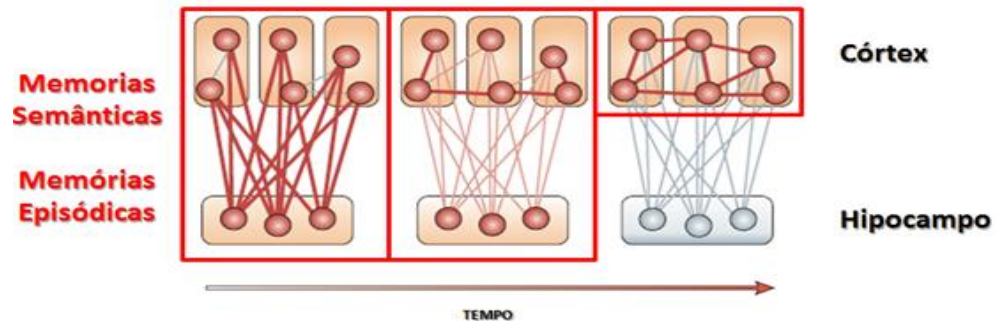


Figura 1.3.

Modelo *padrão* da Consolidação Sistêmica da Memória (Adaptado de Frankland and Bontempi, 2005. The organization of recent and remote memories).

Alguns autores sugerem que a consolidação sistêmica é um processo de reorganização dependente do tempo, no qual ocorrem mudanças duradouras nos circuitos corticais. Esta noção de um processo meramente dependente do tempo será desafiada nos resultados apresentados nesta dissertação.

As evidências experimentais que apoiam o modelo *padrão* da consolidação sistêmica são só uma parte da literatura que aborda esta discussão. Uma série de experimentos e modelos alternativos surgiram de resultados mostrando que o hipocampo pode continuar participando do processamento de memórias remotas.

1.4.3.2. Modelo dos múltiplos traços

Estudos em humanos mostrando que o hipocampo fica significativamente ativo durante a recuperação de memórias remotas episódicas/autobiográficas (Nadel et al., 2000) têm levantado um forte debate sobre as condições nas quais tal estrutura pode ser ou não necessária. Em efeito, nesses estudos, memórias semânticas (por exemplo, responder à pergunta: qual é a capital da França) parecem não envolver o hipocampo quando avaliadas de forma remota (Rosenbaum et al., 2001); no entanto, memórias de fatos e eventos, sejam autobiográficos ou não, parecem recrutar o hipocampo para sua evocação (Moscovitch et al., 2005). Esses achados permitiram que um modelo alternativo fosse formulado: o Modelo dos Múltiplos Traços (MTT; Multiple Trace Theory). O modelo proposto por Nadel e Moscovitch (1997) contempla, como o modelo *padrão*, que as memórias são inicialmente codificadas em conexões entre hipocampo e córtex, porém, lesões bilaterais completas do hipocampo poderiam gerar um quadro amnésico com gradiente temporal que vai prejudicar igualmente memórias recentes e remotas; no entanto, as memórias semânticas seriam conservadas (Fig 1.4). No caso de lesões unilaterais, o modelo prediz que a amnésia será preferencialmente para memórias recentes e a parte remanescente do hipocampo poderá dar conta, junto com o córtex, de informações remotas. Uma forma simplificada de ver esse modelo seria concluir que qualquer informação rica em características contextuais (episódicas e autobiográficas) precisará do hipocampo para ser evocada.

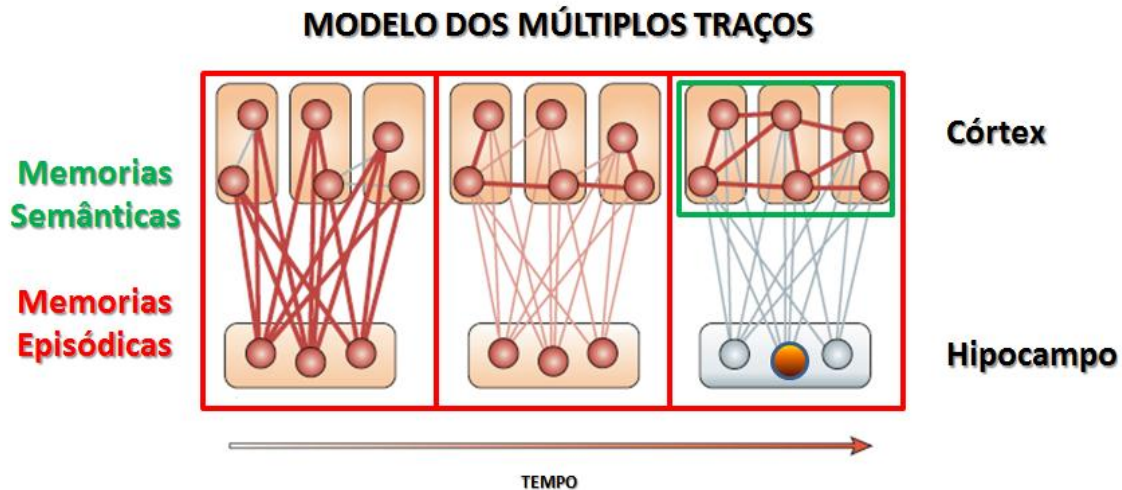


Figura 1.4.

Modelo dos Múltiplos Traços (Adaptado de Frankland and Bontempi, 2005. The organization of recent and remote memories).

Uma das aproximações experimentais mais elegantes com o intuito de investigar o papel do hipocampo na evocação de memórias remotas foi proporcionada por Goshen et., (2011). Usando um condicionamento aversivo em camundongos, foi reportado que a inibição optogenética de células piramidais da região CA1 do hipocampo, 4 semanas depois do condicionamento, prejudica a evocação da memória. O procedimento se mostrou eficiente quando restrito ao momento da evocação; se a inibição começava 30 minutos antes do teste, não é possível verificar o déficit posteriormente. Por outro lado, a inibição prolongada antes do teste aumenta a atividade do CCA, resultado que é interpretado pelos autores como uma compensação cortical em ausência do hipocampo que garante a evocação da memória. É importante salientar que resultados com inibições prolongadas se assemelham aos da farmacologia, enquanto que com a inibição imediata o efeito no hipocampo segue existindo a longo prazo.

1.4.3.3. Hipótese da transformação da memória

A Hipótese da Transformação pode ser considerada como uma atualização do modelo de múltiplos traços. Este modelo foca-se na progressiva perda de precisão da memória durante o processo da consolidação sistêmica. Memórias dependentes do hipocampo são caracterizadas por serem ricas contextualmente e detalhadas; no entanto, a independência hipocampal levaria a uma “semantização” da informação, ou seja, à impossibilidade de serem lembradas com os mesmos detalhes do que quando dependentes do hipocampo (Meeter and Murre, 2004). O fenômeno de semantização estaria associado à saída da informação do hipocampo e à utilização da representação cortical; pode ser exemplificado por aqueles casos nos quais lembramos que um evento aconteceu mas não lembramos quando, onde e outras pessoas ou situações involucradas. Temos uma ideia geral, um registro de que aquilo foi verdadeiro, mas fica impossível lembrarmos das particularidades. ver Frankland and Bontempi, (2005) (Figura 1.5).

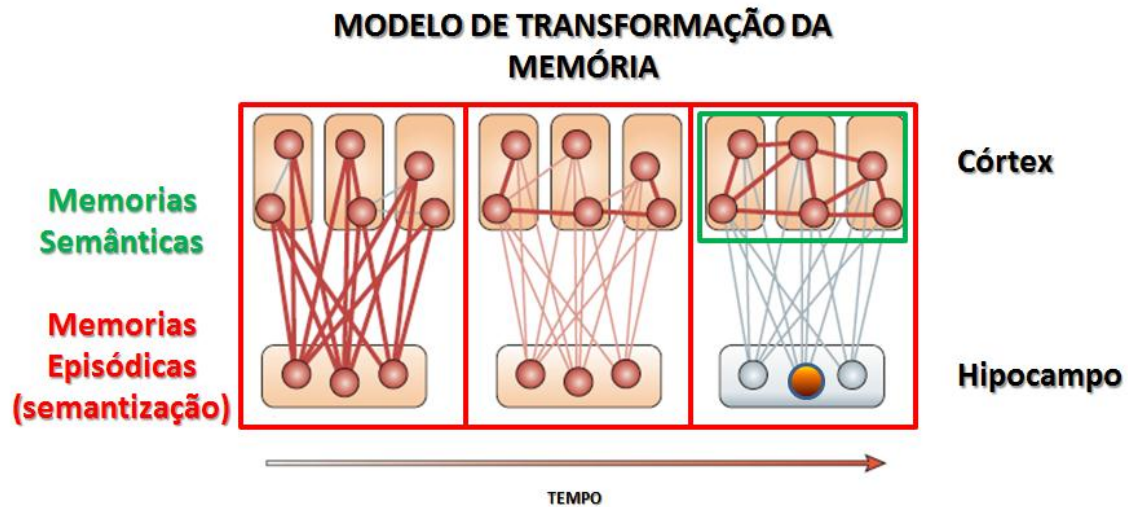


Figura 1.5.

Modelo de Transformação da Memória (Adaptado de Frankland and Bontempi, 2005. The organization of recent and remote memories).

Um dos experimentos melhor controlados para testar a hipótese da transformação foi realizado por Winocur et al., (2007). Neste experimento, os ratos tiveram o hipocampo lesionado bilateralmente com intervalos curtos ou prolongados depois do condicionamento aversivo ao contexto ou durante uma tarefa de preferencial social condicionada e testados no contexto original ou em um contexto alternativo (novo). As lesões do hipocampo 28 dias depois do aprendizado prejudicaram a expressão de memórias semantizadas/generalizadas, mostrando que o hipocampo poderia ser necessário mesmo nestas memórias carentes de detalhes. Esse estudo, além de mostrar evidências apoiando o modelo de múltiplos traços, incorpora as mudanças qualitativas em termos de precisão que podem sofrer os aprendizados ao longo da consolidação sistêmica. Porém, um link direto entre precisão e consolidação sistêmica não tinha sido demonstrado até o momento na literatura e foi um dos objetivos deste trabalho. A precisão da memória e sua aparente relação com a

reorganização de traços durante a consolidação sistêmica será abordada na seção “Generalização da Memória como Produto da Consolidação Sistêmica”.

1.4.4. Fatores que modificam a consolidação sistêmica de memórias aversivas

1.4.4.1. Aprendizados subsequentes

Usualmente o processo da consolidação sistêmica tem sido estudado com a exposição do animal a uma tarefa comportamental, testando o desempenho dessa memória e a dependência hipocampal ou cortical em diferentes períodos após a aquisição. Quando comparado com situações da vida real em que as memórias são construídas com base em muitas experiências prévias, esta abordagem poderia ser insuficiente para caracterizar o processo mnemônico que ocorre durante a consolidação sistêmica de múltiplos traços de memória.

Alguns estudos indicam que 30 dias após a aquisição do aprendizado, o córtex cingulado anterior (CCA) torna-se fundamental para a evocação de memórias remotas, acompanhado de um envolvimento menor do hipocampo (Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Restivo et al., 2009). É possível que a consolidação sistêmica seja um processo unicamente dependente do tempo? Poderiam alguns fatores mudar a dinâmica da consolidação sistêmica? A literatura científica tem explorado pouco estas questões e existe certo consenso que o estabelecimento de conexões cortico-corticais precisaria de um tempo prolongado para serem fortalecidas, enquanto que as conexões entre hipocampo e córtex

responsáveis pela evocação e manutenção da memória seriam construídas na sua maioria logo após o aprendizado (Dudai, 2004; Dudai, 2012).

Recentemente, em nosso laboratório, mostramos que a aquisição de novas informações pode interagir com memórias previamente armazenadas, acelerando a reorganização das conexões entre o hipocampo e áreas corticais (Haubrich et al., 2016). Neste experimento, animais que passaram pelo condicionamento aversivo ao contexto e depois aprenderam mais duas tarefas dependentes do hipocampo (Reconhecimento de Objetos e o Labirinto Aquático de Morris) mostraram uma aceleração na consolidação sistêmica, evidenciada pela capacidade que teve uma infusão de muscimol no CCA para prejudicar a memória num ponto do tempo onde o tratamento geralmente não teria efeito. Esse resultado mostrou que a consolidação sistêmica é um processo dinâmico que pode ser mudado pela interação de diferentes aprendizados. Essa aparente flexibilidade do processo direcionaria boa parte dos experimentos que serão mostrados nesta dissertação.

A ideia de que a aquisição de mais de um tipo de informação pode mudar a organização desses traços de memória no encéfalo não é novidade; no entanto, os mecanismos subjacentes aos aprendizados subsequentes (ou também chamados de aprendizados secundários) ainda não estão bem estabelecidos. Wartman et al., (2014) mostrou que animais treinados em duas diferentes tarefas de memória dependentes do hipocampo, o labirinto aquático de Morris seguido pelo labirinto radial, expressam um padrão precoce de expressão de c-fos no CCA durante o teste de memória recente igual ao verificado durante o teste da memória remota, sugerindo que o treinamento em tarefas ou aprendizados subsequentes dependentes do hipocampo acelera o envolvimento de estruturas corticais durante a evocação da memória recente. Essa maior atividade de c-fos no CCA foi

acompanhada de remodelação dendrítica (número de dendritos) quando comparado aos animais expostos a uma tarefa só. Curiosamente, este fenómeno não foi verificado com dois aprendizados subsequentes, um dependente e outro não dependente do hipocampo, resultado que apoia a hipótese que só aprendizados dependentes da mesma estrutura podem induzir o recrutamento cortical precoce. Evidências posteriores publicadas pelo mesmo grupo revelaram que animais treinados em duas tarefas dependentes do hipocampo e infundidos com muscimol no córtex cingulado anterior expressaram prejuízos na evocação durante os testes de memória recente e remota, (Wartman et al., 2014).

Em conjunto, essas abordagens permitem estudar as condições de aprendizado que podem mudar o tempo necessário para a consolidação sistêmica; no entanto, são só uma pequena parte das diferentes variáveis que poderiam influenciar o processo. Inspirados pelos trabalhos de Wartman et al., (2014) decidimos estudar quais condições poderiam modificar a consolidação sistêmica, focando em duas perguntas: 1) Pode a intensidade do treino (força do aprendizado) mudar a taxa da consolidação sistêmica (acelerar ou retardar o processo)? e 2) Quais são as condições pelas quais aprendizados subsequentes podem acelerar a consolidação sistêmica?

1.4.4.2. Reativação periódica da memória

Em nosso laboratório, de Oliveira Alvares et al., (2012) mostraram que as reativações periódicas da memória prolongam o envolvimento do hipocampo na evocação. Usando o condicionamento aversivo ao contexto e a inibição local do hipocampo com muscimol foi

demonstrado que estas breves reativações ao contexto (em ausência do estímulo condicionado) promovem o efeito amnésico do muscimol durante a evocação, efeito que não é verificado em animais treinados, mas não reativados. Resultados posteriores também do nosso grupo vinculam o efeito da reativação a mecanismos de reconsolidação da memória, um fenômeno de plasticidade induzido pela evocação de informações que permitiria a atualização e fortalecimentos de traços mnemônicos (de Oliveira Alvares et al., 2013).

1.4.5. Papel Biológico da Consolidação Sistêmica da Memória

1.4.5.1. Fenômeno de “clearance”

Desde a primeira publicação de Joseph Altman em 1960 mostrando evidências sobre processos de neurogênese no encéfalo adulto, uma parte considerável das neurociências focou seus esforços em entender o papel biológico deste processo (Amrein and Lipp, 2009). O fenômeno ocorrendo na zona subgranular do hipocampo era bastante sugestiva, levando a hipóteses sobre como a produção de novas células nesta região poderia contribuir aos processos mnemônicos que ali tomavam lugar. Foi só na década de 90 que estas perguntas começaram a ter resposta com o aprimoramento de ferramentas imuno-histoquímicas que pretendiam visualizar o nascimento, desenvolvimento e integração a circuitos já estabelecidos destas novas células (Cayre et al., 2002). Com modernas técnicas de supressão da neurogênese hipocampal adulta em roedores, foi possível determinar que inibir o curso natural deste processo resultava em graves prejuízos para a formação de novas memórias dependentes do hipocampo (Kitamura et al., 2009). Por outro lado, alguns

estudos mostraram que aumentando dito processo, a formação de novas memórias poderia se beneficiar (Hopkins et al., 2011). Resultados contraditórios e heterogêneos podem ser encontrados na literatura, principalmente por metodologias diferentes que podem incluir os tipos de testes comportamentais usados, as técnicas de supressão, a proporção da neurogênese que pode ser inibida e a idade do animal entre outros fatores (Abrous and Wojtowicz, 2015). A evidência da contribuição da neurogênese para a memória é bem controversa e, mesmo que o efeito de fato exista, parece restrito a condições e/ou tarefas bem específicas (Groves et al., 2013). Contudo, os resultados da manipulação da neurogênese mostram que esse processo parece fundamental para a formação, manutenção e remodelamento de memórias dependentes do hipocampo.

Como a neurogênese pode controlar o fino processamento de informação no hipocampo? Uma das hipóteses mais amplamente estudadas na atualidade é que a neurogênese pode facilitar processos de separação de padrões (ou pattern separation em inglês). De forma resumida, as novas células granulares permitiriam que diferentes informações, muitas delas parecidas sensorialmente, sejam codificadas e armazenadas em circuitos diferentes diminuindo a possibilidade de interferência entre elas (Rolls, 2013). A separação de padrões significaria que múltiplas entradas de informação pelo córtex entorrinal seriam classificadas no giro denteado e transformadas em padrões de atividade diferente em circuitos da região CA3 do hipocampo, modelo aceito e sustentado por estudos de eletrofisiologia in vivo (Guzowski et al., 2004). De fato, esse processo poderia explicar como a diminuição ou aumento da neurogênese poderia prejudicar ou facilitar,

respectivamente, a formação de novas memórias mediadas pela capacidade de evitar a sobreposição de atividade no hipocampo.

O grupo de Timothy Bussey tem aportado importante evidencia experimental neste processo. Por exemplo, desenvolveram e testaram uma tarefa para estudar a separação de padrões em roedores (utilizando um aparelho automatizado de tela sensível ao toque) ou (touchscreen em inglês), os resultados mostraram que os ratos com lesões do hipocampo dorsal tiveram prejuízos significativos na aprendizagem de discriminação espacial, quando os locais a serem discriminados eram próximos, mas não quando eram distantes, indicando uma prejuízo na separação de padrões (McTighe et al., 2009). Os estudos deste grupo sugerem que o envolvimento da neurogênese nos processos de aprendizado e memória dependem de um número de fatores tais como a idade dos neurónios, a fase da memória e os tipos de testes utilizados. Além disso, tem sido sugerido que existem diferenças de sexo e diferenças específicas das espécies (Oomen et al., 2014).

Após conhecer alguns efeitos da manipulação da neurogênese hipocampal nos processos de aprendizado e memória ficava ainda uma pergunta sem responder, qual é o papel da neurogênese depois da formação da memória? Além de mediar a formação, ela poderia contribuir na manutenção da memória no hipocampo? O grupo de Paul Frankland e Sheena Josselyn no Canadá tem aportado evidência experimental sólida para responder essas perguntas.

Akers et al., (2014), usando a tarefa de condicionamento aversivo ao contexto, mostraram que o aumento da neurogênese por meio do exercício físico em camundongos adultos depois do aprendizado acelera o esquecimento da informação. Ao mesmo tempo, é sabido que durante a infância e a adolescência processos de neurogênese são aumentados. No entanto, o desempenho em tarefas dependentes do hipocampo em animais é menor durante essas etapas: de fato, o chamado fenômeno de “amnésia infantil” tem sido bastante estudado pela aparente dificuldade de se reter informação por períodos longos de tempo nestas idades (Josselyn and Frankland, 2012; Callaghan et al., 2014). Nesta mesma publicação, Akers et al., (2014) conseguiram aumentar a persistência de memórias em animais jovens diminuindo, por métodos genéticos, a neurogênese hipocampal. Esse resultado implica que a amnésia infantil pode ser mediada por um maior nascimento de novas células que acontece neste período da vida. O esquecimento nesta aproximação é entendido como um déficit de evocação, que por sua vez está associado com o “agrupamento de padrões” (pattern completion em inglês). O agrupamento de padrões seria a recuperação da atividade presente durante a codificação da informação no momento de ser evocada, permitindo que todos os circuitos envolvidos entrem em atividade para uma reconstrução fidedigna da memória. A incorporação de novas células a circuitos funcionais (muitos deles representando engramas de memórias) poderia induzir uma reestruturação do padrão de conectividade desses circuitos, no caso de circuitos que fazem parte do engrama, essa reestruturação poderia impedir a reconstrução do traço da memória durante a evocação.

O efeito do aumento da neurogênese em promover o esquecimento tem sido interpretado como um possível mecanismo para entender como o hipocampo pode remover ativamente circuitos para “limpar” ou fazer um “clearance” das informações armazenadas nesta estrutura (Frankland et al., 2013). O enfraquecimento progressivo de circuitos estabelecidos poderia permitir o armazenamento de novas informações, hipótese que deixa o hipocampo como uma estrutura com um limite para codificação de novas informações.

Uma alternativa à interpretação do esquecimento tem surgido em anos recentes. Kitamura et al., (2014) propõe que mais do que uma perda da informação, a neurogênese pode induzir a reorganização das memórias entre circuitos do hipocampo e córtex (Kitamura and Inokuchi, 2014). Nesta perspectiva, o “clearance” hipocampal seria acompanhado do aumento gradual da dependência cortical. De fato, o exercício físico após o condicionamento aversivo ao contexto, melhora a neurogênese e acelera o decaimento da dependência hipocampal para esta tarefa, no entanto nenhuma diminuição na força da memória foi verificada (Kitamura et al., 2009).

Existe a possibilidade de que a neurogênese seja um dos motores que direciona o processo da consolidação sistêmica. Alguns estudos tem mostrado que produção de novos neurônios no giro denteado pode contribuir para gerar ondas cerebrais acentuadas (sharp-wave ripples) durante períodos de sono e inatividade na região CA3 que permite a reverberação de circuitos entre hipocampo e córtex necessário para a formação de memórias remotas (Inokuchi, 2011). Desta forma, a integração de novas células no giro denteado levaria a

dois processos complementares: a) remodelamento e remoção de circuitos no hipocampo e b) envolvimento de estruturas corticais para o armazenamento de memórias de longa duração (Kitamura et., 2014). Esta hipótese da neurogênese como um catalisador da consolidação sistêmica concorda com evidências em modelos animais (Kitamura et al., 2014) e as premissas computacionais do processamento de informação no hipocampo (Rolls and Kesner, 2006).

1.4.5.2. Esquemas

Como mencionado anteriormente, um sistema de limpeza do registro de memórias hipocampais pode resultar efetivo para garantir continuamente a codificação de novas informações; no entanto, todas as memórias que podemos adquirir ao longo da vida podem ter ou não similaridades. Aquelas que compartilham informação relevante podem formar um arcabouço ou “esquema” sobre suas similaridades. Por exemplo, duas tarefas comportamentais, o Labirinto Aquático de Morris e o Labirinto de Barnes, são modelos usados para investigar o processamento de memórias espaciais: os dois têm como característica que o animal deve encontrar um local de refúgio (uma plataforma ou um compartimento obscuro, respectivamente) para evitar algumas condições experimentais indesejáveis como nadar forçosamente ou explorar ambientes abertos. As duas tarefas precisam de dicas contextuais que permitem a localização do animal no espaço e atingir o objetivo. O conjunto de regras de ambos os labirintos é bem parecida, mesmo que cada um possua suas particularidades. Poderia o aprendizado de uma tarefa facilitar o aprendizado

de uma segunda com regras parecidas? Seria possível elaborar um “esquema” de qual é a melhor estratégia para ser bem sucedido nestas tarefas independente de mudanças pequenas que não afetem a regra geral?

A palavra “esquema” foi introduzida pela primeira vez na literatura pelo psicólogo inglês Sir Frederick Bartlett em 1932. Esquema refere-se a estruturas de conhecimento prévio no qual novas informações adquiridas podem ser incorporadas; ou desta forma, o conhecimento que temos do mundo é uma série de esquemas de experiências anteriores nas quais futuros aprendizados poderão ser incorporados (Bartlett, 1932). O esquema poderia ser entendido como uma forma de classificação que permite organizar os aprendizados segundo o conjunto de regras que compartilham.

Os esquemas, conceitos próprios da psicologia cognitiva (Blansford, 1972) amplamente usados em abordagens psicoterapêuticas (Stein, 2009; Beck and Haigh, 2014) tem mostrado por outro lado uma forte relação com a consolidação sistêmica da memória. Tse, Langston et al., (2007) usaram um modelo de condicionamento olfativo para mostrar como poderiam funcionar os esquemas. O modelo consistia num campo aberto com múltiplos buracos, e só um deles tinha um reforço (comida). No compartimento inicial, antes de começar a exploração, o animal era exposto a um cheiro, por exemplo banana. O cheiro era uma dica para o animal saber a qual dos buracos deveria ir para obter o reforço. Em cada sessão foram usados dois cheiros, cada cheiro associado a uma localização específica na arena do buraco contendo o reforço. Durante o experimento foram quantificados os erros de

exploração (tempo gasto em buracos incorretos) e a latência para encontrar o reforço. Com treinos sucessivos os animais conseguiam discriminar até 4 cheiros diferentes com localizações específicas do reforço, completando rapidamente cada sessão. Com este protocolo os pesquisados conseguiram interessantes resultados: 1) a integridade do hipocampo é essencial para aprender a localização de cada reforço associado com um cheiro em particular (lesão antes do treino), 2) depois de um mês de treinamento constante na tarefa, o hipocampo não é mais requerido para a evocação destas memórias (lesão depois do treino), 3) depois de um mês de treinamento, os animais expressam facilidade para aprender a associação entre novos cheiros e localizações no campo aberto (só uma sessão de treino foi necessária), 4) uma lesão do hipocampo 48h depois da incorporação da nova associação falhou em afetar a memória e 5) o envolvimento do hipocampo para o aprendizado de novas associações é restrito a uma janela de aproximadamente 3 horas depois do novo treino.

Destes resultados podemos afirmar que o treinamento constante na arena facilita o aprendizado de novas informações com regras similares á primeira. Ainda mais surpreendentemente, o papel do hipocampo para a consolidação das novas associações foi limitado a 3h horas depois do aprendizado, fato que contrasta com as observações clássicas da janela de consolidação celular de aproximadamente 6h. Os pesquisadores interpretaram esses resultados como evidencia que os esquemas em efeito existem. O aprendizado de uma tarefa com um conjunto de regras pode facilitar aprendizados subsequentes que mantém o mesmo padrão.

Mas como esses resultados podem estar associados com a consolidação sistêmica? Estudos posteriores do mesmo grupo revelaram que a administração do antagonista dos receptores AMPA, o CNQX ou dos receptores NMDA, d-AP5, no córtex cingulado anterior antes do aprendizado de novas associações (depois de um mês de treinamento) prejudica a incorporação de novas informações. Resultados similares foram encontrados durante a evocação: o CNQX mas não o d-AP5 prejudicou a evocação da nova informação incorporadas no esquema (Wang et al., 2013). Esses resultados ampliam a visão da natureza dos esquemas, mostrando que depois de treinamento constante o córtex é essencial para a incorporação e expressão de novas associações. Destes experimentos podemos concluir que, depois de estabelecido o esquema, o hipocampo participa por um tempo limitado na incorporação de novas informações e a atividade do córtex cingulado anterior permite que as novas associações sejam adquiridas rapidamente. Este é um caso de consolidação sistêmica acelerada, onde a reorganização da memória entre hipocampo e córtex é realizada rapidamente quando existe um esquema cortical previamente elaborado, hipótese defendida pelos autores do estudo (Tse et al., 2008); no entanto, interpretações adicionais têm sugerido que tratamentos no córtex imediatamente antes ou depois da nova associação poderiam interferir com processos de consolidação celular ocorrendo nestas estruturas (Rudy e Sutherland., 2008), uma opção que não pode ser descartada já que processos de consolidação celular ocorrem em paralelo tanto no hipocampo como fora dele (Dash et al., 2004).

Os estudos citados anteriormente demonstraram que a dinâmica na comunicação entre hipocampo e córtex pode mudar dependendo de experiências prévias. Os resultados que

serão mostrados nesta dissertação abordam a interação entre diferentes traços de memória e a influência que eles exercem na dinâmica da consolidação sistêmica; no entanto, as interpretações se afastam da hipótese dos esquemas pela pouca evidência que temos de tal fenômeno em nossos protocolos.

1.5. Avaliando precisão da memória

A hipótese da Transformação da Memória ressalta a perda progressiva de detalhes que ocorre durante a consolidação sistêmica, fenômeno conhecido como “semantização”. Esse processo implica uma mudança significativa na qualidade da memória em pontos recentes e remotos. Uma forma de avaliar o impacto dessa perda de detalhes é testando quão precisa é a memória. No caso do condicionamento aversivo ao contexto esta pode ser comparada à resposta do animal quando exposto ao contexto original de aprendizado ou durante a exposição a um contexto totalmente diferente (novo). Esse método foi utilizado por Wiltgen e Siva (2007) para avaliar como a precisão da memória muda ao longo do tempo. Os pesquisadores encontraram que a memória torna-se menos precisa (tempo de congelamento igual no contexto original e no alternativo) ao passar do tempo; desta forma, a memória se mostrou precisa quando testada 1d depois do treino e completamente generalizada 36d depois do treino. Adicionalmente, uma sessão de reativação (reminder) onde os animais recebem uma curta reexposição ao contexto no dia 35, permitiu que no teste 24h depois os animais expressassem uma maior precisão.

Resultados similares foram publicados em nosso laboratório demonstrando que a reativação periódica da memória promove a dependência hipocampal e precisão da memória. Usando também uma tarefa de condicionamento aversivo ao contexto, de Oliveira Alvares et al., (2011) mostrou que breves reexposições ao contexto de condicionamento deixam a memória vulnerável aos efeitos intrahippocampais do muscimol num ponto do tempo onde normalmente o mesmo tratamento não teria efeito na evocação da memória. Adicionalmente, os animais reativados conseguiram discriminar entre o contexto original e alternativo, enquanto animais não reativados generalizaram a resposta de congelamento.

Estudos anteriores sugerem que a reativação de um traço de memória pode fortalecer a representação da memória no hipocampo (Winocur et al., 2010) o que poderia retardar o processo de consolidação sistêmica. Ao mesmo tempo esses experimentos foram os primeiros em mostrar, mesmo que indiretamente, que existe de fato uma estreita relação entre consolidação sistêmica e precisão da memória, relação que será o principal foco desta dissertação.

Com tudo, essas possíveis funções biológicas da consolidação sistêmica tem sido abordadas como um processo passivo e dependente do tempo (e.g. ao longo do tempo memórias podem se tornar mais gerais e esquemas são estabelecidos para facilitar a incorporação de novas informações baseadas nesses esquemas), no entanto é possível hipotetizar que devem existir diferenças entre os tipos de aprendizado e inclusive diferenças entre indivíduos que fazem da consolidação sistêmica um processo flexível e heterogêneo, isto é, memórias de diferente natureza (aversivas vs apetitivas) e intensidade (memórias mais fortes como as

provenientes de eventos traumáticos) poderiam exibir perfis diferentes de consolidação sistêmica. Por outro lado, não todos os animais que experimentam o mesmo evento de aprendizado poderiam consolidar sistemicamente essa memória da mesma forma. Esta dissertação tentara mostrar como as condições durante o aprendizado são um fator que determina o transcurso da consolidação sistêmica e propor um sistema mais flexível e suas implicações.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral do Artigo 1

No primeiro artigo direcionamos nossos experimentos para estabelecer como diferentes intensidades de treino durante o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) poderiam influenciar a dependência hipocampal e precisão da memória, assim como os mecanismos envolvidos nesta eventual modulação.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos são apresentados na ordem dos experimentos.

Experimentos Avaliando Dependência Hipocampal

2.2.1. Avaliar a dependência hipocampal 25 dias depois do treino em animais reativados e não reativados submetidos a um protocolo de treino forte no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.2.2. Avaliar a dependência hipocampal 25 dias depois do treino em animais reativados e não reativados submetidos a um protocolo de treino fraco no CAC (4 choques de 0,4 mA).

2.2.3. Avaliar a dependência hipocampal 15 dias depois do treino em animais reativados e não reativados submetidos a um protocolo de treino forte no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.2.4. Avaliar a dependência hipocampal 7 dias depois do treino em animais reativados e não reativados submetidos a um protocolo de treino forte no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.2.5. Avaliar a dependência hipocampal 40 dias depois do treino em animais reativados e não reativados submetidos a um protocolo de treino fraco no CAC (4 choques de 0,4 mA).

Experimentos Avaliando Precisão da Memória

2.2.6. Avaliar a precisão da memória (contexto original vs contexto novo) em animais submetidos a um protocolo de treino forte no CAC (8 choques de 1,0 mA) 3, 7, 15 e 25 dias após o treino.

2.2.7. Avaliar a precisão da memória (contexto original vs contexto novo) em animais submetidos a um protocolo de fraco no CAC (4 choques de 0,4 mA) 3, 25 e 40 dias após o treino.

Experimentos Avaliando os Mecanismos

2.2.8. Avaliar o efeito da administração pré-treino do inibidor de síntese de corticoides metirapona na precisão da memória 25 dias depois de um treino forte no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.2.9. Avaliar o efeito da administração pré-treino do β -bloqueador propranolol na precisão da memória 25 dias depois de um treino forte no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.3. Objetivo Geral do Artigo 2

Motivados pelos resultados do artigo 1, decidimos procurar outros fatores que tivessem a mesma capacidade de mudar a taxa da consolidação sistêmica da memória e a precisão. Baseados nas evidências prévias do nosso laboratório e na literatura relatando o envolvimento precoce de estruturas corticais em aprendizados subsequentes, neste segundo manuscrito verificamos a dinâmica da consolidação sistêmica em aprendizados subsequentes do condicionamento aversivo ao contexto (CAC) com diferentes intensidades de treino. Como nos experimentos apresentados no artigo 1, um paralelo entre dependência hipocampal e precisão da memória foi estabelecido.

2.4. Objetivos Específicos

Os objetivos são apresentados na ordem dos experimentos.

Experimentos Avaliando Precisão da Memória

2.4.1. Avaliar a precisão da memória (contexto original vs contexto novo) 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.4.2. Avaliar a precisão da memória (contexto original vs contexto novo) 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fracos no CAC (4 choques de 0,4 mA).

2.4.3. Avaliar a precisão da memória (contexto original vs contexto novo) 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos, o primeiro forte (8 choques de 1,0 mA) e o segundo fraco (4 choques de 0,4 mA) no CAC.

2.4.4. Avaliar a precisão da memória (contexto original vs contexto novo) 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos, o primeiro forte (8 choques de 1,0 mA) e o segundo só com exposição ao contexto sem choque (não treinado) no CAC.

Experimentos Avaliando a Dependência Hipocampal

2.4.5. Avaliar a dependência hipocampal 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.4.6. Avaliar a dependência cortical 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.4.7. Avaliar a dependência hipocampal 7 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.4.8. Avaliar a dependência cortical 25 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

Experimentos Avaliando os Mecanismos

2.4.9. Avaliar os efeitos da reativação periódica da memória na precisão da memória 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.4.10. Avaliar a interação entre reativação periódica da memória e administração sistêmica de nimodipina na precisão da memória 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

2.4.11. Avaliar o efeito da administração sistêmica de nimodipina antes do segundo aprendizado na precisão da memória 15 dias após o treino em animais submetidos a dois treinos fortes no CAC (8 choques de 1,0 mA).

3.0. ARTIGO 1 (Anexo)

O seguinte manuscrito, intitulado “**The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality**”, foi publicado na revista “**Hippocampus**” (2016 Mar;26(3):362-71. doi: 10.1002/hipo.22527. Epub 2015 Oct 6).

O referido manuscrito pode ser referenciado como:

Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, de Oliveira AL. 2016. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*. 26(3):362-71.

The Dynamic Nature of Systems Consolidation: Stress During Learning as a Switch Guiding the Rate of the Hippocampal Dependency and Memory Quality

Lizeth K. Pedraza,^{1,2} Rodrigo O. Sierra,^{2,3} Flávia Z. Boos,^{2,3} Josué Haubrich,^{2,3}
Jorge A. Quillfeldt,^{2,3} and Lucas de Oliveira Alvares^{1,2*}

ABSTRACT: Memory fades over time, becoming more schematic or abstract. The loss of contextual detail in memory may reflect a time-dependent change in the brain structures supporting memory. It has been well established that contextual fear memory relies on the hippocampus for expression shortly after learning, but it becomes hippocampus-independent at a later time point, a process called systems consolidation. This time-dependent process correlates with the loss of memory precision. Here, we investigated whether training intensity predicts the gradual decay of hippocampal dependency to retrieve memory, and the quality of the contextual memory representation over time. We have found that training intensity modulates the progressive decay of hippocampal dependency and memory precision. Strong training intensity accelerates systems consolidation and memory generalization in a remarkable timeframe match. The mechanisms underpinning such process are triggered by glucocorticoid and noradrenaline released during training. These results suggest that the stress levels during emotional learning act as a switch, determining the fate of memory quality. Moderate stress will create a detailed memory, whereas a highly stressful training will develop a generic gist-like memory. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: consolidation; hippocampus; generalization; memory; stress

INTRODUCTION

The ability to retain new experiences into long-term memory is crucial to guide our behavior and respond properly to the environment stimuli that resemble previously acquired situations. Memories can be qualitatively dis-

tinct: some information is stored in a general, abstract form, while other is retained in a detailed and specific manner. Depending on the circumstance, retaining a gist-like generic memory may be worthwhile, since it allows the identification of a threat quickly. Conversely, precise detailed memory permits an accurate identification of a specific situation.

The process through which information is retained as long-lasting memory does not occur instantaneously. Right after acquisition, memory becomes labile and sensitive to modulation; hence, it may be strengthened or disrupted. Gradually, memory is transformed into a more stable form. This postacquisition process of stabilization is called synaptic (or cellular) consolidation (McGaugh, 2000). Different studies have shown that memory trace following contextual fear conditioning is stabilized 6 h, approximately, after learning. In fact, pharmacological disruption beyond this time fails to interfere in memory consolidation (Dudai, 2004; Gazarini et al., 2013; Gazarini et al., 2014).

It has been thought that consolidation plays an important and adaptive role in the memory fate, depending on the relevance of the memory content. For instance, stress hormones such as glucocorticoid and noradrenaline released in a threatening situation enhance memory consolidation (Roosendaal et al., 1996; Roosendaal et al., 2006; de Oliveira Alvares et al., 2010; Atsak et al., 2012). Conversely, exposure to a very high stressful experience, in which stress hormones go beyond optimal levels, may lead to memory impairment (de Kloet et al., 1999; Okuda et al., 2004; Lupien et al., 2007; Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Salehi et al., 2010), or even to the development of psychopathologies such as post-traumatic stress disorder (PTSD) (de Kloet et al., 2005; de Quervain et al., 2009; Kaouane et al., 2012; Finsterwald and Alberini, 2014).

The term consolidation is also used for describing a more prolonged process called systems consolidation, which may last weeks in rodents and years in humans (Frankland and Bontempi, 2005). Such process relies on the gradual reorganization of brain structures supporting memory. Studies in amnesic patients (Bayley and Squire, 2005; Bayley et al., 2006), and in animal models (Winocur, 1990; Anagnostaras et al., 1999; Maviel et al., 2004) have shown a decreasing involvement of the hippocampus in memory over time.

This article was published online on 6 Oct 2015. An error in the data in Table 1 was subsequently identified by the corresponding author. This notice is included in the print and online versions to indicate that both have been corrected on 20 Jan 2016.

¹Laboratório De Neurobiologia Da Memória, Porto Alegre, 91.501-970, Brazil; ²Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 90.046-900, Brazil; ³Laboratório De Psicobiologia E Neurocomputação, Biophysics Department, Biosciences Institute, Porto Alegre, 91.501-970, Brazil

Grant sponsors: CAPES (MEC), Universal-CNPq (MCT), and PROPESQ (UFRGS).

*Correspondence to: Lucas de Oliveira Alvares; Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 216, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br
Accepted for publication 26 August 2015.
DOI 10.1002/hipo.22527

Published online 2 September 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

An important question arises from the observed reorganization of memory over time: are memories mediated by the hippocampus qualitatively identical to memories mediated by extrahippocampal structures? Animal studies have reported a gradual increase in generalization of contextual fear conditioning over time (i.e., a diminishing ability to distinguish a context associated with a footshock from a novel context). In these studies, memory for contextual fear was specific to the training context at short delays after training. However, at longer delays, the specificity declined and the freezing response generalized to dissimilar environments (Biedenkapp and Rudy, 2007; Wiltgen and Silva, 2007; Winocur et al., 2007; de Oliveira Alvares et al., 2012). Therefore, it may be concluded that memory becomes less precise with the passage of time. The timeframe of this generalization closely matches that of the systems consolidation process, suggesting that there is indeed a causal relationship between them (Wiltgen et al., 2010; de Oliveira Alvares et al., 2012), although some conflicting reports exist in the literature (Wang et al., 2009).

Most of the studies evaluating systems consolidation and memory generalization were tested about 4 weeks after training. Does the amount of stress induced during training affect the time course of hippocampal dependency and memory generalization? We hypothesize that the training intensity experience is an important factor involved in the gradual decay of hippocampal dependency and the maintenance of a precise representation of contextual memory over time. Thus, the objective of this study was to investigate if training intensity interferes in the dynamic of systems consolidation and how it affects memory precision over time. Moreover, we assessed the mechanisms triggered during learning that interfere with the time course of systems consolidation and the quality of memory. We found that a strong footshock training intensity accelerates systems consolidation and memory generalization. Furthermore, we found that such process is induced by glucocorticoids and noradrenaline released during the training.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Male adult Wistar rats (270–320 g) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, four to five per cage, under a 12-h light/dark cycle and at a constant temperature of 24°C, with water and food ad libitum. All experiments were conducted in accordance to local and national (Federal Law 11.794/2008) guidelines for animal care. The project has been approved by the University's Ethics Committee.

Stereotaxic Surgery and Cannula Placement

Rats were deeply anesthetized by an i.p. injection of ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally

implanted with 27-gauge guide cannula aimed at anteroposterior (AP) 24.2 mm (from bregma), laterolateral (LL) ± 3.0 mm, dorsoventral (DV) 1.8 mm, positioned just 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (Paxinos and Watson, 1998). After a 1-week recovery from surgery, animals were submitted to behavioral procedures. Following the behavioral experiments, subjects were sacrificed and their brains dissected and preserved in 10% formaldehyde to verify for cannula position. Only animals with correct cannula placements were included in the statistical analysis.

Drugs

Metyrapone (Sigma-Aldrich), a reversibly inhibitor of cortisol synthesis, was dissolved in sterile isotonic saline with 10% DMSO to a final concentration of 50 mg/ml and injected intraperitoneally (50 mg/kg). The dose of metyrapone was selected on the basis of previous findings, indicating that it effectively blocks stress-induced increases in circulating levels of corticosterone (Roosendaal et al., 1996). Muscimol (Sigma-Aldrich), an agonist of GABA_A receptor, was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) to a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus in a volume of 0.5 μl . Vehicle composition and the selected dose for muscimol was chosen on the basis of previous experiments in our laboratory (de Oliveira Alvares et al., 2012). Propranolol Hydrochloride (Sigma-Aldrich), a β -adrenoceptor antagonist, was dissolved in PBS to a concentration of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively, and infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus in a volume of 0.5 μl . The dose of propranolol was selected based on previous studies (Guzmán-Ramos et al., 2012).

Intrahippocampal Infusion

At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into guide cannula, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula end and aimed at the pyramidal cell layer of CA1 of the dorsal hippocampus. A volume of 0.5 μl was bilaterally infused at a slow rate (20 $\mu\text{l}/\text{h}$) and the needle was removed only after another additional 30 s.

Behavioral Procedure

Experiments were divided in hippocampal dependency and memory precision experiments as described below:

Hippocampal Dependency

Contextual fear conditioning

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box, 25 \times 25 cm, with a metallic grid floor (conditioning context; conditioning Ctx). Depending on the experiment performed, rats were trained in a weak or strong intensity protocol. In the weak training intensity protocol, rats were placed in the chamber for 3 min, then received four footshocks of 0.4 mA/1 s and returned to their home cages 60 s after the last

shock. In the strong training intensity protocol, the procedure was exactly the same, but animals received eight footshocks of 1.0 mA/1 s.

Test session

Animals were tested for 4 min either in conditioning context, or in a novel context (Novel ctx) on day 3, and subsequently, in the conditioning context 7, 15, 25, or 40 days after training, depending on the experiment performed. Intrahippocampal infusion of muscimol was performed 15 min before test session.

Retest session

Animals were retested for 4 min either in conditioning context and 4 h after the test session in a drug-free condition.

Memory Precision

Contextual fear conditioning

Animals were conditioned as described above.

Test session

Animals were tested for 4 min either in conditioning context or in a novel context (Novel ctx) 7, 15, 25, or 40 days after training, depending on the experiment performed. Intraperitoneal administration of metyrapone was performed 50 min before training and intrahippocampal infusion of propranolol immediately after training.

In all experiments, freezing behavior was registered in real-time by an experienced observer with the use of a stopwatch. This observer was blind to the treatments. Freezing was defined as the absence of all movements, except those related to breathing (Blanchard and Blanchard, 1969).

Context apparatus

Context (conditioning context) consisted of an illuminated Plexiglas box of 20 × 25 × 22 cm, grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart, and fan background noise.

Novel context

The novel context was a rectangular box 2/3 the size of the conditioning context, smooth floor, vanilla essence, and without fan background noise.

Statistical Analysis

We used two-way independent ANOVA, two-way with repeated measures ANOVA or independent *t*-test (2-tailed). Fisher post hoc test was further used to identify significant differences when applicable. Significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Distinct Training Intensities Predict Different Systems Consolidation Rate

We first assessed whether animals fear conditioned by distinct training intensities would form memory with different quality. The rats were trained with the strong or weak protocol and were tested in the same or in a novel context 2 days later. Twenty-five days after training, we divided the rats into two groups: animals previously tested in the conditioning (reactivated) or in the novel context (nonreactivated). In order to verify hippocampal dependency, animals received muscimol into the dorsal hippocampus before the test in the conditioning context on day 25 and, 4 hours later, they were retested in a drug free condition as a within subject control. Under strong training intensity, ANOVA for repeated measures revealed significant effects of reactivation context × time factor interaction ($F_{2,22} = 15.715$, $P = 0.002$), but not for reactivation context ($F_{1,11} = 0.081$, $P = 0.780$) and time factor ($F_{2,22} = 3.290$, $P = 0.056$). Post hoc analysis showed higher freezing levels in the conditioning context on day 3, compared to the novel context ($P < 0.01$). Additionally, reactivated animals—but not nonreactivated animals ($P > 0.05$)—expressed less freezing during test compared to retest session on day 25 ($P < 0.05$; Fig. 1a).

In the weak protocol, ANOVA for repeated measures revealed significant effects of time factor ($F_{2,20} = 8.329$, $P = 0.002$) and reactivation context × time factor interaction ($F_{2,20} = 17.715$, $P = 0.000$), but not for reactivation context ($F_{1,10} = 0.577$, $P = 0.464$). Post hoc analysis showed higher freezing levels in the conditioning context on day 3 compared to the novel context ($P < 0.001$). Additionally, reactivated and nonreactivated animals expressed less freezing during test compared to retest session on day 25 ($P < 0.05$; Fig. 1b).

Taken together, these results show that the animals trained in the strong protocol without previously reactivation on day 3 present a hippocampal independent memory on day 25. Conversely, the animals trained under the weak protocol are still hippocampus dependent at the same point in time, suggesting that training intensity modulates systems consolidation.

Strong Training Intensity Accelerates Systems Consolidation

The results above have shown that the progressive decay of hippocampal dependency to support memory may be modulated by the training intensity, making this process proportionally faster according to the training strength. We then investigated when systems consolidation actually occurs following the strong protocol. Animals were conditioned with the strong protocol as described above, but they were tested on day 15. ANOVA for repeated measures revealed significant effects of time factor ($F_{2,18} = 4.040$, $P = 0.035$) and reactivation context × time factor interaction ($F_{2,18} = 40.998$, $P = 0.000$), but not for reactivation context ($F_{1,9} = 0.026$, $P = 0.874$). Post hoc

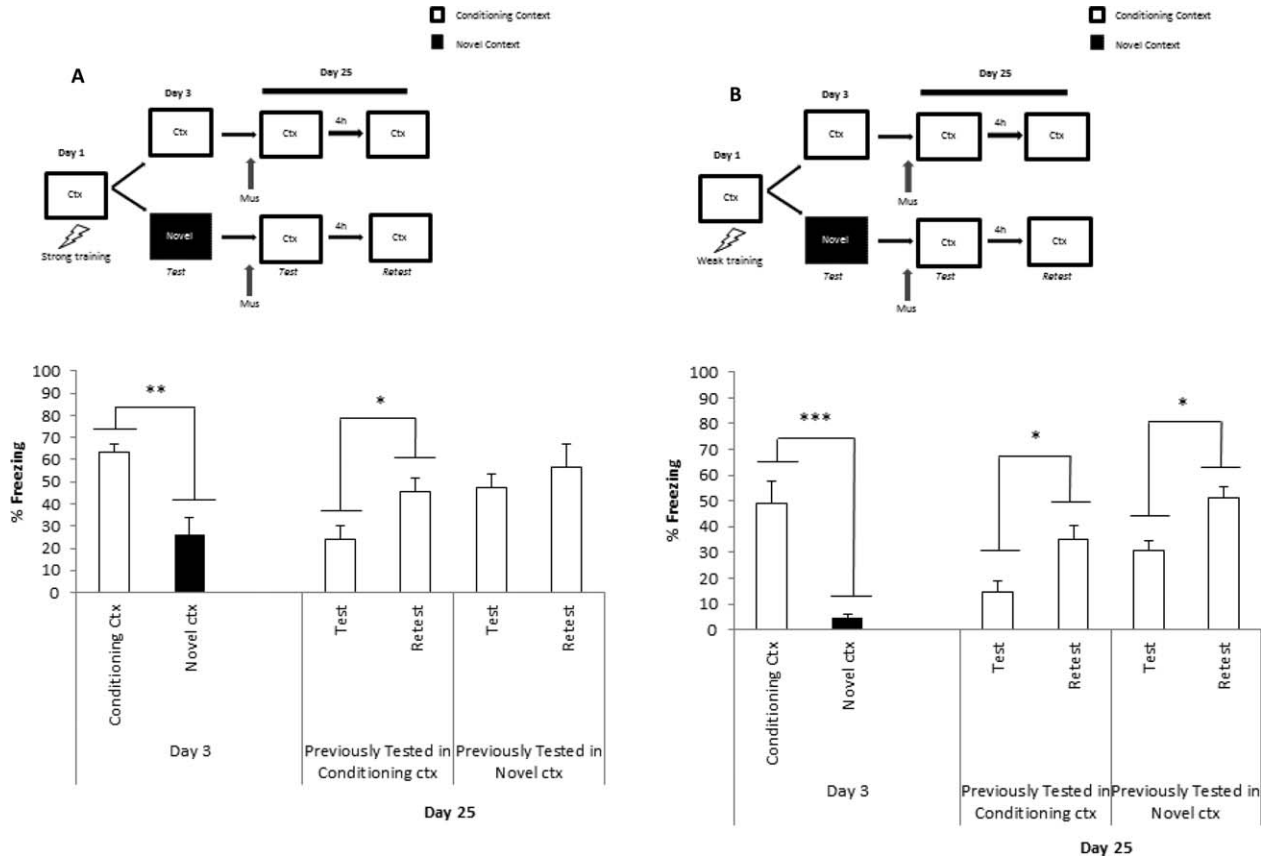


FIGURE 1. Training intensity predicts different systems consolidation rate. Graphs show the mean ± SEM of percentual freezing time. Experimental design is depicted at the top of each panel. (A) Strong protocol. Animals expressed higher freezing levels in the conditioning context on day 3 compared to the novel context. No significant differences were found in animals previously tested in a novel context (nonreactivated) on day 25. However, animals previously tested in the conditioning context (reactivated)

expressed less freezing during test when compared to retest session. (B) Weak protocol. Animals expressed higher freezing levels in the conditioning context on day 3 compared to the novel context. Both reactivated and nonreactivated animals expressed less freezing levels during test when compared to retest session. (conditioning context $n = 6$, novel context $n = 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

analysis showed higher freezing levels in the conditioning context on day 3, compared to the novel context ($P < 0.001$). Additionally, reactivated animals—but not nonreactivated animals ($P > 0.05$)—expressed less freezing during test compared to retest session on day 15 ($P < 0.05$; Fig. 2a).

Since memory was still hippocampus independent on day 15, a separate group of animals was tested on day 7. ANOVA for repeated measures revealed significant effects of time factor ($F_{2,24} = 14.019$, $P = 0.000$) and reactivation context × time factor interaction ($F_{2,24} = 19.336$, $P = 0.000$), but not for reactivation context ($F_{1,12} = 1.850$, $P = 0.198$). Post hoc analysis showed higher freezing levels in the conditioning context on day 3, compared to the novel context ($P < 0.05$). Additionally, reactivated and nonreactivated animals expressed less freezing during test compared to retest session on day 7 ($P < 0.01$; Fig. 2b). These results show that the strong protocol accelerates the rate of systems consolidation somewhere between 7 and 15 days after training.

Weak Training Intensity Keeps Hippocampal Dependency Up to 40 Days

Since the muscimol disrupted retrieval of animals trained in the weak training protocol on day 25, we asked if the hippocampus would be engaged to retrieve memory at later time points. Then, animals were trained under the weak protocol as described above, but tested on day 40. ANOVA for repeated measures revealed significant effects of time factor ($F_{2,20} = 4.158$, $P = 0.030$) and reactivation context × time factor interaction ($F_{2,20} = 7.692$, $P = 0.003$), but not for reactivation context ($F_{1,10} = 0.639$, $P = 0.442$). Post hoc analysis showed higher freezing levels in the conditioning context on day 3, compared to the novel context ($P < 0.05$). Additionally, nonreactivated animals—but not reactivated animals ($P > 0.05$)—expressed less freezing during test compared to retest session on day 40 ($P < 0.05$; Fig. 3). Thus, weak training extends the hippocampal dependency of memory.

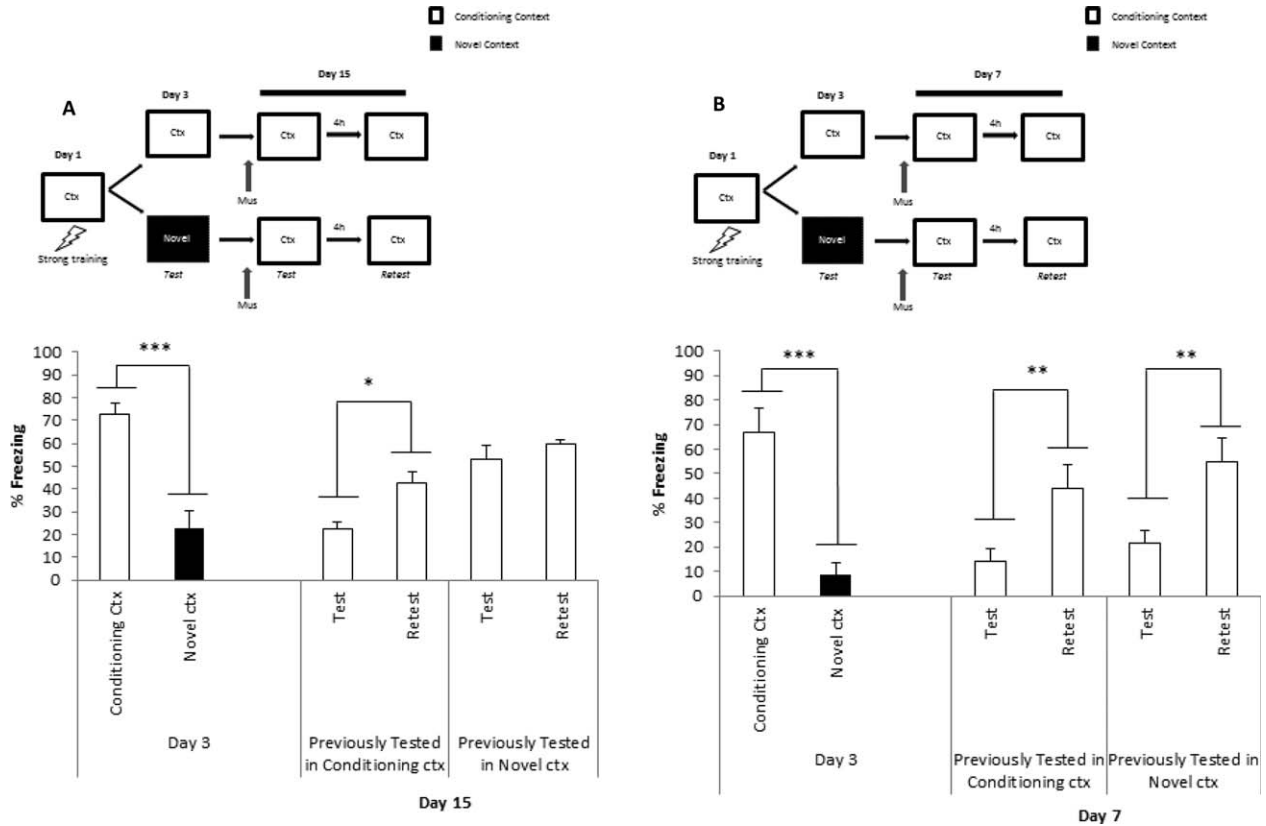


FIGURE 2. Strong training intensity accelerates systems consolidation. Graphs show the mean \pm SEM of percentual freezing time. Experimental design is depicted at the top of each panel. (A) Animals expressed higher freezing levels in the conditioning context on day 3 compared to the novel context. No significant differences were found in animals previously tested in a novel context. Animals previ-

ously tested in the conditioning context expressed less freezing levels during test when compared to retest session on day 15. (B) On day 7, both groups expressed less freezing levels during test when compared to retest session (conditioning context $n = 6$, novel context $n = 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Strong Training Intensity Accelerates Memory Generalization

Previous studies have reported a gradual loss of contextual fear memory precision with the passage of time. Does training intensity affect the maintenance of detailed contextual memory over time? To address this question, animals were first trained in the strong protocol and then tested either in the same or in the novel context on day 3, 7, 15, and 25. Two-way ANOVA revealed significant effects of time factor ($F_{3,77} = 5.471$, $P = 0.001$), reactivation context ($F_{1,77} = 20.349$, $P = 0.000$) and reactivation context \times time factor interaction ($F_{3,77} = 7.314$, $P = 0.000$). Post hoc analysis showed higher freezing levels in the conditioning context on day 3 and 7, compared to the novel context ($P < 0.001$) but not on day 15 and 25 (Fig. 4). These results show that not only does strong training intensity accelerate the rate of memory systems consolidation (as shown in Figs. 1 and 2), but it also speeds up memory generalization.

Weak Training Intensity Maintains Memory Precise Up to 40 Days

To test the possible relationship between memory precision and hippocampal dependency, we next trained animals with

the weak training protocol and tested them either in the same or in the novel context on day 3, 25, and 40. Two-way ANOVA revealed significant effects of time factor ($F_{2,55} = 7.425$, $P = 0.001$), reactivation context ($F_{1,55} = 29.690$, $P = 0.000$), but not for reactivation context \times time factor interaction ($F_{2,55} = 0.389$, $P = 0.679$). Post hoc analysis showed higher freezing levels in the conditioning context on day 3, 25, and 40 ($P < 0.05$; Fig. 5). These results show that weak training extends the gradual loss of the contextual fear memory precision up to 40 days.

Glucocorticoids and Noradrenaline Are Necessary to Accelerate Memory Generalization

What mechanism could be triggered during the training that would modulate the maintenance of detailed contextual memories over time? Cordero et al. (1998) have found a positive correlation between footshock intensity during the training in contextual fear conditioning and corticosterone plasma levels (Cordero et al., 1998). We hypothesized that the high glucocorticoid levels released during the strong protocol could be involved in the faster generalization rate. If this prediction is correct, inhibiting the glucocorticoid synthesis during the strong training

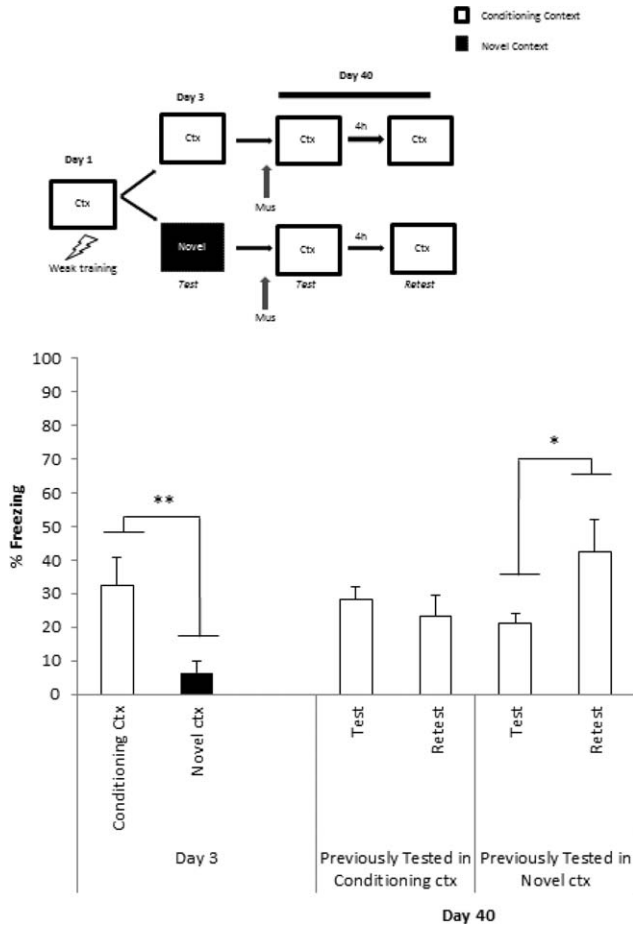


FIGURE 3. Weak training intensity keeps hippocampal dependency. Graphs show the mean \pm SEM of percentual freezing time. Experimental design is depicted at the top of each panel. Animals expressed higher freezing levels in the conditioning context on day 3 compared to the novel context. Animals previously tested in a novel context expressed less freezing levels during test when compared to retest session on day 40. No significant differences were found in animals previously tested in the conditioning protocol during test and retest sessions (conditioning context $n = 7$, novel context $n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

would keep memory precise at a point in time in which it is normally generalized. Animals received the injection of metyrapone 50 min before being trained in the strong protocol. On day 25, they were tested either in the conditioning or in the novel context. Animals tested in the conditioning context expressed higher freezing levels compared to animals tested in the novel context ($t(17) = 2.234$; $P = 0.039$, independent t -test; Fig. 6a). Thus, the inhibition of glucocorticoid synthesis during learning maintains memory precise at a point in time when it is ordinarily generalized, suggesting that glucocorticoid plays an important role to modulate the generalization rate.

It has been shown that glucocorticoid interacts with the noradrenergic systems in order to modulate memory (Roosendaal et al., 1999; McReynolds et al., 2010). Moreover, a recent study has reported that noradrenaline plays an important role in memory generalization through the activation of β adrenergic recep-

tors (Gazarini et al., 2014). Then, we asked if the hippocampal noradrenergic transmission during the strong training would be involved in the memory generalization. The animals were trained with the strong protocol and, immediately after training, they received an intrahippocampal infusion of propranolol. Twenty-five days later, they were tested either in the training context or in the novel context. Animals tested in the conditioning context expressed higher freezing levels when compared to animals tested in a novel context ($t(16) = 4.834$; $P = 0.000$, independent t -test; Fig. 6b). Hence, it could be concluded that the activation of β adrenergic receptors in the hippocampus during emotional learning modulates memory generalization positively.

Taken together, these results show that glucocorticoid and noradrenaline released during emotional learning play an important role in the fate of memory quality over time.

DISCUSSION

This study examined a putative involvement of the training intensity on the dynamics of systems consolidation and in the

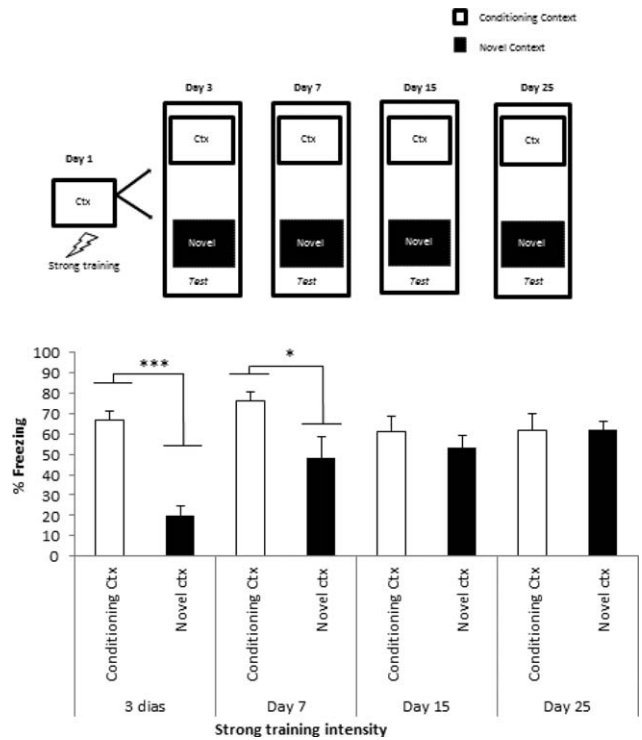


FIGURE 4. Strong training intensity accelerates memory generalization. Graphs show the mean \pm SEM of percentual freezing time. Experimental design is depicted at the top of each panel. No significant differences were found between animals tested in the conditioning or novel context in the memory precision test neither on day 25 nor on day 15. However, when the test was performed on day 3 or 7, animals tested in the conditioning context expressed higher freezing levels than animals tested in the novel context (test on day 3, conditioning context $n = 8$, novel context $n = 7$; test on day 15, conditioning context $n = 7$, novel context $n = 8$; test on day 25, conditioning context $n = 7$, novel context $n = 8$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

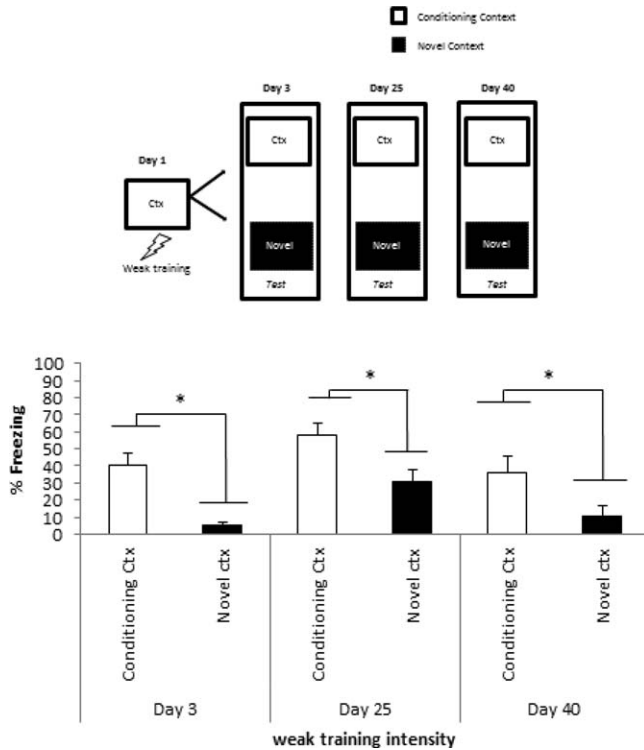


FIGURE 5. Weak training intensity maintains memory precision. Graphs show the mean \pm SEM of percentual freezing time. Experimental design is depicted at the top of each panel. Animals tested in the conditioning context expressed more freezing levels when compared to animals tested in a novel context on day 3, 25, or 40 (test on day 3, conditioning context $n = 14$, novel context $n = 14$; test on day 25, conditioning context $n = 10$, novel context $n = 10$; test on day 40, conditioning context $n = 6$, novel context $n = 7$). * $P < 0.05$.

time course of the gradual loss of the precise memory contextual representation. Our results indicate that the training intensity may modulate the progressive decay of hippocampus dependency. Moreover, we found that the emotionally stressful experience during the training interferes with memory generalization rate. The mechanisms underpinning such process are triggered by glucocorticoid and noradrenaline released during learning.

This study may shed new light on the debate of systems consolidation theories. The “standard consolidation model” posits a transient participation of the hippocampus on memory (Squire and Alvarez, 1995; Squire and Wixted, 2011). Its model predicts that the hippocampus links cortical sites containing the information content transiently. Memory retrieval becomes independent from the hippocampus with the passage of time, and the cortex may support memory by itself. The standard systems consolidation model predicts that memories will be qualitatively unchanged despite the transition from hippocampus-dependence to hippocampus-independence (Squire and Alvarez, 1995). An alternative view, however, is the multiple trace transformation model (Winocur et al., 2010), which predicts that recent memories mediated by the hip-

campus are fundamentally different from consolidated, hippocampus-independent memories (Winocur et al., 2007). According to this view, hippocampus dependent memories are contextually detailed, whereas memories mediated by extrahippocampal structures are schematic and less precise. Thus, the transition from hippocampus-dependence to hippocampus-independence is predicted to render memories more generic and less precise (Moscovitch et al., 2005; Winocur et al., 2007, but see Winocur and Moscovitch (2011) for a review of these systems consolidation models).

Our data support the Multiple Trace Theory (MTT) model, since we found a perfect match between the timeframe of the hippocampal dependency to retrieve memory and the capacity to distinguish between the context previously paired with the footshock and a novel one (Table 1). It suggests a close relationship between hippocampal dependency and the precise contextual representation. Although the debate about the role played by the hippocampus to retrieve a contextually detailed memory is still open, there is some evidence corroborating our data. For instance, Wiltgen et al., (2010) have shown that mice were very good discriminators between the conditioning context and a novel context one day after training, but not 28 days later. However, on day 14, about half of the rodents could discriminate between the contexts and the other half generalized. Interestingly, the “discriminators,” but not the “generalizers,” were affected by hippocampal inactivation, expressing lower freezing levels in the training context. This study demonstrated that the hippocampus plays an important role in retrieving precise memories, except generalized ones. de Oliveira Alvares et al. (2012) have shown that the periodical reactivation of memory keeps it precise and hippocampal dependent at a time point in which ordinarily it is generalized and hippocampal independent. These studies, as well as the present one, support the view that the hippocampus is required to retrieve a precise memory, regardless of the memory age, although there are conflicting reports in the literature (Wang et al., 2009).

Interestingly, we found a striking difference on hippocampus dependency in memory between animals that were tested in the conditioning context on day 3 (reactivated) and the non-reactivated animals (tested in the novel context; Figs. 1–3). In the strong protocol, animals that had previously been reactivated in the conditioning context kept memory hippocampus-dependent on days 15 and 25. This finding corroborates previous studies, showing that retrieval makes contextual fear memory remain in a hippocampus-dependent state and keeps its precision (de Oliveira Alvares et al., 2012). Further studies have shown that this reactivation effect is mediated by the reconsolidation process (Inda et al., 2011; de Oliveira Alvares et al., 2013). Likewise, human studies have shown that retrieval strengthens memory (Forcato et al., 2013) and produces significant positive effects on long-term retention, therefore, slowing forgetting (Karpicke and Roediger 2008; Roediger and Butler 2011).

Conversely, in the weak training protocol, the reactivated animals were not affected by muscimol on day 40. It is possible that an extinction process be initiated during the 4-min re-

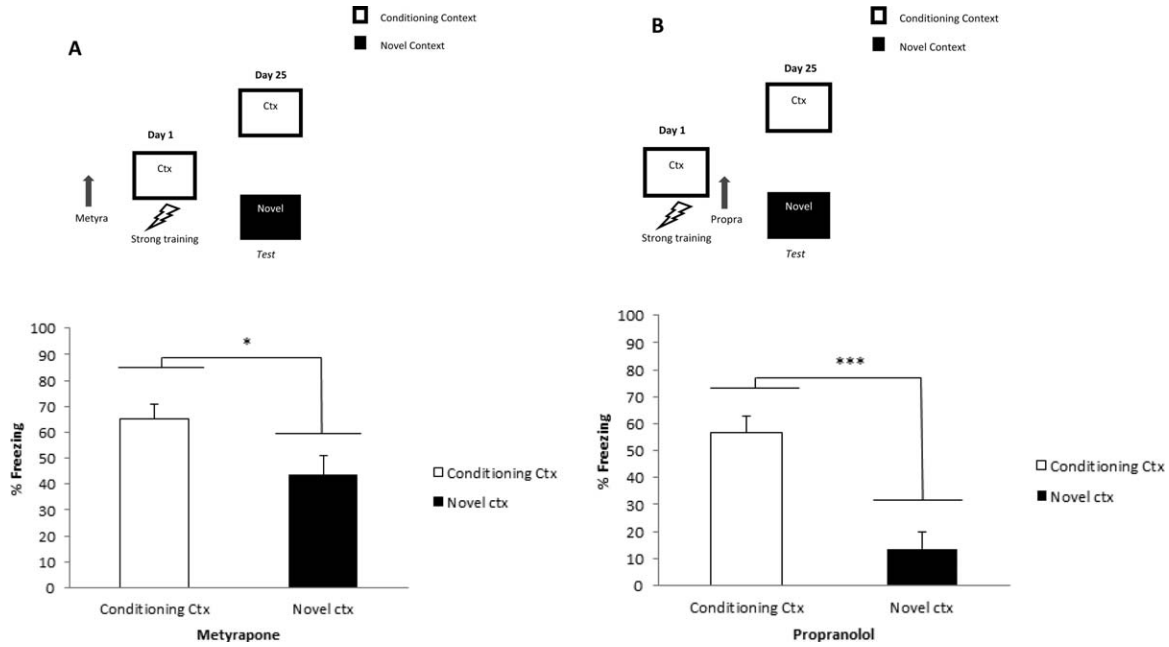


FIGURE 6. Glucocorticoids and noradrenaline levels during strong training intensity are associated to accelerate memory generalization phenomenon. Graphs show the mean ± SEM of percentual freezing time. Experimental design is depicted at the top of each panel. (A) Animals treated with metyrapone expressed higher

freezing levels in the conditioning context ($n = 9$) than in the novel context ($n = 10$) on day 25. (B) Animals treated with propranolol into the hippocampus immediately after training expressed higher freezing levels in the conditioning context ($n = 9$) than in the novel context ($n = 9$) on day 25. * $P < 0.05$.

exposure without the footshock on day 3, since animals in a drug-free retest expressed low freezing levels. Indeed, training intensity is a crucial factor to determine if a reactivation will undergo memory reconsolidation or extinction (Pedreira et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Bustos et al., 2009). Despite these data with the reactivated animals, our general conclusion was based on the nonreactivated animals. Since memory reactivation is a crucial factor in the dynamics of systems consolidation per se, the use of the nonreactivated groups makes the interpretation cleaner. This study may open new avenues to explore the relationship between training intensity and memory reactivation on systems consolidation and the maintenance of precise memory.

Threatening stimuli trigger a response that is critical for survival. This physiological response includes the release of stress hormones such as glucocorticoids and noradrenaline. Not only

do these hormones act in preparing the body to face the stressor stimulus, but they also act in enhancing the retention of the information surrounding this threatening event. It is thought that emotional situations provide salience to the experience and modulates memory consolidation positively (McGaugh, 2000). The memory consolidation enhancing effect of glucocorticoids and noradrenaline has extensively been shown (Cordero et al., 2002; Roozendaal et al., 2006; de Oliveira Alvares et al., 2010; Roozendaal and McGaugh, 2011). Remembering emotional experiences is crucial to guide our behavior so that it allows us to face similar situations in the future properly. However, very high stress may have negative impact on memory or even lead to psychopathologies such as PTSD. It has been reported that the effect of increasing the stress intensity or the glucocorticoid dosage improves the memory performance up to a maximum point, and then the

TABLE 1.

Relation between hippocampal-dependency and memory precision experiments

	Day 7		Day 15		Day 25		Day 40
Review of experimental findings	Strong Training		Strong Training		Strong Training	Weak Training	Weak Training
Hippocampal dependency	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓
Memory precision	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓

performance decreases, following an inverted U-shaped curve (Okuda et al., 2004; Sandi and Bisaz, 2007; Salehi et al., 2010). Our results show that the intrinsic moderate stress arisen during the weak training promoted a detailed representation of the context that lasts up to 40 days. Conversely, the high-training intensity promoted a memory that was generalized somewhere between 1 and 2 weeks after conditioning. This pattern seems to be extremely adaptive, since a moderate arousing-stressful situation promotes an optimal contextual representation of the experience. However, a highly stressful situation creates a more general and less precise memory, in which a few features of the context may be enough to be linked with the previously acquired fear memory. Hence, it makes it easier to induce a rapid identification of potential threats and express an adequate response, increasing the chance of survival.

Although the retention of information of stressful expedients is vital, some learning can produce dysfunctional psychopathologic memories. PTSD is a condition that occurs following exposure to an extreme traumatic experience. It has been suggested that an extremely stressful event undergone during the trauma may create a dysfunctional representation of this event, making these patients highly susceptible to re-experience the traumatic memory in response to unrelated or inappropriate predictors (Elzinga and Bremner, 2002; Layton and Krikorian, 2002). In fact, it has been shown that the infusion of glucocorticoids into the hippocampus after conditioning develops a PTSD-like memory, in which animals cannot identify the correct predictor of the threat, generalizing the fear response to elements that ordinarily would not trigger it (Kaouane et al., 2012). It corroborates our results, in which the high-training intensity forms a generic gist-like representation of the stressful context, making animals unable to restrict the fear response to the correct context.

We have demonstrated that the consolidation of such overgeneralized memory is induced by glucocorticoid and noradrenaline released during training, since this was prevented by the glucocorticoid synthesis inhibitor methyrapone or the intra-hippocampal β adrenergic antagonist propranolol. Previous findings have shown that glucocorticoid hormones interact with the noradrenergic systems (Roosendaal et al., 2003, 2004, 2006) and endocannabinoid systems (Campolongo et al., 2009; de Oliveira Alvares et al., 2010; Atsak et al., 2012) to modulate memory. We suggest that the glucocorticoid released during the stronger protocol acts synergically with the noradrenergic systems in the hippocampus during memory consolidation. Such interaction accelerates systems consolidation and makes its contextual representation less precise. Indeed, a very recent paper corroborates this hypothesis, showing that the increase of noradrenergic transmission induces the formation of overgeneralized memory through the activation of β adrenergic receptors (Gazarini et al., 2014).

In conclusion, we propose that the stress levels during learning act as a switch, guiding the fate of memory quality. Moderate stress will form a precise memory, whereas high stress during learning will develop a generic gist-like memory. This process is determined by the activation of the glucocorticoid

and noradrenergic systems, which will predict the rate of systems consolidation.

Acknowledgments

All authors state that they have no other source of compensation besides primary institution and federal funding. They also declare no biomedical financial interests or potential conflicts of interest relevant to the subject matter of this article. The authors acknowledge Zelma Regina V. de Almeida for her kind technical assistance.

REFERENCES

- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. 1999. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: Within-subjects examination. *J Neurosci* 19:1106–1114.
- Atsak P, Hauer D, Campolongo P, Schelling G, McGaugh JL, Roozendaal B. 2012. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:3504–3509.
- Bayley PJ, Squire LR. 2005. Failure to acquire new semantic knowledge in patients with large medial temporal lobe lesions. *Hippocampus* 15:273–280.
- Bayley PJ, Hopkins RO, Squire LR. 2006. The fate of old memories after medial temporal lobe damage. *J Neurosci* 26:13311–13317.
- Biedenkapp JC, Rudy JW. 2007. Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: Implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. *Learn Mem* 14:200–203.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Compar Physiol Psychol* 68:129–113.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: Decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34:446–457.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V. 2009. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4888–4893.
- Cordero MI, Merino JJ, Sandi C. 1998. Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 112:885–891.
- Cordero MI, Krut ND, Merino JJ, Sandi C. 2002. Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. *Stress* 5:73–79.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. 1999. Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422–426.
- de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV. 2005. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev* 29:271–281.
- de Oliveira Alvares L, Engelke DS, Diehl F, Scheffer-Teixeira R, Haubrich J, de Freitas CL, Molina VA, Quillfeldt JA. 2010. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learn Mem* 17:202–209.
- de Oliveira Alvares L, Einarsson EO, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092–1095.

- de Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244:42–48.
- de Quervain DJ, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B. 2009. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30:358–370.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51–86.
- Elzinga BM, Bremner JD. 2002. Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? *J Affect Disord* 70:1–17.
- Finstlerwald C, Alberini CM. 2014. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol Learn Mem* 112:17–29.
- Forcato C, Fernandez RS, Pedreira ME. 2013. The role and dynamic of strengthening in the reconsolidation process in a human declarative memory: What decides the fate of recent and older memories? *PLoS One* 8:e61688
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Gazarini L, Stern CA, Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2013. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting alpha1- and beta-adrenergic receptors. *Learn Mem* 20:210–219.
- Gazarini L, Stern CA, Piornedo RR, Takahashi RN, Bertoglio LJ. 2014. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol* 18:1–9.
- Guzman-Ramos K, Osorio-Gomez D, Moreno-Castilla P, Bermudez-Rattoni F. 2012. Post-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-aversion memory consolidation. *Learn Mem* 19:231–238.
- Inda MC, Muravieva EV, Alberini CM. 2011. Memory retrieval and the passage of time: From reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* 31:1635–1643.
- Kaouane N, Porte Y, Vallee M, Brayda-Bruno L, Mons N, Calandreau L, Marighetto A, Piazza PV, Desmedt A. 2012. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science* 335:1510–1513.
- Karpicke JD, Roediger HL. 2008. The critical importance of retrieval for learning. *Science* 319:966–968.
- Layton B, Krikorian R. 2002. Memory mechanisms in posttraumatic stress disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:254–261.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65:209–237.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. 2004. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96–99.
- McGaugh JL. 2000. Memory—A century of consolidation. *Science* 287:248–251.
- McReynolds JR, Donowho K, Abdi A, McGaugh JL, Roozendaal B, McIntyre CK. 2010. Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiol Learn Mem* 93:312–321.
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L. 2005. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: A unified account based on multiple trace theory. *J Anat* 207:35–66.
- Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. 2004. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:853–858.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H. 2004. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 11:579–585.
- Roediger HL, Butler III. AC. 2011. The critical role of retrieval practice in long-term retention. *Trends Cogn Sci* 15:20–27.
- Roozendaal B, McGaugh JL. 2011. Memory modulation. *Behav Neurosci* 125:797–824.
- Roozendaal B, Bohus B, McGaugh JL. 1996. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology* 21:681–693.
- Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL. 1999. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11642–11647.
- Roozendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL. 2003. The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: Dependence on the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1328–1333.
- Roozendaal B, de Quervain DJ, Schelling G, McGaugh JL. 2004. A systemically administered beta-adrenoceptor antagonist blocks corticosterone-induced impairment of contextual memory retrieval in rats. *Neurobiol Learn Mem* 81:150–154.
- Roozendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL. 2004. Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J Neurosci* 24:8161–8169.
- Roozendaal B, Okuda S, de Quervain DJ, McGaugh JL. 2006. Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 138:901–910.
- Salehi B, Cordero MI, Sandi C. 2010. Learning under stress: The inverted-U-shape function revisited. *Learn Mem* 17:522–530.
- Sandi C, Bisaz R. 2007. A model for the involvement of neural cell adhesion molecules in stress-related mood disorders. *Neuroendocrinology* 85:158–176.
- Sandi C, Pinelo-Nava MT. 2007. Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast* 2007:78970.
- Squire LR, Alvarez P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: A neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169–177.
- Squire LR, Wixted JT. 2011. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* 34:259–288.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787–4795.
- Wang SH, Teixeira CM, Wheeler AL, Frankland PW. 2009. The precision of remote context memories does not require the hippocampus. *Nat Neurosci* 12:253–255.
- Wiltgen BJ, Silva AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14:313–317.
- Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ. 2010. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol* 20:1336–1344.
- Winocur G. 1990. Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behav Brain Res* 38:145–154.
- Winocur G, Moscovitch M. 2011. Memory transformation and systems consolidation. *J Int Neuropsychol Soc* 17:766–780.
- Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M. 2007. Memory consolidation or transformation: Context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci* 10:555–557.
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B. 2010. Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339–2356.

4.0. ARTIGO 2 (Anexo)

O referido manuscrito, intitulado **“Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: implications for consolidation of multiple memory traces ”**, submetido na revista **“Hippocampus”** dia 12 de junho de 2016 atualmente se encontra em processo de revisão. Aqui será mostrado o manuscrito editado com a formatação exigida pela revista.



Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: implications for consolidation of multiple memory traces

Journal:	<i>Hippocampus</i>
Manuscript ID	HIPO-16-111
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Keywords:	Systems Consolidation, Sequential Learning, Hippocampus, Anterior Cingulate cortex, Memory Precision.

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

1
2
3 **Title:** Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems
4
5 consolidation: implications for consolidation of multiple memory traces
6
7
8
9

10
11 **Abbreviated title:** Sequential Learning and Systems Consolidation
12
13
14
15
16

17 **Author names:** Lizeth K. Pedraza^{1,3*}, Rodrigo O. Sierra^{2,3*}, Ana P. Crestani^{2,3}, Jorge A.
18
19 Quillfeldt^{2,3} and Lucas de Oliveira Alvares^{1,3}
20
21
22
23
24
25

26 **Author affiliations:** ¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, ²Laboratório de Psicobiologia e
27
28 Neurocomputação, Biophysics Department, Biosciences Institute, 91.501-970, and ³Graduate
29
30 Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, 90.046-900, Universidade Federal do Rio
31
32 Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
33
34
35
36
37

38 *These authors have contributed equally to this work
39
40
41
42
43
44

45 **Corresponding author:** Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Neurobiologia da Memória,
46
47 Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
48
49 (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 216, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio
50
51 Grande do Sul, Brasil. E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Keywords:** Systems Consolidation, Sequential Learning, Hippocampus, Anterior Cingulate cortex,
4 Memory Precision.
5
6
7

8
9
10 **Number of pages:** 37
11

12 **Number of words:** (Abstract) 154, (Introduction) 745 and (Discussion) 1330
13
14

15 **Figures:** 3
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Abstract

Systems consolidation is a time-dependent reorganization process involving the neocortical and hippocampal networks underlying memory storage and retrieval. Previous studies of our lab were able to demonstrate that systems consolidation is a dynamic process rather than a merely time-dependent passive process. Here, we studied the influence of sequential learning in contextual fear conditioning (CFC) with different training intensities in the time-course of hippocampal dependency and contextual specificity. We found that sequential learning with high-intensity shocks during CFC induces generalization of the first learning (context A) and maintains contextual specificity of the second learning (context B) fifteen days after acquisition. This phenomenon was prevented by periodical memory reactivation, which seems to be mediated by reconsolidation. Moreover, subsequent experiences reorganizes brain structures involved in retrieval, accelerating the involvement of cortical structures and diminishing the hippocampal participation. We propose that systems consolidation could be considered a potential biological mechanism to reduce possible interferences between similar memory traces.

Introduction

Most of our current knowledge related to memory consolidation relies on studies from protocols using one single learning. However, in real-life situations, memory is built over previous experiences. Indeed, several studies have shown that a prior experience may affect a subsequent learning (McKenzie & Eichenbaum, 2011; Tsé et al 2007; Bannerman et al., 1995; Sanders & Fanselow, 2003; Tayler et al., 2011; Wiltgen et al., 2010; 2011).

Systems consolidation refers to a gradual stabilization process that occur after initial memory acquisition (Dash et al., 2004). Classically, systems consolidation has been considered a time-dependent memory reorganization in which the hippocampus is initially required for retrieval, but is no longer involved in the expression of remote memories (Markowitsch et al., 1993, Teng and Squire, 1999).

Evidence from animal models has shown that recent spatial memories induce a higher hippocampal activation than remote memories (Frankland et al., 2004). However, several areas of medial prefrontal cortex, including the anterior cingulate cortex (ACC), are more activated during retrieval of remote memories (Bontempi et al., 1999). In addition, ACC inhibition disrupts memory retrieval during remote memory tests in contextual fear conditioning (Frankland et al., 2004), Morris water maze (Teixeira et al., 2006), conditioning taste aversion (Ding et al., 2008) and step-through inhibitory avoidance (Liu et al., 2009).

1
2
3 Systems consolidation has been studied by testing memory at different time points after
4 acquisition (Beeman et al., 2013). Compared to real life situations, in which memories are
5 built based on multiple previous experiences, the one task approach could be insufficient to
6 characterize the mnemonic process occurring during systems consolidation of multiple
7 memory traces.
8
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18 Some reports indicate that, 30 days after encoding, the ACC becomes critical for retrieval
19 of remote memories with less involvement of the hippocampus (Bontempi et al., 1999;
20 Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Restivo et al., 2009). Recently we showed that
21 the encoding of new information generates a tight interplay between distinct memories,
22 accelerating the reorganization of previously stored long-term memories between the
23 hippocampal and cortical areas (Haubrich et al., 2016). Moreover, training intensity during
24 contextual fear conditioning (CFC) modulates the progressive decay of hippocampal
25 dependency and contextual specificity (Pedraza et al., 2016), suggesting that the rate of
26 systems consolidation is directly associated with previous experiences and learning
27 conditions rather than with merely passive time-dependent processes.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 The mechanisms underpinning the interaction of multiple learning tasks remain unclear.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Wartman et al., (2013) showed that animals trained on two different hippocampal-
dependent memory tasks express an early pattern of c-fos expression in the ACC during
both recent and remote memory tests, suggesting that training on sequential hippocampal-
dependent tasks accelerates the involvement of cortical structures during memory retrieval.
Interestingly, this phenomenon was not verified with two sequential learnings if only one of
them was dependent on the hippocampus. (Wartman et al., 2013). Posterior evidence

1
2
3 revealed that animals trained on two hippocampal-dependent tasks expressed retrieval
4 impairment during both recent and remote tests under muscimol effect into the ACC,
5 supporting the hypothesis of accelerated recruitment of the ACC during memory retrieval
6 (Wartman et al., 2014). These results are consistent with our recent finding that training in
7 two additional memory tasks (water maze and object recognition) rendered the CFC
8 memory independent from the hippocampus at a recent time-point compared to one-task
9 training (Haubrich et al., 2016).
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 It has been shown that recently after training, rodents maintain a precise memory (here
23 defined as the capacity to discriminate between the original training context and a novel
24 one), whereas at 2-4 weeks after training animals show equally robust conditioned
25 responding to both contexts (De Oliveira Alvares et al 2012; Wiltgen and Silva 2007;
26 Winocur et al. 2007). The increase in generalized freezing to a novel context coincides with
27 less dependency on the hippocampus for memory expression, suggesting that the
28 hippocampus plays an essential role in expressing precise contextual fear memory (De
29 Oliveira Alvares et al 2012; Pedraza et al 2016).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Since (i) additional tasks accelerate the cortical-dependency of CFC and (ii) training
44 intensity modifies the rate of systems consolidation, the objective of the present study was
45 to investigate hippocampal dependency and contextual specificity during sequential CFC
46 learning with different training intensities. We found that, fifteen days after acquisition, two
47 sequential learning with high training intensity accelerate the decay of hippocampal
48 dependency and promote memory generalization of the first learning (context A); however,
49 the second learning (context B) was maintained both hippocampal-dependent and precise.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Moreover, periodical reactivation of the first learning (context A) restores contextual
4
5 specificity in a reconsolidation-dependent process.
6
7
8
9

10 11 12 13 **Materials and Methods** 14 15

16
17
18
19 Subjects. Male adult Wistar rats (270-320 g) from our breeding colony were used. Animals
20
21 were housed in plastic cages, four to five per cage, under a 12 h light/dark cycle, with
22
23 experiments conducted during the light cycle and at a constant temperature of 24° C, with
24
25 water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance to local and
26
27 national (Federal Law no 11.794/ 2008) guidelines for animal care and the project was
28
29 approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee.
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Stereotaxic surgery and cannulae placement. Rats were deeply anesthetized by an i.p.
39
40 injection of ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively) and bilaterally implanted in
41
42 the brain targeting the dorsal hippocampus or the anterior cingulate cortex with 27-gauge
43
44 guide cannulae. Coordinates for HPC cannulation were anteroposterior (AP) -4.0 mm
45
46 (from bregma), laterolateral (LL) \pm 3.0 mm, dorsoventral (DV) - 1.6 mm, positioned just 1.0
47
48 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (Paxinos and Watson, 2007).
49
50 Coordinates for the Anterior Cingulate Cortex cannulation were AP +2.7 mm (from
51
52 bregma), LL +0.5 mm, DV -1.5 mm.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 After a 1-week recovery from surgery, animals underwent behavioral procedures.
4
5 Following the behavioral experiments, subjects were euthanized and their brains dissected
6
7 and preserved in 10% formaldehyde to verify for cannula position. Only animals with
8
9 correct cannulae placements were included in the statistical analysis.
10
11
12
13
14
15
16

17 Drugs

18
19
20 Muscimol (Sigma-Aldrich), a GABA_A receptor agonist was dissolved in phosphate-
21
22 buffered saline (PBS) at 1µg/µl and infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus
23
24 or into the anterior cingulate cortex in a volume of 0.5µl / hemisphere.
25
26

27
28 Nimodipine (Sigma-Aldrich), an antagonist of the L-type voltage-gated calcium channels
29
30 (LVGCCs) was dissolved in sterile isotonic saline solution with 8% dimethyl sulfoxide to a
31
32 concentration of 16mg/mL. Nimodipine was injected systemically (subcutaneously - s.c.)
33
34 30 min before the second training in context B in a volume of 1mL/kg.
35
36
37
38
39
40

41
42 Intrahippocampal or intra-Anterior Cingulate Cortex infusion. At the time of infusion, a
43
44 30-gauge infusion needle was fit into guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm
45
46 beyond the guide cannula end and aimed at the pyramidal cell layer of CA1 of the dorsal
47
48 hippocampus or the Anterior Cingulate Cortex. A volume of 0.5 µl was bilaterally infused
49
50 at a slow rate (20 µL/h) and the needle was removed only after waiting another additional
51
52 30 sec.
53
54
55
56
57
58
59
60

Context Apparatus

Two different contexts (context A and B) were used for contextual fear conditioning, one for each phase of conditioning. To maximize the distinction between the two contexts, different visual, auditory, olfactory, and textural cues were used. A third context (context C) was introduced during the test sessions to evaluate fear memory discrimination between contexts.

Context A: The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (20x25x22cm with a grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart) and fan background noise (white noise).

Context B: A rectangular box 2/3 the size of the context A, the grid floor was the same to that used in context A, vanilla scent, one circular wall was added, painted with black-and-white vertical stripes, without fan background noise and the chamber was located in a different room.

Context C (novel context): A rectangular box with dimensions similar to context A, smooth floor, almond scent; the lighting level was lower and without fan background noise.

Behavioral procedure.

Training Context A. Rats were placed in context A for 3 min for context habituation followed by two possible footshock protocols depending on the experiment performed: (4 footshocks, 0,8mA/1s) or (4-footshocks, 0.3mA/1s) separated by a 30-s interval; they were kept in the conditioning environment for an additional 30-s before they were returned to

1
2
3 their homecages.
4
5
6
7
8

9
10 Training Context B. Forty-eight hours after training in context A, animals were placed into
11 context B for 3 min of context habituation followed by two possible footshock protocols
12 depending on the experiment performed: (4 footshocks, 0,8mA/1s) or (4 footshocks,
13 0.3mA/1s) separated by a 30-s interval; they were kept in the conditioning environment for
14 an additional 30-s before they were returned to their homecages.
15
16
17
18
19

20
21
22 Periodical memory reactivation. Rats were placed in context A for 4 min without
23 unconditioned stimulus on days 6, 9, and 12 after training in context A.
24
25
26
27
28
29
30

31 Test Session: Animals were randomly assigned to two different groups: fifteen days after
32 training, one half of subjects were tested for 4 min in context A while the other half were
33 tested in context B. Depending on the experiment intrahippocampal or intra-anterior
34 cingulate cortex infusion of muscimol was performed 15min before test session.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Retest Session: In experiments evaluating HPC or ACC dependency, animals were retested
46 for 4 min in either conditioning context A or B 4h after test session in a drug-free condition.
47
48
49
50
51
52

53 Test session in context C. In the experiment evaluating fear memory discrimination, 24
54 hours after test session in context A or B, rats were placed in context C (novel context) for
55
56
57
58
59
60

1
2
3 4 minutes and freezing behavior was measured.
4
5

6 Behavior Measurement. In all experiments, freezing behavior was registered in real-time by
7
8 an experienced observer that was unaware of the treatments, and used as a memory index.
9
10 Freezing behavior was defined as total immobilization except for movements required for
11
12 respiration (Blanchard and Blanchard, 1969).
13
14

15
16 Statistical analysis. Since data from all experimental groups was shown to be both
17
18 homoscedastic and normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors'
19
20 correction, $P > 0.05$). Results were analyzed by Repeated Measures ANOVA followed by a
21
22 Tukey HSD post hoc test for within and between groups comparisons. Significance level
23
24 was set at $P < 0.05$.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 **Results**

38 39 40 **Sequential learning with high training intensity promotes memory generalization of** 41 42 **the first learning (context A)** 43 44 45

46
47 We first assessed contextual specificity of two sequential learning tasks with equal or
48
49 different training intensities. Rats were trained in four different protocols: (i) first and
50
51 second learning (context B) with a high training intensity (Fig 1a), (ii) first and second
52
53 learning (context B) with weak learning intensities (Fig 1b), (iii) first learning (context A)
54
55 with a high training intensity and second learning (context B) with a weak learning
56
57
58
59
60

1
2
3 intensity (Fig 1c), and (iv) first learning (context A) with a high training intensity and
4 second learning (context B) with only context exposure without footshock (Fig 1d).
5
6
7
8 Animals were tested 15 days after the first training in the original context (A or B) and, in
9
10 the next day, in a novel context (C) in order to evaluate memory precision.
11
12
13
14

15 In the condition of first (context A) and second learning (context B) with high training
16
17 intensity, Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of time factor ($F_{1,12} = 10.289$, p
18 $= 0.007$) and time x group interaction ($F_{1,12} = 6,958$, $p = 0.021$), but not for group factor ($F_{1,12} =$
19 0.475 , $p = 0.503$). Tukey HSD post-hoc analysis showed that animals tested in context B express
20
21 higher freezing levels than in context C ($p < 0.02$). However, animals tested in context A express
22
23 similar freezing levels in a novel context C ($p > 0.05$) (Fig 1a).
24
25
26
27
28
29
30

31 When first and second learning (context B) were performed with the same weak learning
32
33 intensities, Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of time factor ($F_{1,16} = 80.973$,
34 < 0.001) but not for group ($F_{1,16} = 0,056$, $p = 0.814$), and time x group interaction ($F_{1,16} = 0.945$, p
35 $= 0.345$). Tukey HSD post-hoc analysis showed that animals tested in contexts A and B express
36
37 higher freezing levels than in context C ($p < 0.001$) (Fig 1b).
38
39
40
41
42
43

44 Next, we evaluated contextual specificity after sequential learning with different training intensities.
45
46 In the condition of first learning (context A) with a high training intensity and second
47
48 learning (context B) with a weak learning intensity, Repeated Measures ANOVA revealed
49
50 significant effects of time factor ($F_{1,13} = 59.996$, $p = < 0.001$) but not for group ($F_{1,13} = 0,597$, $p =$
51 0.455), and time x group interaction ($F_{1,13} = 0.988$, $p = 0.338$). Tukey HSD post-hoc analysis
52
53 showed that animals tested in contexts A and B express higher freezing levels than in a novel
54
55 context C ($p < 0.01$)(Fig 1c). Similar results were verified when first learning (context A) was
56
57
58
59
60

1
2
3 performed with a weak learning intensity and second learning (context B) with a high
4
5 training intensity (data not shown).
6
7

8
9
10 Finally, rats underwent high-intensity training but only exposed to context without
11 footshock during the second learning (context B). Repeated Measures ANOVA revealed
12 significant effects of time factor ($F_{1,13} = 56.646, p = < 0.001$) but not for group ($F_{1,13} =$
13 $1,305, p = 0.273$), and time x group interaction ($F_{1,13} = 1.952, p = 0.185$). Tukey HSD post-
14 hoc analysis showed that animals tested in contexts A and B express higher freezing levels
15 than in context C ($p < 0.01$) (Fig 1d).
16
17

18
19
20 This first set of experiments allows us to verify that only in the condition of first and second
21 learning (context B) with equally high training intensity, the first learning (context A) expresses
22 memory generalization 15 days after training, while second learning (context B) maintains memory
23 precision. These results suggest that training conditions of sequential learning could modify
24 memory quality depending on memory strength.
25
26
27
28
29
30
31
32

33 34 35 **Sequential learning accelerates the involvement of anterior cingulate cortex for** 36 **retrieval** 37

38
39
40
41
42 In a previous report, we showed a close relationship between hippocampal dependency and
43 precise contextual representation (de Oliveira Alvares et al., 2012; Pedraza et al., 2016). Since we
44 verified the generalization and precision of the first and second learning (context B), respectively,
45 we hypothesize that this phenomenon could be associated with hippocampal dependency during
46 retrieval. Animals were trained in two sequential learning with high training intensities as described
47 above. Fifteen days after the training sessions, animals were infused with muscimol into CA1
48 region of dorsal hippocampus 15min before testing in the original context (A or B). Four hours
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 later, they were retested in a drug-free condition as a within subject control. Repeated Measures
4 ANOVA revealed significant effects of time factor ($F_{1,15} = 19.462, p = < 0.001$) but not for group
5 ($F_{1,15} = 0.752, p = 0.399$), and time x group interaction ($F_{1,15} = 2.241, p = 0.155$). Tukey HSD post-
6 hoc analysis showed that animals tested in context B under muscimol effects express lower freezing
7 levels when compared to retest in a drug free condition ($p < 0.01$). However, animals tested in
8 context A are not sensitive to muscimol administration ($p > 0.05$). This result suggests that only
9 precise memories are sensitive to the disruption effect of hippocampal inactivation.
10
11

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21 If the first learning (context A) expressed memory generalization and was not affected by
22 pharmacological hippocampal inactivation, could any cortical structure be responsible for the
23 retrieval of this memory trace? In order to address this question, animals were tested as described
24 above (Fig 2a) fifteen days after the first training, however, 15min before being tested in the
25 original context (A or B), we infused muscimol into the anterior cingulate cortex and retested four
26 hours later in a drug-free condition. Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of
27 time factor ($F_{1,17} = 21.604, p = < 0.001$) but not for group ($F_{1,17} = 0.270, p = 0.609$), and time x
28 group interaction ($F_{1,17} = 0.299, p = 0.591$). Tukey HSD post-hoc analysis showed that animals
29 tested in context A under muscimol effect express lower freezing levels compared to retest in a
30 drug-free condition ($p < 0.01$). However, animals tested in context B are not sensitive to intra-ACC
31 muscimol infusion ($p > 0.05$). Since precise memories are hippocampus-dependent (second
32 learning - context B; Fig 1a and 2a), and generalized memories relies on ACC (first learning -
33 context A; Fig 1b and 2b), we confirm our previous assumption that memory quality can be
34 predicted by hippocampal dependency (Pedraza et al., 2016).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53 In order to verify the time-point when both memories share hippocampal or cortical dependency,
54 animals were tested seven or twenty-five days after the first training under muscimol effect into the
55 dorsal hippocampus or anterior cingulate cortex, respectively. Seven days after the first training,
56
57
58
59
60

1
2
3 animals were infused with muscimol into the dorsal hippocampus and tested in the original context
4
5 (A or B). Four hours later, animals were retested in a drug-free condition. Repeated Measures
6
7 ANOVA revealed significant effects of group ($F_{1,26} = 5.111, p = 0.032$) and time factor ($F_{1,26} =$
8
9 $28,463, p = < 0.001$) but not for group x time interaction ($F_{1,26} = 0.054, p = 0.817$). Tukey HSD
10
11 post-hoc analysis showed that both groups express lower freezing levels in the original context
12
13 under effect of muscimol when compared to retest in a drug-free condition ($p < 0.01$). These results
14
15 showed that seven days after first training both memories are hippocampal-dependent.
16
17

18
19
20 Twenty-five days after first training, animals were infused with muscimol into the anterior cingulate
21
22 cortex and tested in the original context (A or B). Four hours later, animals were retested in a drug-
23
24 free condition. Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of time factor ($F_{1,13} =$
25
26 $29.328, p = < 0.001$) but not for group ($F_{1,13} = 0,786, p = 0.381$) and group x time interaction ($F_{1,13}$
27
28 $= 0.152, p = 0.702$). Tukey HSD post-hoc analysis showed that both groups express lower freezing
29
30 levels in the original context under effect of muscimol compared to retest in a drug-free condition (p
31
32 < 0.05). Our result suggests that twenty-five days after first training, both memories were
33
34 consolidated.
35
36

37
38
39 Taken together, our results suggest that sequential learning with high training intensities accelerates
40
41 the involvement of cortical structures during retrieval 15 days after training, selectively, of the first
42
43 learning (context A). However, 25 days later, first and second learning (context B) are
44
45 hippocampal-independent, showing an increase in the rate of systems consolidation of both memory
46
47 traces.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Periodical reactivation prevents memory generalization of the first learning (context**
4
5 **A)**
6
7

8
9
10 Previous experiments in our Lab have shown that periodical reactivation of memory keeps
11 it precise and hippocampal dependent at a time point in which it is ordinarily generalized
12 and hippocampal-independent (de Oliveira Alvares et al., 2012). Could the periodical
13 reactivation of the first learning (context A) prevent the memory generalization
14 phenomenon verified during our two sequential high intensity protocols? Animals from the
15 high intensity protocol were reactivated on day 6, 9 and 12 during 4min with the exposure
16 to conditioning context A without the unconditioned stimulus. Fifteen days after the first
17 training, animals were tested in the original context (A or B) and the next day in a novel
18 context (C) in order to evaluate memory precision. Repeated Measures ANOVA revealed
19 significant effects of time factor ($F_{1,27} = 38.563, p = < 0.001$) and group x time interaction
20 ($F_{1,27} = 4,894, p = 0.035$) but not group factor ($F_{1,27} = 0.002, p = 0.987$). Tukey HSD post-
21 hoc analysis showed that both groups, tested in contexts A and B, express higher freezing
22 levels in the original context than in a novel context C ($p < 0.05$). Our results suggest that
23 repeated reactivation of the first learning (context A) keeps memory precision, preventing
24 the effects of sequential learning verified in our earlier experiments.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 Previous studies suggest that the reactivation of a memory trace can strengthen the
49 representation of that memory in the hippocampus, possibly through reconsolidation
50 (Winocur et al., 2010; de Oliveira Alvares et al., 2013). Administration of nimodipine, an
51 antagonist of the L-type voltage-gated calcium channels (LVGCCs), before memory
52 reactivation has been shown to be a pharmacological tool that prevents memory
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 destabilization and consequently, reconsolidation (Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011;
4
5 Sierra et al., 2013; Haubrich et al., 2015; Crestani et al., 2015). If periodical memory
6
7 reactivation promotes contextual specificity of the first learning (context A), this
8
9 phenomenon could be mediated via a reconsolidation mechanism. In order to address this
10
11 question, animals from the high intensity protocol were reactivated on day 6, 9 and 12
12
13 during 4 min with the exposure to conditioning context A without the unconditioned
14
15 stimulus. Thirty minutes before each memory reactivation, animals were administered with
16
17 nimodipine (S.C). Fifteen days after the first training, animals were tested in the original
18
19 context (A or B) and the next day in a novel context (C) in order to evaluate memory
20
21 precision. Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of group ($F_{1,18} = 4.475$,
22
23 $p = 0.048$), time ($F_{1,18} = 16,884$, $p = < 0.001$) and group x time interaction ($F_{1,18} = 7.730$, p
24
25 $= 0.012$). Tukey HSD post-hoc analysis showed that only animals tested in context B
26
27 express higher freezing levels than in a novel context C ($p < 0.001$). However, animals
28
29 tested in context A express similar freezing levels in a novel context C ($p > 0.05$) (Fig 3b).
30
31 The reactivation effect promoting contextual specificity was disrupted by the inhibition of
32
33 the destabilization process necessary for reconsolidation.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Additional to the pivotal role of L-type Ca^{2+} channels in the destabilization/reconsolidation
44
45 process, it has been shown that these channels are involved in synaptic plasticity taking
46
47 place during the acquisition of fear memories (Cain et al., 2002; Woodside et al., 2004;
48
49 Lashgari et al., 2006). In a previous report, Wang et al. (2012) showed that L-type Ca^{2+}
50
51 channels in dorsal hippocampus are necessary for the first, but not the second learning
52
53 (context B) of contextual fear conditioning. In order to evaluate L-type Ca^{2+} channel
54
55 dependency during high training intensity in sequential learning, animals were systemically
56
57
58
59
60

1
2
3 administrated with nimodipine 30 min before the second contextual fear conditioning.
4
5 Fifteen days after the first training, animals were tested in the original context (A or B) and the
6
7 next day in a novel context (C) in order to evaluate memory precision.
8
9

10
11
12 Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of group x time interaction ($F_{1,13} = 8.098$,
13
14 $p = 0.013$) but not for group ($F_{1,13} = 0.380$, $p = 0.447$), and time factor ($F_{1,13} = 4.366$, $p = 0.056$).
16
17 Tukey post-hoc analysis showed that animals tested in context A express higher freezing levels
18
19 than in a novel context C ($p < 0.01$). Moreover, animals tested in context B express higher freezing
20
21 levels than in a novel context C ($p < 0.001$) (Fig 1c). Tukey HSD post-hoc analysis showed that
22
23 animals tested in context B express higher freezing levels than in context C ($p < 0.05$). However,
24
25 animals tested in context A express similar freezing levels in a novel context C ($p > 0.05$) (Fig 3c).
26
27 these results replicated our previous findings (Fig. 1.a) however, as reported by Wang et al (2012),
28
29 the blockade of L-type Ca^{2+} channels are not necessary for the second learning (context B)
30
31 and the effect of memory generalization of the first learning (context A) was not prevented
32
33 by this treatment.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

Here we extend our previous findings on the role of sequential learning and training intensity on the temporal dynamics of systems consolidation. Our results show that sequential learning using two similar contextual fear conditioning with a high training intensity protocol induce memory generalization of the first learning (context A) 15 days after acquisition (Fig 1a). However, this effect was not detected in some conditions: two weak training protocols (Fig 1b), sequential learning with different training intensities (Fig 1c) or in the absence of a second learning (context B) (Fig 1d). As we previously reported, a close relationship was verified between contextual specificity and hippocampal dependency since the first (generalized) learning was ACC-dependent and the second (precise) learning hippocampal-dependent 15 days after training (Fig 2a and 2b). Nevertheless, there are important and limited timeframe matches in which both memories are hippocampal-dependent (7 days after training; Fig 2c) or ACC-dependent (25 days after training; Fig 2d) showing that the rate of systems consolidation was accelerated for the first and second learning (context B) in contrast to predictions based on one-task approaches (Haubrich et. al., 2016). Finally, periodical memory reactivation of the first learning (context A) (generalized in our protocol) promotes contextual specificity (Fig 3a). This effect was prevented by nimodipine administration before reactivation, suggesting that this process is mediated by reconsolidation (Fig 3b). As expected, the antagonism of L-type voltage-gated calcium channels before the second learning (context B) was ineffective to prevent memory generalization expressed by the first learning (context A) (Fig 3c). Taken together, our results indicate that sequential learning accelerates hippocampal independency

1
2
3 and memory generalization in a training-intensity dependent form, showing the influence of
4 new aversive experiences in the time-course reorganization of previously established
5 memories.
6
7
8
9

10
11
12 Several human studies support the time-limited involvement of hippocampus for storage
13 and memory retrieval (Scoville and Milner, 1957; Teng and Squire, 1999; Rosenbaum et al,
14 2000). Cortical networks have been proposed as being the final repository for successfully
15 consolidated memories, since hippocampal damage results in a temporally retrograde
16 amnesia with relatively high preservation of old memories (Markowitsch et al., 1993; Teng
17 and Squire, 1999). However, the mechanism underpinning this memory reorganization is
18 not fully understood. Animal models based on a single task could be insufficient to explain
19 systems consolidation in real life situations since multiple memory traces can compete
20 during retrieval based on similarities between experiences e.g., by pattern separation and
21 completion (Neunuebel and Knierim., 2014; Johnston et al., 2015; Kyle et al., 2015). Our
22 results showed that memory generalization during sequential learning depends on training
23 intensity rather than on similarities between tasks (Figure 1). The difference between first
24 and second learning (context B) on contextual specificity after sequential learning with high
25 intensity shocks revealed a selective increase in the rate of systems consolidation for the
26 first memory, suggesting that a second, equally aversive experience, promotes trace
27 reorganization of this previously consolidated memory. Our result with intrahippocampal
28 infusion of muscimol supports this interpretation since only the retrieval of the second
29 learning (context B) was affected by the treatment 15 days after training (Fig 2a) and in
30 concordance, retrieval of the first learning (context A) was disrupted only by muscimol
31 infusion into ACC 25 days after training (Fig 2b).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Our results may be deeply influenced by potential interferences between memory traces.
7
8 Hardt et al., (2013) propose that levels of interference in the hippocampus influence a time-
9
10 dependent generalization of memory. Progressive decay of hippocampal representations
11
12 induce memory generalization and overlapping of cortical dependent memories. On the
13
14 other hand, computational models and empirical evidence suggest a hippocampal
15
16 “clearance” phenomenon, mediated by hippocampal neurogenesis, promoting the
17
18 weakening of consolidated memories (Akers et al., 2014; Aimone et al., 2009; Frankland et
19
20 al., 2016), minimizing proactive interferences (Frankland et al., 2013). Nevertheless, there
21
22 is contradictory evidence showing that the blockade of adult hippocampal neurogenesis
23
24 induces fear memory generalization (Sahay et al., 2011; Niibori et al., 2012; Wu and Hen,
25
26 2014). Despite the fact that our protocol is not being sensitive to the evaluation of
27
28 interference between first and second learning (context B), our conclusions are based on the
29
30 accelerating rate of systems consolidation only detected with two strong trainings,
31
32 suggesting that the emotional value of similar experiences guides the reorganization of
33
34 memory along hippocampal-cortical networks.
35
36
37
38
39
40
41
42

43 The hippocampus is able to separate overlapping inputs during memory encoding in order
44
45 to minimize interference between similar traces, a function termed pattern separation,
46
47 which is associated to hippocampal dentate gyrus activity (Norman and O'Reilly, 2003;
48
49 Yassa and Stark, 2011; Kesner et al., 2015). On another hand, reactivation of a previously
50
51 stored representation when presented with a partial cue involves pattern completion
52
53 mediated by CA3 region (Neunuebel and Knierim, 2014). Similar memories will compete
54
55 during retrieval in the presence of overlapping features, promoting potential interferences
56
57
58
59
60

1
2
3 between consolidated traces (Colgin et al., 2008). Indeed, explicative models of
4 interference based on pattern separation and completion predicts that pattern completion in
5 the hippocampus reactivates neocortical traces by CA3 regions via the perforant path,
6 allowing the strengthening of the overlapping trace over time. At the same time, granule
7 cells of the dentate gyrus provide strong input by mossy fiber innervation to CA3 as a
8 pattern separation signal (Yassa and Reagh, 2013). This model proposes that cortical
9 interference can be facilitated whilst hippocampal interference is minimized. Based on this
10 framework, we suggest that similar memories can be segregated along cortico-hippocampal
11 axis by the acceleration of systems consolidation of competitive traces (at least when strong
12 training is involved). Being highly speculative, systems consolidation could be considered
13 as a potential mechanism to reduce catastrophic interference between similar memory
14 traces by modulating the structural dependence for retrieval.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 The main question that remains after this set of experiments is: why do only high training
35 intensities produce this phenomenon? Cordero et al. (1998) have found a positive
36 correlation between footshock intensity during training in contextual fear conditioning and
37 corticosterone plasma levels. In fact, the consolidation of overgeneralized memories has
38 been shown to be mediated by the release of adrenal stress hormones during training
39 (Pedraza et. al, 2016; Finsterwald et. al, 2015). We hypothesize that the summatory levels
40 of glucocorticoid and noradrenaline from first and second learning (context B) could
41 determine the rate of systems consolidation of both memory traces, allowing for trainings
42 with different or weak emotional values to be consolidated differentially compared with
43 two strong emotional experiences. Future investigations would shine light on the specific
44 role of glucocorticoid and noradrenaline release during sequential aversive learning.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Previous studies suggest that the reactivation of a memory trace can strengthen the
7
8 representation of that memory in the hippocampus, possibly through reconsolidation
9
10 (Winocur et al., 2010; de Oliveira Alvares et al., 2012; De Oliveira Alvares et al., 2013).
11
12 Here, we were able to demonstrate that generalization of the first learning (context A) was
13
14 prevented by periodical reactivation (Fig 3a), and that such process is mediated by
15
16 reconsolidation. We draw this conclusion based on the fact that the L-type voltage-gated
17
18 calcium channel (L-VGCC) play an essential role in memory destabilization induced by
19
20 reactivation, allowing its updating through reconsolidation (Suzuki et al., 2008; Flavell et
21
22 al., 2011; De Oliveira Alvares et al., 2013). Then, such effect is prevented by blocking L-
23
24 VGCC with nimodipine (Fig 3b). Our result with nimodipine administration before the
25
26 second learning (context B) showed that a new experience in the CFC can be acquired
27
28 without VGCC, replicating the previous result by Szu-Han Wang et al. (2012).
29
30
31
32
33
34
35
36

37 In summary, our findings have shown that (a) sequential aversive learning changes the rate
38
39 of systems consolidation, inducing memory generalization of the first learning fifteen days
40
41 after acquisition, (b) contextual specificity can predict hippocampal dependency for
42
43 retrieval, (c) two learning experiences (with the same emotional intensity) can be
44
45 consolidated systemically at different rates and structurally independent for retrieval, (d)
46
47 this phenomenon can be prevented by periodical memory reactivation and (e) it is mediated
48
49 by reconsolidation mechanisms. Taken together, systems consolidation of multiple aversive
50
51 memory traces may be relevant to understanding memory processing in anxiety disorders
52
53 such as posttraumatic stress disorder and fear overgeneralization.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Conflict of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.
4
5
6
7
8

9
10 **Acknowledgments:** This research was supported by fellowships and grants from the
11
12 CAPES (MEC), CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), and FINEP (“Rede Instituto
13
14 Brasileiro de Neurociências”, IBN-Net, No. 01.06.0842-00). We acknowledge Zelma
15
16 Regina V. de Almeida and Fernanda Nogueira Lotz Alves for their very competent and
17
18 always kind technical assistance.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

Aimone JB, Wiles J, Gage FH. 2009. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* 61:187-202.

Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De CA, Hsiang HL, Wheeler AL, Guskjolen A, Niibori Y, Shoji H and others. 2014. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* 344:598-602.

Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RG. 1995. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 378:182-186.

Beeman CL, Bauer PS, Pierson JL, Quinn JJ. 2013. Hippocampus and medial prefrontal cortex contributions to trace and contextual fear memory expression over time. *Learn Mem* 20:336-343.

Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671-675.

1
2
3 Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J*
4
5 *Compar Physiol Psychol* 68:129–113.
6
7

8
9
10
11
12 Cain CK, Blouin AM, Barad M. 2002. L-type voltage-gated calcium channels are required
13
14 for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J*
15
16 *Neurosci* 22:9113-9121.
17

18
19
20
21
22
23 Colgin LL, Moser EI, Moser MB. 2008. Understanding memory through hippocampal
24
25 remapping. *Trends Neurosci* 31:469-477.
26
27

28
29
30
31
32 Cordero MI, Merino JJ, Sandi C. 1998. Correlational relationship between shock intensity
33
34 and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of
35
36 contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 112:885-891.
37
38

39
40
41
42
43 Crestani AP, Zacouteguy BF, Haubrich J, Ordonez SR, Santana F, Molina JM, Cassini LF,
44
45 Alvares LO, Quillfeldt JA. 2015. Memory reconsolidation may be disrupted by a
46
47 distractor stimulus presented during reactivation. *Sci Rep* 5:13633.
48
49

50
51
52
53
54 Dash PK, Hebert AE, Runyan JD. 2004. A unified theory for systems and cellular memory
55
56 consolidation. *Brain Res Brain Res Rev* 45:30-37.
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7 de Oliveira Alvares L, Einarsson EO, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF,
8
9 Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its
10
11 precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092-1095.
12
13

14
15
16
17
18 de Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. 2013.
19
20 Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening:
21
22 exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244:42-48.
23
24

25
26
27
28
29 Ding HK, Teixeira CM, Frankland PW. 2008. Inactivation of the anterior cingulate cortex
30
31 blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory.
32
33 *Learn Mem* 15:290-293.
34
35

36
37
38
39
40 Finsterwald C, Steinmetz AB, Travaglia A, Alberini CM. 2015. From Memory Impairment
41
42 to Posttraumatic Stress Disorder-Like Phenotypes: The Critical Role of an
43
44 Unpredictable Second Traumatic Experience. *J Neurosci* 35:15903-15915.
45
46

47
48
49
50
51 Flavell CR, Barber DJ, Lee JL. 2011. Behavioural memory reconsolidation of food and fear
52
53 memories. *Nat Commun* 2: 504.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. 2004. The involvement of
4
5 the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881-
6
7 883.
8
9

10
11
12 Frankland PW, Josselyn SA. 2016. Hippocampal Neurogenesis and Memory Clearance.
13
14 *Neuropsychopharmacology* 41:382-383.
15
16

17
18
19 Frankland PW, Kohler S, Josselyn SA. 2013. Hippocampal neurogenesis and forgetting.
20
21 *Trends Neurosci* 36:497-503.
22
23

24
25
26 Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, Alvares LO, Quillfeldt JA.
27
28 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level
29
30 through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*
31
32 40:315-326.
33
34
35

36
37
38
39
40 Hardt O, Nader K, Nadel L. 2013. Decay happens: the role of active forgetting in memory.
41
42 *Trends Cogn Sci* 17:111-120.
43
44

45
46 Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, Alvares L de O, Quillfeldt JA
47
48 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level
49
50 through the incorporation of appetitive information.
51
52 *Neuropsychopharmacology*. 40:315-26.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Haubrich J, de Freitas CL, Diehl F, Santana F, de Oliveira LF, de Oliveira AL, Quillfeldt
4
5 JA. 2016. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear
6
7 memory. *Hippocampus* .
8
9

10
11
12
13
14 Johnston ST, Shtrahman M, Parylak S, Goncalves JT, Gage FH. 2015. Paradox of pattern
15
16 separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing memory
17
18 resolution and robustness. *Neurobiol Learn Mem* .
19
20

21
22
23
24
25
26 Kesner RP, Kirk RA, Yu Z, Polansky C, Musso ND. 2015. Dentate gyrus supports slope
27
28 recognition memory, shades of grey-context pattern separation and recognition
29
30 memory, and CA3 supports pattern completion for object memory. *Neurobiol*
31
32 *Learn Mem* .
33
34

35
36
37
38
39 Kyle CT, Stokes JD, Lieberman JS, Hassan AS, Ekstrom AD. 2015. Successful retrieval of
40
41 competing spatial environments in humans involves hippocampal pattern
42
43 separation mechanisms. *Elife* 4.
44
45

46
47 Lashgari R, Motamedi F, Zahedi AS, Shahidi S, Komaki A. 2006. Behavioral and
48
49 electrophysiological studies of chronic oral administration of L-type calcium
50
51 channel blocker verapamil on learning and memory in rats. *Behav Brain Res*
52
53 171:324-328.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Liu F, Zheng XL, Li BM. 2009. The anterior cingulate cortex is involved in retrieval of
4
5 long-term/long-lasting but not short-term memory for step-through inhibitory
6
7 avoidance in rats. *Neurosci Lett* 460:175-179.
8
9

10
11
12 McKenzie S, Eichenbaum H. 2011. Consolidation and reconsolidation: two lives of
13
14 memories? *Neuron* 71, 224–233
15
16

17
18
19 Markowitsch HJ, Calabrese P, Liess J, Haupts M, Durwen HF, Gehlen W. 1993.
20
21 Retrograde amnesia after traumatic injury of the fronto-temporal cortex. *J Neurol*
22
23 *Neurosurg Psychiatry* 56:988-992.
24
25
26

27
28
29 Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. 2004. Sites of neocortical reorganization
30
31 critical for remote spatial memory. *Science* 305:96-99.
32
33
34

35
36
37 Neunuebel JP, Knierim JJ. 2014. CA3 retrieves coherent representations from degraded
38
39 input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern
40
41 separation. *Neuron* 81:416-427.
42
43
44

45
46
47 Niibori Y, Yu TS, Epp JR, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW. 2012. Suppression of
48
49 adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal
50
51 CA3 region. *Nat Commun* 3:1253.
52
53
54

1
2
3 Norman KA, O'Reilly RC. 2003. Modeling hippocampal and neocortical contributions to
4
5 recognition memory: a complementary-learning-systems approach. *Psychol Rev*
6
7 110:611-646.
8
9

10
11
12 Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edition.
13
14 Academic Press: San Diego.
15
16

17
18
19
20 Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, de Oliveira AL. 2016. The
21
22 dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch
23
24 guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality.
25
26 *Hippocampus*.
27
28

29
30
31
32 Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. 2009. The formation of recent and
33
34 remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in
35
36 the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 29:8206-8214.
37
38

39
40
41
42 Rosenbaum RS, Priselac S, Kohler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M. 2000.
43
44 Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal
45
46 lesions. *Nat Neurosci* 3:1044-1048.
47
48

49
50
51 Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA,
52
53 Dranovsky A, Hen R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is
54
55 sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472:466-470.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS. 2003. The place of the hippocampus in fear
6 conditioning. *Eur J Pharmacol* 463:217-223.
7
8

9
10
11
12 Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J*
13 *Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
14
15

16
17
18
19
20 Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J, de Oliveira AL,
21 Quillfeldt JA. 2013. Reconsolidation may incorporate state-dependency into
22 previously consolidated memories. *Learn Mem* 20:379-387.
23
24
25

26
27
28
29 Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. Activation of LVGCCs
30 and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear
31 memories. *Learn Mem* 15:426-433.
32
33
34

35
36
37
38
39 Tayler KK, Lowry E, Tanaka K, Levy B, Reijmers L, Mayford M, Wiltgen BJ. 2011.
40
41
42 Characterization of NMDAR-Independent Learning in the Hippocampus. *Front*
43 *Behav Neurosci* 5:28.
44
45

46
47
48
49 Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW. 2006. Involvement of the
50
51
52 anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci*
53
54
55 26:7555-7564.
56
57
58
59
60

1
2
3 Teng E, Squire LR. 1999. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal
4
5 damage. *Nature* 400:675-677.
6
7

8
9
10 Tsé D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris
11
12 RG. 2007. Schemas and memory consolidation. *Science* 316:76-82.
13
14

15
16
17
18
19 Wang SH, Finnie PS, Hardt O, Nader K. 2012. Dorsal hippocampus is necessary for novel
20
21 learning but sufficient for subsequent similar learning. *Hippocampus* 22:2157-
22
23 2170.
24
25

26
27
28
29 Wang, S. H., Tse, D., Morris, R. G. Anterior cingulate cortex in schema assimilation and
30
31 expression. *Learning & Memory* 19(8):315–318, 2012
32
33

34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Wartman BC, Gabel J, Holahan MR. 2014. Inactivation of the anterior cingulate reveals
enhanced reliance on cortical networks for remote spatial memory retrieval after
sequential memory processing. *PLoS One* 9:e108711.

Wartman BC, Holahan MR. 2013. The use of sequential hippocampal-dependent and -non-
dependent tasks to study the activation profile of the anterior cingulate cortex
during recent and remote memory tests. *Neurobiol Learn Mem* 106:334-342.

1
2
3 Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B. 2010. Memory formation and long-term retention
4
5 in humans and animals: Convergence towards a transformation account of
6
7 hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339–2356.
8
9

10
11
12 Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M. 2007. Memory consolidation or transformation:
13
14 context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature*
15
16 *neuroscience*, 10(5), 555–557.
17
18

19
20
21 Wiltgen, B.J, Silva, A.J. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn.*
22
23 *Mem.*, 14: 313–317.
24
25

26
27
28 Wiltgen, B. J, Royle, G. A, Gray, E. E, Abdipranoto, A, Thangthaeng, ., Jacobs, N, Vissel,
29
30 B. 2010. A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and
31
32 learning. *PLoS ONE*, 5, e12818.
33
34
35

36
37
38 Wiltgen BJ, Wood AN, Levy B. 2011. The cellular mechanisms of memory are modified
39
40 by experience. *Learn Mem* 18:747-750.
41
42

43
44
45 Woodside BL, Borroni AM, Hammonds MD, Teyler TJ. 2004. NMDA receptors and
46
47 voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and
48
49 retention of a spatial memory task. *Neurobiol Learn Mem* 81:105-114.
50
51

52
53
54 Wu MV, Hen R. 2014. Functional dissociation of adult-born neurons along the dorsoventral
55
56 axis of the dentate gyrus. *Hippocampus* 24:751-761.
57
58
59
60

1
2
3
4
5 Yassa MA, Reagh ZM. 2013. Competitive Trace Theory: A Role for the Hippocampus in
6
7
8 Contextual Interference during Retrieval. *Front Behav Neurosci* 7:107.
9

10
11
12 Yassa MA, Stark CE. 2011. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci*
13
14
15 34:515-525.
16

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

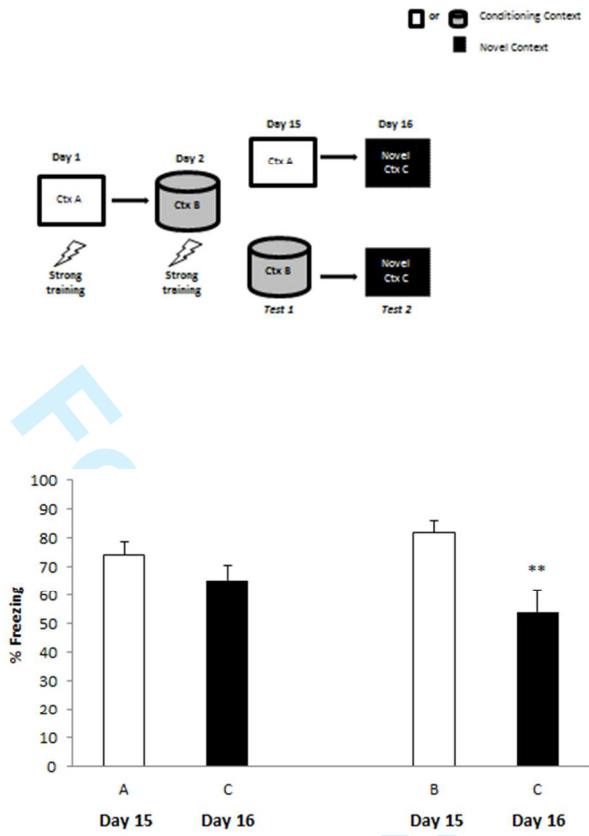
Figures and Legends

Figure 1 – Sequential learning with high training intensities induces, memory generalization of the first learning (context A). Graph displays percent of freezing time expressed as mean \pm SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. **a.** Double high training intensity during sequential CFC induces memory generalization of the first learning (context A) however, the ability to discriminate between original and novel contexts is not impaired in the second learning (context B) (Context A, n=9; Context B, n=9). **b.** This effect was not verified with double weak training intensity (Context A, n= 9; Context B, n= 9), **c.** different training intensities (Context A, n= 7; Context B, n= 8), or **d,** first learning (context A) with high training intensity and context B exposure without footshock. (Context A, n= 7; Context B, n= 8). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ANOVA followed by Tukey's HSD *post-hoc* test.

Figure 2 – Contextual specificity predicts hippocampal or cortical dependency during sequential CFC. Graph displays percent of freezing time expressed as mean \pm SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. **a.** Fifteen days after acquisition of double high training intensity protocol, only the second learning (context B) was vulnerable to intrahippocampal muscimol infusion (Context A, n=9; Context B, n=8). **b.** On the other hand, muscimol was able to disrupt memory expression of the first learning (context A) only by intra-ACC administration at the same time-point (Context A, n= 10; Context B, n=9). **c.** Both memories seem to be hippocampal-dependent seven days after acquisition (Context A, n= 14; Context B, n= 14) and **d,** cortical-dependent twenty-five days after sequential learning (Context A, n= 9; Context B, n=6). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ANOVA followed by Tukey's HSD *post-hoc* test.

1
2
3
4
5
6 **Figure 3 – Periodical memory reactivation promotes precision in a previous**
7 **generalized memory through reconsolidation mechanism.** Graph displays percent of
8 freezing time expressed as mean \pm SEM, and experimental design is shown in the top of
9 each panel. **a.** Periodical reactivation of the first learning (context A) promotes contextual
10 specificity fifteen days after acquisition (Context A, n=14; Context B, n=15); however **b,**
11 this effect can be prevented by systemic nimodipine administration before memory
12 reactivation showing the involvement of reconsolidation mechanisms (Context A, n=10;
13 Context B, n=10). **c.** As expected, nimodipine before the second learning (context B) was
14 ineffective in blocking second learning (context B) and memory generalization of the first
15 learning (context A) (Context A, n=7; Context B, n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
16 ANOVA followed by Tukey's HSD *post-hoc* test.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1a



Review

Hippocampus

Figure 1b

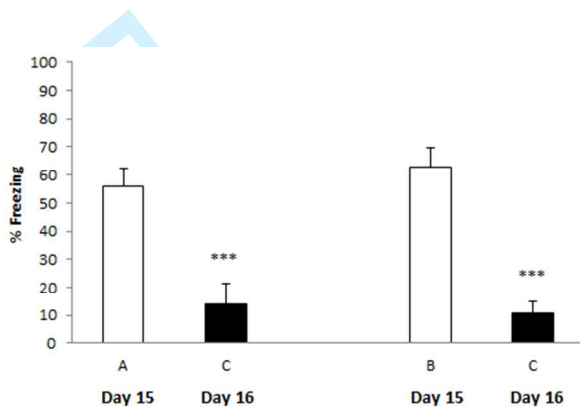
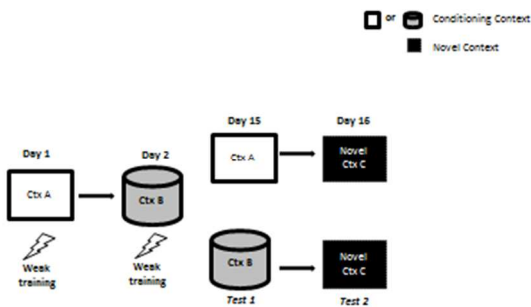


Figure 1c

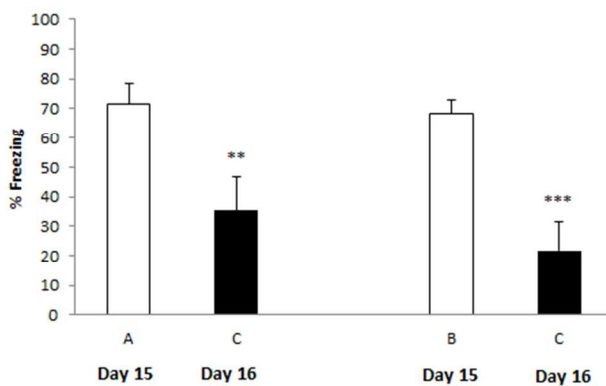
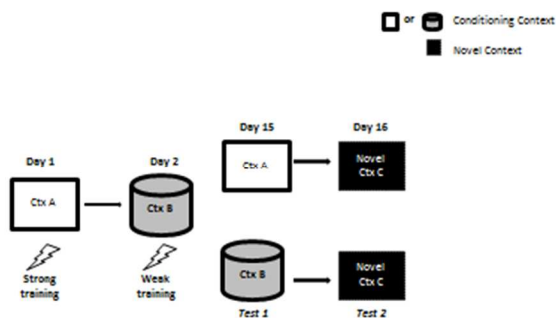
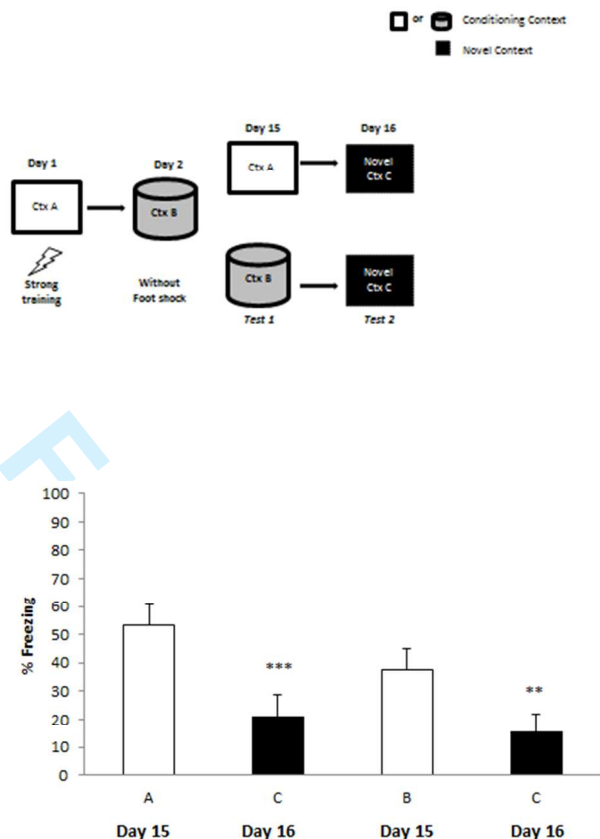
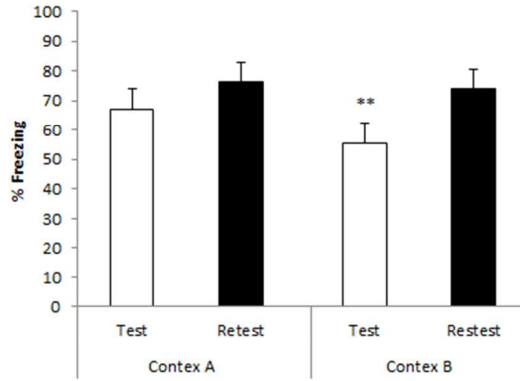
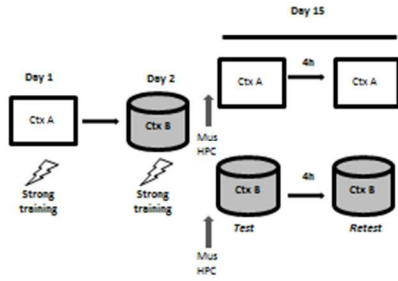


Figure 1d



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

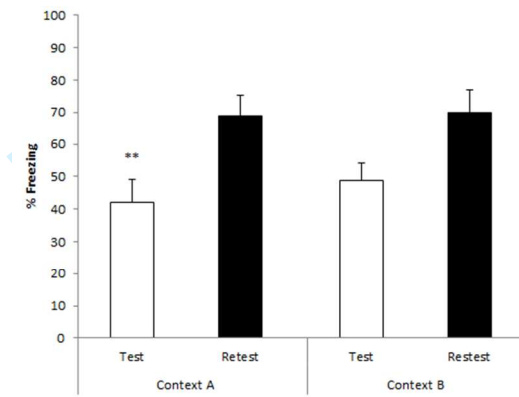
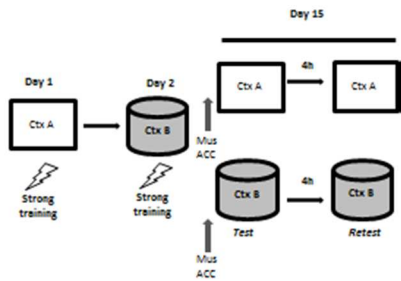
Review



Peer Review

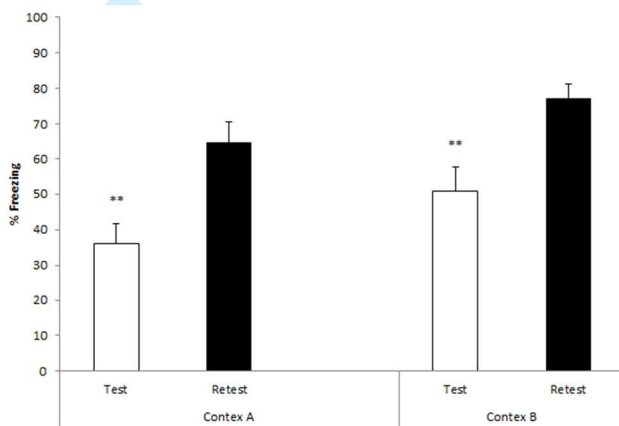
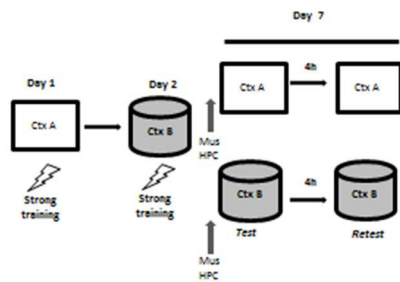
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2b



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2c



Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2d

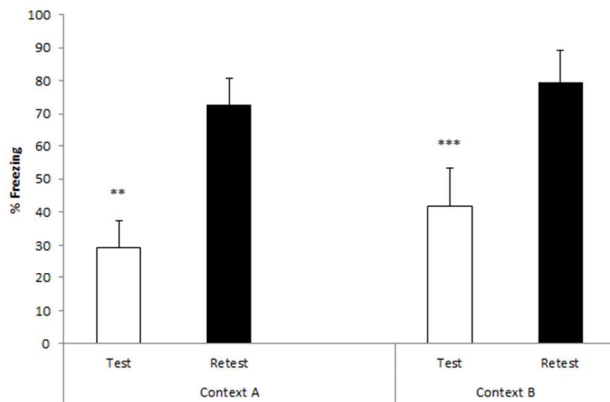
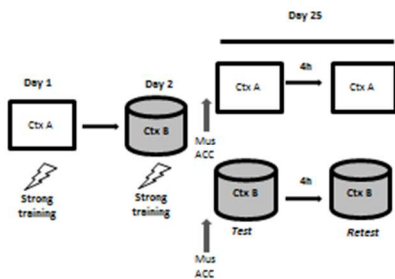
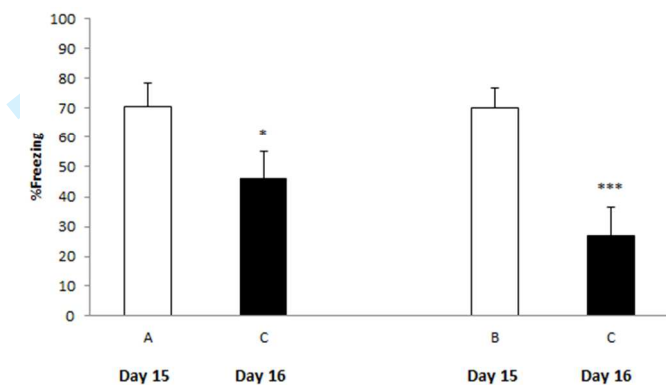
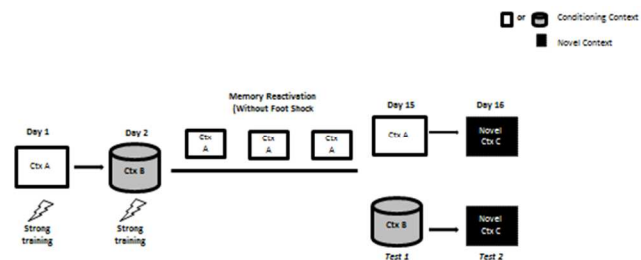


Figure 3a



Hippocampus Figure 3b

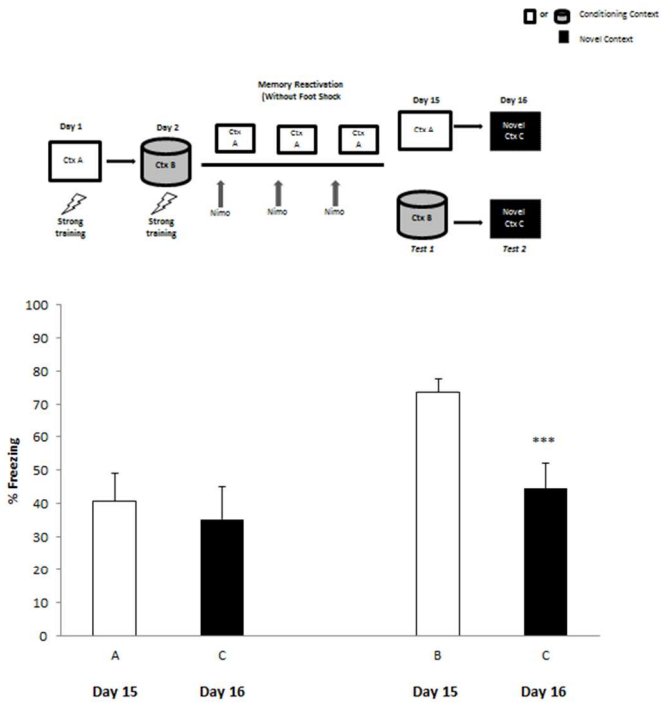
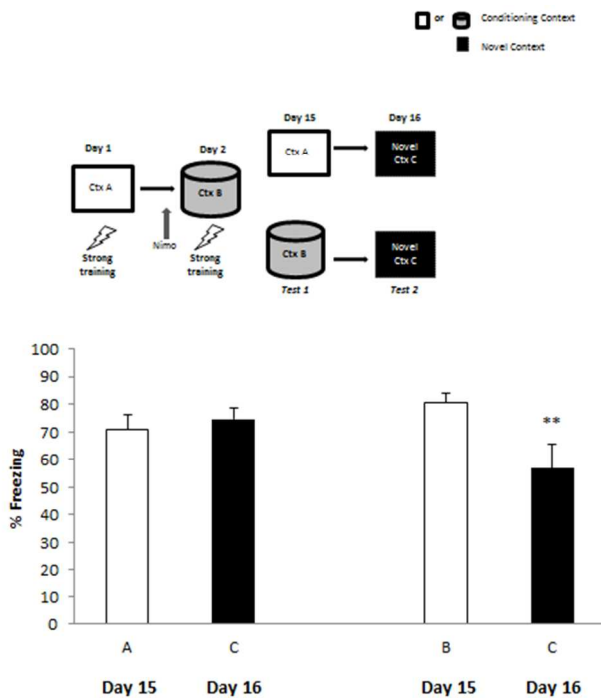


Figure 3c



5.0. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados aqui apresentados desafiam a noção da consolidação sistêmica como um processo dependente só do tempo. Assim, nossos experimentos foram capazes de demonstrar que as condições do aprendizado (intensidade do treino e aprendizados subsequentes) podem modificar a taxa da consolidação sistêmica, acelerando ou retardando o processo. Adicionalmente, consideramos que foi possível estabelecer uma correlação temporal entre dependência hipocampal e precisão da memória, até hoje só sugerida na literatura sem comprovações diretas.

Implicações dos resultados para os modelos explicativos da consolidação sistêmica

Como explicado na primeira parte desta dissertação, o “Modelo padrão da Consolidação Sistêmica” postula uma participação transitória do hipocampo na memória (Squire and Alvarez, 1995; Squire and Wixted, 2011). Esse modelo prevê uma codificação em paralelo entre redes hipocampais e corticais durante a aquisição da memória, junto com um fortalecimento progressivo de conexões cortico-corticais que eventualmente seriam suficientes para a evocação da memória em pontos remotos. Por outro lado, e em comparação com o “Modelo da Transformação da Memória”, o Modelo *Padrão* não entra em discussão sobre a independência hipocampal afetar qualitativamente a memória, desta

forma poderia ser esperada uma expressão similar entre memórias recentes e remotas. (Squire and Alvarez, 1995).

O “Modelo dos Múltiplos Traços”, enfatiza que a transformação e independência hipocampal propostas pelo Modelo *Padrão* só podem ser verificadas em memórias semânticas, enquanto que memórias episódicas, ricas em detalhes contextuais, precisariam sempre da atividade hipocampal para fornecer o contexto espacial e temporal que permitiria reconstruir o traço mnemônico (Moscovitch and Nadel, 1998; Moscovitch et al., 2005). Finalmente, o Modelo da Transformação, sendo uma atualização do Modelo de Múltiplos Traços, foca-se no fenômeno das memórias mudarem qualitativamente ao longo do tempo, mostrando-se precisas quando recentes e generalizadas em pontos remotos (Winocur and Moscovitch, 2011).

Nossos resultados mostraram uma estreita relação entre a dependência hipocampal e a precisão da memória (capacidade de distinguir entre o contexto previamente pareado com o choque e o contexto novo) fenômeno que foi primeiramente demonstrado quando usadas diferentes intensidades de treino no condicionamento aversivo ao contexto (CAC) e replicado no modelo de aprendizados subsequentes. A partir desses achados podemos concluir: a) a sensibilidade ao muscimol é nossa principal ferramenta para testar se uma estrutura em particular é ou não importante durante a evocação da memória. b) O Modelo padrão não prediz mudanças qualitativas entre memórias recentes e remotas, no entanto, nossos resultados avaliando precisão relevaram que memórias sistemicamente consolidadas são naturalmente generalizadas. c) Duas formas de mudanças qualitativas entre memórias

recentes e remotas (ou consolidadas e não consolidadas sistemicamente) foram observadas em nossos experimentos: a primeira uma diminuição na força da memória que foi verificada pela diminuição do comportamento de congelamento entre o teste da memória recente e remota, e a segunda, o fato das memórias consolidadas serem generalizadas a contextos alternativos. Acreditamos que nossas conclusões devem ficar restritas a essa segunda possibilidade (generalização) devido a que nenhum dos experimentos aqui mostrados têm a suficiente capacidade para gerar conclusões sobre perda de força da memória ao longo dos testes. De fato, quando utilizadas as diferentes intensidade de treino com somente um aprendizado, os animais passaram por diferentes condições de reativação que podem alterar a força da memória, seja induzindo alguma forma de extinção, mesmo que não significativa, ou fortalecendo o traço, efeito já discutido na literatura (Lee, 2009).

Embora o debate sobre o papel do hipocampo na recuperação de memórias consolidadas sistemicamente ainda esteja aberto, há evidências corroborando os nossos dados. Wiltgen et al., (2010) encontraram que memórias contextuais detalhadas precisam do hipocampo, no entanto, memórias não precisas ou generalizadas podem ser recuperadas sem esta estrutura. no seu trabalho, dividindo uma população de ratos em generalizadores e discriminadores, mostrou que animais com altos níveis de generalização a um contexto alternativo, não apresentavam perda da memória quando o hipocampo foi inativado antes do teste; por outro lado, ratos que conseguiam discriminar entre contextos tiveram o desempenho prejudicado. de Oliveira Alvares et al., (2012) mostraram que a reativação periódica da memória , mantém a precisão e dependência hipocampal num ponto do tempo no qual normalmente a memória é generalizada e independente do hipocampo. Esses estudos, bem como o presente, apoiam a visão de que o hipocampo é necessário pra evocar informações ricas em

detalhes ou com uma maior precisão, independentemente da idade da memória. No entanto, não pode ser desconsiderados os resultados contraditórios (Wang et al., 2009) e condições experimentais que parecem induzir a dependência hipocampal em memórias remotas de forma transitória (Einarsson et al., 2015).

Reativação periódica da memória como indutor da dependência hipocampal e precisão da memória: Envolvimento de mecanismos de reconsolidação

Estudos prévios têm sugerido que a reativação de um traço da memória pode fortalecer a representação da memória no hipocampo (Winocur et al., 2010). Estudos adicionais mostraram que esses efeitos da reativação são mediados por processos de reconsolidação (Inda et al., 2011; de Oliveira Alvares et al., 2013). A plasticidade induzida pela reconsolidação e o fortalecimento dos traços da memória produto da reativação têm sido proposto como potencialmente adaptativo, mantendo a relevância e precisão da memória e guiando o comportamento futuro (Lee, 2008).

Do mesmo modo, estudos em seres humanos mostraram que a reativação fortalece a memória (Forcato et al., 2013;2014) e produz efeitos positivos na memória de longa duração, diminuindo o possível esquecimento da informação.

Durante os experimentos com diferentes intensidades de treino numa memória só (Artigo 1), encontramos uma marcada diferença na dependência hipocampal entre animais que

foram testados no contexto de condicionamento (contexto original) no dia 3 (reativados) e os animais não reativados (testados em contexto alternativo).

No protocolo forte, animais que tinham sido reativados previamente no contexto de condicionamento ou original, mantiveram a memória dependente do hipocampo nos dias 15 e 25. Um resultado similar foi verificado durante os experimentos com aprendizados subsequentes, onde o mesmo protocolo de reativação periódica conseguiu manter precisa uma memória que nas condições do nosso experimento se mostraria generalizada 15 dias depois do treino.

Além da possível hipótese do fortalecimento da memória no hipocampo induzida pela reativação, mostramos que esses resultados estão mediados por mecanismos de reconsolidação. A nimodipina, um antagonista de canais de cálcio do tipo L, tem sido utilizada como um inibidor do processo de desestabilização/reconsolidação da memória (Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015) sendo uma das principais ferramentas para bloquear processos de plasticidade induzidos pela reativação. A administração de nimodipina antes de cada reativação conseguiu reverter a indução da precisão em nosso protocolo, resultado que permite concluir que o fortalecimento mediado pela reativação da memória (e em nosso caso também a dependência hipocampal) está associado a mecanismos de reconsolidação,

Níveis de estresse durante o treino definem a taxa da consolidação sistêmica

O estresse é geralmente definido como qualquer condição que perturba a homeostase fisiológica ou psicológica de um organismo. A exposição a um evento estressante ativa rapidamente o sistema nervoso autônomo e aumenta os níveis de noradrenalina no encéfalo. Também é ativado o eixo (HPA) hipotálamo-pituitária-adrenal, resultando num aumento lento dos níveis de corticosterona plasmáticos (em ratos e camundongos) ou cortisol (em humanos). Esses hormônios ativam receptores mineralocorticoides (MRs) e receptores glicocorticoides (GRs), os quais estão localizados em regiões críticas para a formação da memória, tais como o hipocampo, a amígdala, e o córtex pré-frontal. Através desses receptores e na interação com outros neuromoduladores, tais como o hormônio liberador de corticotropina (CRH), endocanabinoides, entre outros, os hormônios promovem e direcionam a consolidação da memória (Campolongo et al., 2009, de Oliveira Alvares et al., 2010).

Essas respostas fisiológicas não somente atuam na preparação do corpo para enfrentar o estímulo estressante, mas também atuam na melhora da persistência da informação em torno do evento ameaçador. Acredita-se que reações emocionais fornecem relevância às experiências, e assim a consolidação da memória é modulada positivamente (McGaugh, 2000). O envolvimento dos glicocorticoides e noradrenalina na consolidação da memória têm sido amplamente demonstrado (Cordero et al., 2002; Roozendaal et al., 2006; de Oliveira Alvares et al., 2010; Roozendaal and McGaugh, 2011).

Nossos resultados mostram que os níveis de estresse moderado produzidos pelo treinamento fraco promoveram uma representação detalhada do contexto que dura até 40 dias. Pelo contrário, o treino forte ou de alta intensidade, promoveu uma memória

generalizada entre uma e duas semanas após o condicionamento. Esse padrão parece ser extremamente adaptativo, uma vez que uma situação estressante moderada promove uma representação contextual ideal da experiência. No entanto, uma situação altamente estressante cria uma memória mais generalizada, tornando-a mais fácil de ser ativa numa variedade de condições que permitiria a rápida identificação de potenciais ameaças e a expressão de uma resposta adequada.

Aqui demonstramos que a consolidação sistêmica da memória e a generalização da mesma são mediadas pela liberação de glicocorticóides e noradrenalina durante o treino, uma vez que este processo foi impedido pela inibição da síntese de glicocorticoides (Metirapona) ou pelo antagonismo de receptores beta adrenérgico (propranolol), mostrando que estes sistemas podem ser modulados visando acelerar ou retardar a consolidação sistêmica.

Estudos prévios têm mostrado que os glicocorticoides interagem com o sistema noradrenérgico (Roosendaal et al., 2003, 2004, 2006) e o sistema endocanabinoide (Campolongo et al., 2009; de Oliveira Alvares et al., 2010; Atsak et al., 2012) para modular os processos de memória. Nós sugerimos que a liberação de glicocorticoides durante o protocolo forte age sinergicamente com o sistema noradrenérgico no hipocampo durante a consolidação da memória. Essa interação acelera a consolidação sistêmica e a generalização. De fato, um estudo recente corrobora esta hipótese, mostrando que o aumento da transmissão noradrenérgica induz a formação de memórias generalizadas através da ativação dos receptores beta adrenérgicos (Gazarini et al., 2014). Em conclusão, nós propomos que os níveis de estresse durante a aprendizagem agem como um interruptor, guiando a qualidade da memória. Um nível moderado de estresse vai formar uma memória

precisa, pelo contrário, altos níveis de estresse durante o aprendizado vão formar uma memória generalizada. Este processo é determinado pela ativação dos sistemas glicocorticóides e noradrenérgicos, os quais irão prever a taxa da consolidação sistêmica.

Embora os efeitos de hormônios do estresse não tenham sido testados durante o protocolo com aprendizados subsequentes, propomos que os níveis totais de glicocorticóides e noradrenalina produzidos pela soma do primeiro e segundo aprendizado poderiam determinar a taxa da consolidação sistêmica de ambos os traços de memória, permitindo que os aprendizados com diferentes intensidades de treino ou treinos fracos sejam consolidados de forma diferente em comparação com as duas experiências emocionais fortes. Essa hipótese deve ser verificada em futuros experimentos.

Reorganizando memórias e eliminando interferências

A partir dos resultados mostrados com o protocolo de aprendizados subsequentes, a pergunta que permanece é: por que somente na condição de dois aprendizados fortes conseguimos verificar o efeito de uma memória ser consolidada sistemicamente e a outra permanecer dependente do hipocampo? Uma possível hipótese foi mencionada anteriormente sobre os possíveis efeitos somatórios dos níveis de hormônios do estresse provenientes de ambos os aprendizados; no entanto, existe mais uma possibilidade que tem a ver com mecanismos de interferência entre traços mnemônicos. Hardt et al., (2013) propõe que os níveis de interferência no hipocampo influenciam a janela temporal da generalização da memória. Decaimentos progressivos das representações hipocampais

induzem generalização da memória e sobreposição de memórias dependentes de estruturas corticais, desta forma, mantendo traços similares dependentes de estruturas diferentes pode ser diminuída a possibilidade de interferência comparado com situações onde os dois traços dependem da mesma estrutura (hipocampo ou córtex).

O hipocampo é capaz de separar a sobreposição das entradas ou aferências durante a codificação da memória a fim de minimizar interferências entre traços semelhantes, uma função denominada separação de padrões (pattern separation), que por sua vez está associada à atividade do giro denteado do hipocampo (Norman and O'Reilly, 2003; Yassa and Stark, 2011; Kesner et al., 2015). Por outro lado, a reativação de uma representação previamente armazenada quando apresentada com um traço ou sinal parcial envolve a agrupação de padrões (patterns completion) mediada pela região CA3 (Neunuebel and Knierim, 2014). Memórias semelhantes vão competir durante a evocação induzida pela presença de características sobrepostas que promovem potenciais interferências entre traços consolidados (Colgin et al., 2008). De fato, modelos explicativos de interferência baseados na separação e agrupação de padrões prevêm que a agrupação de padrões no hipocampo reativa traços neocorticais que promove sobreposição de traços ao longo do tempo. Por outro lado, as células granulares do giro denteado fornecem fortes entradas ou “inputs” pela inervação das fibras musgosas a CA3 como sinalização de separação de padrões (Yassa and Reagh, 2013). Este modelo propõe que a interferência cortical pode ser facilitada enquanto a interferência hipocampal é minimizada. Com base nestas afirmações, sugerimos que memórias similares, onde o valor emocional seria determinante para esse fenômeno, podem ser segregadas ao longo do eixo hipocampo-cortical pela aceleração da consolidação sistêmica dos traços competitivos.

Propomos a consolidação sistêmica como um mecanismo transitório, para evitar interferências entre traços de memórias similares. Acelerando a consolidação sistêmica de um destes traços (no nosso caso o primeiro aprendido), a evocação de cada memória seria mediada por redes neuronais diferentes com pouca possibilidade de sobreposição. Desta forma a evocação da primeira memória vai ser mediada pelo córtex, expressa de forma generalizada e a segunda dependente do hipocampo que será precisa (Fig 6.1). Este panorama muda completamente quando os aprendizados subsequentes possuem valência emocional igualmente fraca ou diferente (Fig 6.2). Devido ao aprendizado de mais de uma informação, as duas memórias têm sua taxa de consolidação sistêmica acelerada, fenômeno que de qualquer forma gera que num ponto de tempo ambas sejam independentes do hipocampo, provavelmente o momento de maior sobreposição entre os traços.

Dois Aprendizados Fortes

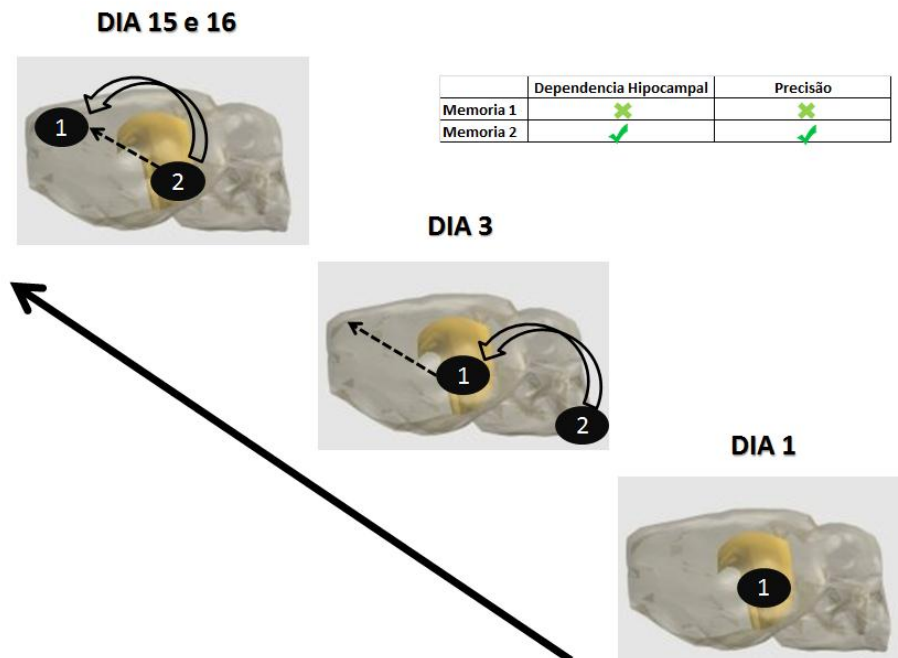


Figura 5.1.

Modelo explicativo dos resultados provenientes de aprendizados subsequentes igualmente fortes no CAC. Um segundo aprendizado (memória 2) promove a consolidação sistêmica e generalização de memórias previamente consolidadas e dependentes do hipocampo (memória 1).

Dois Aprendizados Fracos ou de Intensidade Diferente

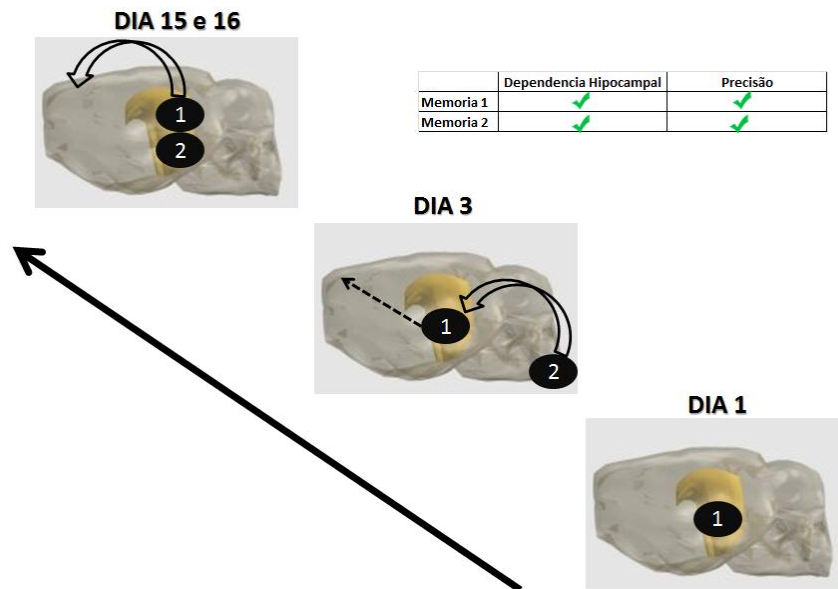


Figura 5.2.

Modelo explicativo dos resultados provenientes de aprendizados subsequentes igualmente fracos ou diferentes no CAC. A valência emocional fraca ou diferente dos traços permite que ambos sejam dependentes do hipocampo e precisos por mais tempo quando comparados com dois traços de memórias fortes (Fig. 6.1)

Apesar do nosso protocolo não ser sensível para avaliar interferência entre o primeiro e o segundo aprendizado, seja quando ambas são dependentes do hipocampo (7 dias) ou dependentes do córtex (25 dias), nossa principal conclusão, a aceleração da consolidação sistêmica, sustenta parcialmente a hipótese anterior, sugerindo que o valor emocional de experiências semelhantes guia a reorganização da memória ao longo das redes cortico-hipocampais.

Sendo altamente especulativos, a consolidação sistêmica poderia ser considerada como um potencial mecanismo para reduzir a interferência entre traços de memórias semelhantes modulando a dependência estrutural durante a evocação. Esperamos direcionar próximos experimentos para testar essa possibilidade.

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS E DIREÇÕES FUTURAS

Tomados em conjunto, nossos resultados aportam uma evidência sólida sobre a flexibilidade da consolidação sistêmica, embora o fator tempo continua tendo um rol muito importante no processo, as condições do treino e experiências prévias de aprendizagem modulam de forma muito interessante o processo tornando-o dinâmico. Nós propomos que os níveis de estresse durante a aprendizagem agem como um interruptor, guiando a qualidade da memória e a dependência hipocampal. Níveis moderados de estresse vão formar uma memória mais precisa e por mais tempo dependente do hipocampo; pelo contrário, altos níveis de estresse durante o aprendizado vão formar uma memória generalizada que acelerara o processo da consolidação sistêmica. Por outro lado, o fator estresse parece novamente fundamental na consolidação de múltiplos traços de memória. Nossos resultados sugerem que altos níveis de estresse durante aprendizados subsequentes muda a dinâmica da consolidação sistêmica em comparação com aprendizados mais fracos ou de valência emocional diferente. Consideramos que estudos adicionais devem ser realizados para testar a hipótese deste processo ser um mecanismo de atenuação de interferências entre traços similares. Mesmo considerando que nossos experimentos são principalmente uma aproximação básica ao entendimento da manutenção e reorganização

da memória no encéfalo, o fenômeno da generalização da memória pode ser uma abordagem válida para investigar o papel da consolidação sistêmica nos transtornos de ansiedade como o Transtorno de Estresse Pós-traumático (TEPT) caracterizado pela sobre generalização de memórias aversivas.

6.0 REFERENCIAS COMPLEMENTARES (Introdução e Discussão)

- Abrous DN, Wojtowicz JM. 2015. Interaction between Neurogenesis and Hippocampal Memory System: New Vistas. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De CA, Hsiang HL, Wheeler AL, Guskjolen A, Niibori Y, Shoji H and others. 2014. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* 344:598-602.
- Albensi BC 2007. The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Curr Pharm Des* 13:3185-3194.
- Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-56.
- Ambrogio LC, Baldi E, Bucherelli C, Tassoni G. 1993. Forced extinction as a means to evaluate consolidation gradient of a passive avoidance response in the rat. *Physiol Behav* 53:873-877.
- Amrein I, Lipp HP. 2009. Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history. *Biol Lett* 5:141-144.
- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. 1999. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* 19:1106-1114.

- Anderson MC, Hanslmayr S. 2014. Neural mechanisms of motivated forgetting. *Trends Cogn Sci* 18:279-292.
- Anderson MC, Huddleston E. 2012. Towards a cognitive and neurobiological model of motivated forgetting. *Nebr Symp Motiv* 58:53-120.
- Anderson MC, Ochsner KN, Kuhl B, Cooper J, Robertson E, Gabrieli SW, Glover GH, Gabrieli JD. 2004. Neural systems underlying the suppression of unwanted memories. *Science* 303:232-235.
- Atherton LA, Dupret D, Mellor JR. 2015. Memory trace replay: the shaping of memory consolidation by neuromodulation. *Trends Neurosci* 38:560-570.
- Atsak P, Hauer D, Campolongo P, Schelling G, McGaugh JL, Roozendaal B. 2012. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3504-3509.
- Babb SJ, Crystal JD. 2006. Episodic-like memory in the rat. *Curr Biol* 16:1317-1321.
- Bartlett FC (1932) Remembering. In: Cambridge University Press, Cambridge
- Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Compar Physiol Psychol* 68:129–113.
- Bransford JD, Johnson MK. 1972. Contextual prerequisites for understanding-some investigations of comprehension and recall. *J Verb Learn Verb Behav* 11:717- 726.

- Beck AT, Haigh EA. 2014. Advances in cognitive theory and therapy: the generic cognitive model. *Annu Rev Clin Psychol* 10:1-24.
- Beeman CL, Bauer PS, Pierson JL, Quinn JJ. 2013. Hippocampus and medial prefrontal cortex contributions to trace and contextual fear memory expression over time. *Learn Mem* 20:336-343.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. 2008a. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* 14:147-156.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Kathe C, Slipeczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. 2008b. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2711-2716.
- Besnard A, Caboche J, Laroche S. 2012. Reconsolidation of memory: A decade of debate. *Prog Neurobiol* 99:61-80.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671-675.
- Bouton ME. 1993. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114:80-99.
- Broadbent NJ, Clark RE. 2013. Remote context fear conditioning remains hippocampus-dependent irrespective of training protocol, training-surgery interval, lesion size, and lesion method. *Neurobiol Learn Mem* 106:300-308.

- Brooks DC. 2000. Recent and remote extinction cues reduce spontaneous recovery. *Q J Exp Psychol B* 53:25-58.
- Brooks DC, Bouton ME. 1993. A retrieval cue for extinction attenuates spontaneous recovery. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 19:77-89.
- Brown AM, Sissman M, Kasprow WJ, Miller RR. 1985. The roles of information reactivation and nonassociative arousal in recovery from ECS-induced retrograde amnesia. *Physiol Behav* 35:183-187.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34:446-457.
- Callaghan BL, Li S, Richardson R. 2014. The elusive engram: what can infantile amnesia tell us about memory? *Trends Neurosci* 37:47-53.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Hauer D, Schelling G, McGaugh JL, Cuomo V. 2009. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4888-4893.
- Carr MF, Jadhav SP, Frank LM. 2011. Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat Neurosci* 14:147-153.
- Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A. 2002. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132:1-15.

- Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzer RD, Alberini CM. 2011. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469:491-497.
- Colgin LL, Moser EI, Moser MB. 2008. Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends Neurosci* 31:469-477.
- Collingridge GL, Randall AD, Davies CH, Alford S. 1992. The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺ signalling in neurons. *Ciba Found Symp* 164:162-171.
- Cordero MI, Kruyt ND, Merino JJ, Sandi C. 2002. Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. *Stress* 5:73-79.
- Crestani AP, Zacobteguay BF, Haubrich J, Ordonez SR, Santana F, Molina JM, Cassini LF, Alvares LO, Quillfeldt JA. 2015. Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Sci Rep* 5:13633.
- Crystal JD. 2009. Elements of episodic-like memory in animal models. *Behav Processes* 80:269-277.
- Dash PK, Hebert AE, Runyan JD. 2004. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Brain Res Rev* 45:30-37.
- de Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244:42-48.

- de Oliveira Alvares L, Einarsson EO, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092-1095.
- de Oliveira Alvares L, Engelke DS, Diehl F, Scheffer-Teixeira R, Haubrich J, de Freitas CL, Molina VA, Quillfeldt JA. 2010. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learn Mem* 17:202-209.
- Douville K, Woodard JL, Seidenberg M, Miller SK, Leveroni CL, Nielson KA, Franczak M, Antuono P, Rao SM. 2005. Medial temporal lobe activity for recognition of recent and remote famous names: an event-related fMRI study. *Neuropsychologia* 43:693-703.
- Dudai Y. 2002. *Memory from a to z keywords concepts and beyond*. Oxford University Press.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51-86.
- Dudai Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annu Rev Neurosci* 35:227-247.
- Dudai Y, Eisenberg M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100.
- Dudai Y, Karni A, Born J. 2015. The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*. 88(1):20-32.

- Duncan CP. 1949. The retroactive effect of electroshock on learning. pp 32-44.
- Einarsson EO, Pors J, Nader K. 2015. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology* 40:480-487.
- Elzinga BM, Bremner JD. 2002. Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? *J Affect Disord* 70:1-17.
- Forcato C, Fernandez RS, Pedreira ME. 2013. The role and dynamic of strengthening in the reconsolidation process in a human declarative memory: What decides the fate of recent and older memories? *PLoS One* 8:e61688.
- Forcato C, Fernandez RS, Pedreira ME. 2014. Strengthening a consolidated memory: the key role of the reconsolidation process. *J Physiol Paris* 108:323-333.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119-130.
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881-883.
- Frankland PW, Josselyn S. 2016. In search of the memory molecule. *Nature*. 535(7610):41-2.

- Frankland PW, Kohler S, Josselyn SA. 2013. Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends Neurosci* 36:497-503.
- Gazarini L, Stern CA, Piornedo RR, Takahashi RN, Bertoglio LJ. 2014. PTSD-Like Memory Generated Through Enhanced Noradrenergic Activity is Mitigated by a Dual Step Pharmacological Intervention Targeting its Reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.
- Glaser V, Carlini VP, Gabach L, Ghersi M, de Barioglio SR, Ramirez OA, Perez MF, Latini A. 2010. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol* 30:1067-1075.
- Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. 2011. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* 147:678-689.
- Groves J, Leslie I, Huang G, McHugh S, Taylor A, Mott R, Munafò M, Bannerman D, Flint J. 2013. Ablating adult neurogenesis in the rat has no effect on spatial processing: evidence from a novel pharmacogenetic model. *PLoS Genetics*. 9(9):e1003718
- Gupta AS, van der Meer MA, Touretzky DS, Redish AD. 2010. Hippocampal replay is not a simple function of experience. *Neuron* 65:695-705.
- Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI. 2004. Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron* 44:581-584.

- Haist F, Bowden GJ, Mao H. 2001. Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. *Nat Neurosci* 4:1139-1145.
- Hardt O, Einarsson EO, Nader K. 2010. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annu Rev Psychol* 61:141-167.
- Hardt O, Nader K, Nadel L. 2013. Decay happens: the role of active forgetting in memory. *Trends Cogn Sci* 17:111-120.
- Harris JA, Jones ML, Bailey GK, Westbrook RF. 2000. Contextual control over conditioned responding in an extinction paradigm. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 26:174-185.
- Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, Alvares LO, Quillfeldt JA. 2015. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology* 40:315-326.
- Haubrich J, de Freitas CL, Diehl F, Santana F, de Oliveira LF, de Oliveira AL, Quillfeldt JA. 2016. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus* .
- Herry C, Garcia R. 2002. Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *J Neurosci* 22:577-583.

- Hopkins ME, Nitecki R, Bucci DJ. 2011. Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* 194:84-94.
- Huijgen J, Samson S. 2015. The hippocampus: A central node in a large-scale brain network for memory. *Rev Neurol (Paris)* 171:204-216.
- Inda MC, Muravieva EV, Alberini CM. 2011. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* 31:1635-1643.
- Inokuchi K. 2011. Adult neurogenesis and modulation of neural circuit function. *Curr Opin Neurobiol* 21:360-364.
- Insausti R, Annese J, Amaral DG, Squire LR. 2013. Human amnesia and the medial temporal lobe illuminated by neuropsychological and neurohistological findings for patient E.P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E1953-E1962.
- Izquierdo I. 2011. *Memória*. Artmed Porto Alegre.
- Izquierdo I, Medina JH. 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68:285-316.
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:1-11.

- Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol* 22:269-287.
- James R., Misanin, Ralph R. Miller, Donald J. Lewis. 1968. Retrograde Amnesia Produced by Electroconvulsive Shock after Reactivation of a Consolidated Memory Trace. pp 554-555.
- Josselyn SA, Frankland PW. 2012. Infantile amnesia: a neurogenic hypothesis. *Learn Mem* 19:423-433.
- Kandel ER. 2014. *Principles of Neural Science, Fifth Edition*
- Kaouane N, Porte Y, Vallee M, Brayda-Bruno L, Mons N, Calandreau L, Marighetto A, Piazza PV, Desmedt A. 2012. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science* 335:1510-1513.
- Kapur N, Brooks DJ. 1999. Temporally-specific retrograde amnesia in two cases of discrete bilateral hippocampal pathology. *Hippocampus* 9:247-254.
- Karlsson MP, Frank LM. 2009. Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12:913-918.
- Karpicke JD, Roediger HL. 2008. The critical importance of retrieval for learning. *Science* 319:966–968.

- Kesner RP, Kirk RA, Yu Z, Polansky C, Musso ND. 2015. Dentate gyrus supports slope recognition memory, shades of grey-context pattern separation and recognition memory, and CA3 supports pattern completion for object memory. *Neurobiol Learn Mem* .
- Kida S, Josselyn SA, Pena de OS, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-355.
- Kim JJ, Fanselow MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675-677.
- Kitamura T, Inokuchi K. 2014. Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain* 7:13.
- Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K. 2009. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139:814-827.
- Krugers H., Hoogenraad C., Groc L. 2010. Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci.* 10:675-81.
- Layton B, Krikorian R. 2002. Memory mechanisms in posttraumatic stress disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:254-261.

- LeBlancq M, McKinney I, Dickson X. 2016. ZIP It: Neural Silencing Is an Additional Effect of the PKM-Zeta Inhibitor Zeta-Inhibitory Peptide. *The Journal of Neuroscience*. 36(23):6193– 6198.
- Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 1999. 100 years of consolidation--remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem* 6:77-87.
- Lee A, Kanter B, Wang D, Lim J, Zou M, Qiu C, McMahon T, Dagdar J, Fischbach-Weiss S, Messing R. 2013. Prkcz null mice show normal learning and memory. *Nature*. 17;493(7432):416-9.
- Lee JL. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*. 11:1264–1266.
- Lee JL. 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32:413-420.
- Lewis DJ. 1979. Psychobiology of active and inactive memory. pp 1054-1083.
- Lewis, D. J., Misanin, J. R., & Miller, R. R. 1968. Recovery of memory following amnesia. *Nature*, 220(5168), 704-705.
- Liu Y, Zhang J. 2000. Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J (Engl)* 113:948-956.

- Lubow RE, De la Casa LG. 2002. Superlatent inhibition and spontaneous recovery: differential effects of pre- and postconditioning CS-alone presentations after long delays in different contexts. *Anim Learn Behav* 30:376-386.
- Maguire EA. 2001. Neuroimaging, memory and the human hippocampus. *Rev Neurol (Paris)* 157:791-794.
- Mah CJ, Albert DJ, Jamieson JL. 1972. Memory storage: evidence that consolidation continues following electroconvulsive shock. *Physiol Behav* 8:283-286.
- Malleret G, Alarcon JM, Martel G, Takizawa S, Vronskaya S, Yin D, Chen IZ, Kandel ER, Shumyatsky GP. 2010. Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *J Neurosci* 30:3813-3825.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. 1997. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88:261-274.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. 2004. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96-99.
- McGaugh JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- McTighe S, Mar A, Romberg C, Bussey T, Saksida L. 2009. A new touchscreen test of pattern separation: effect of hippocampal lesions. *NeuroReport* 20:881-885.
- Medina JH, Schroder N, Izquierdo I. 1999. Two different properties of short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:119-121.

- Mednick SC, Cai DJ, Shuman T, Anagnostaras S, Wixted JT. 2011. An opportunistic theory of cellular and systems consolidation. *Trends Neurosci* 34:504-514.
- Meeter M, Murre JM. 2004. Consolidation of long-term memory: evidence and alternatives. *Psychol Bull* 130:843-857.
- Monfils MH, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE. 2009. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science*. 324(5929):951-5
- Morgan MA, Schulkin J, LeDoux JE. 2003. Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training. *Behav Brain Res* 146:121-130.
- Moscovitch M, Nadel L. 1998. Consolidation and the hippocampal complex revisited: in defense of the multiple-trace model. *Curr Opin Neurobiol* 8:297-300.
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G and others. 2005. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat* 207:35-66.
- Nadel L, Moscovitch M. 1997. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7:217-227.
- Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M. 2000. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus* 10:352-368.

- Nader K, Einarsson EO. 2010. Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1191:27-41.
- Nader K, Hardt O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10:224-234.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000a) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-219.
- Napolitano M, Marfia GA, Vacca A, Centonze D, Bellavia D, Di ML, Frati L, Bernardi G, Gulino A, Calabresi P. 1999. Modulation of gene expression following long-term synaptic depression in the striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 72:89-96.
- Neunuebel JP, Knierim JJ. 2014. CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron* 81:416-427.
- Norman KA, O'Reilly RC. 2003. Modeling hippocampal and neocortical contributions to recognition memory: a complementary-learning-systems approach. *Psychol Rev* 110:611-646.
- Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. 2004. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:853-858.

- O'Mara SM, Commins S, Anderson M. 2000. Synaptic plasticity in the hippocampal area CA1-subiculum projection: implications for theories of memory. *Hippocampus* 10:447-456.
- Oomen C, Bekinschtein P, Kent B, Saksida L, Bussey T. 2014. Adult hippocampal neurogenesis and its role in cognition. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci.* 5(5): 573–587.
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton A, Sacktor T. 2006. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science.* 313(5790):1141-4.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H. 2004. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn Mem* 11:579-585.
- Quirk GJ. 2002. Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn Mem* 9:402-407.
- Rajaseethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, Lo M and others. 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* 526:653-659.
- Rasch B, Buchel C, Gais S, Born J. 2007. Odor cues during slow-wave sleep prompt declarative memory consolidation. *Science* 315:1426-1429.
- Raybuck JD, Lattal KM. 2014. Differential effects of dorsal hippocampal inactivation on expression of recent and remote drug and fear memory. *Neurosci Lett* 569:1-5.

- Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. 2009. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 29:8206-8214.
- Riccio DC, Millin PM, Bogart AR. 2006. Reconsolidation: a brief history, a retrieval view, and some recent issues. *Learn Mem* 13:536-544.
- Roediger HL, Butler III. AC, 2011. The critical role of retrieval practice in long-term retention. *Trends Cogn Sci* 15:20-27.
- Rolls ET. 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci* 7:74.
- Rolls ET, Kesner RP. 2006. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol* 79:1-48.
- Roosendaal B, de Quervain DJ, Schelling G, McGaugh JL. 2004. A systemically administered beta-adrenoceptor antagonist blocks corticosterone-induced impairment of contextual memory retrieval in rats. *Neurobiol Learn Mem* 81:150-154.
- Roosendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL. 2003. The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1328-1333.

- Roozendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL. 2004. Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J Neurosci* 24:8161-8169.
- Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10:423-433.
- Roozendaal B, McGaugh JL. 2011. Memory modulation. *Behav Neurosci* 125:797-824.
- Roozendaal B, Okuda S, de Quervain DJ, McGaugh JL. 2006. Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 138:901-910.
- Rosenegger D, Lukowiak K. 2010. The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea*. *Mol Brain* 3:24.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. 2009. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325:1017-1020.
- Rosenbaum RS, Kohler S, Schacter DL, Moscovitch M, Westmacott R, Black SE, Gao F, Tulving E. 2005. The case of K.C.: contributions of a memory-impaired person to memory theory. *Neuropsychologia* 43:989-1021.
- Rosenbaum RS, Winocur G, Moscovitch M. 2001. New views on old memories: re-evaluating the role of the hippocampal complex. *Behav Brain Res* 127:183-197.

- Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. 2015. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a021766.
- Squire LR, Wixted JT. 2011. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* 34:259-288.
- Stanton PK. 1996. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus* 6:35-42.
- Staresina BP, Cooper E, Henson RN. 2013. Reversible information flow across the medial temporal lobe: the hippocampus links cortical modules during memory retrieval. *J Neurosci* 33:14184-14192.
- Stein DJ. 2009. How we see others: the psychobiology of schemas and transference. *CNS Spectr* 14:10-13.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.
- Teyler TJ, Discenna P. 1984. Long-term potentiation as a candidate mnemonic device. *Brain Res* 319:15-28.
- Thompson RF. 1976. The search for the engram. *Am Psychol* 31:209-227.
- Tse D, Langston RF, Bethus I, Wood ER, Witter MP, Morris RG. 2008. Does assimilation into schemas involve systems or cellular consolidation? It's not just time. *Neurobiol Learn Mem* 89:361-365.

- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG. 2007. Schemas and memory consolidation. *Science* 316:76-82.
- Tsokas P, Hsieh C, Yao Y, Lesburgueres E, Wallace E, Tcherepanov A, Jothianandan D, Hartley B, Pan L, Rivard B, Farese R, Sajan M, Bergold P, Hernandez A, Cottrell J, Shouval H, Fenton A, Sacktor T. 2016. Compensation for PKMz in long-term potentiation and spatial long-term memory in mutant mice. *Elife*. pii: e14846.
- Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Walz R, Medina JH, Izquierdo I. 2000. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An Acad Bras Cienc* 72:353-364.
- Volk L, Bachman J, Johnson R, Yu Y, Hugarir R. 2013. PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature*. 493(7432):420-3.
- Wang SH, Teixeira CM, Wheeler AL, Frankland PW. 2009. The precision of remote context memories does not require the hippocampus. *Nat Neurosci* 12:253-255.
- Wang SH, Tse D, Morris RG. 2012. Anterior cingulate cortex in schema assimilation and expression. *Learn Mem* 19:315-318.
- Wartman BC, Gabel J, Holahan MR. 2014. Inactivation of the anterior cingulate reveals enhanced reliance on cortical networks for remote spatial memory retrieval after sequential memory processing. *PLoS One* 9:e108711.
- Wartman BC, Holahan MR. 2014. The impact of multiple memory formation on dendritic complexity in the hippocampus and anterior cingulate cortex assessed at recent and remote time points. *Front Behav Neurosci* 8:128.

- Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. 2011. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 50:1-8.
- Wiltgen BJ, Brown RA, Talton LE, Silva AJ. 2004. New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44:101-108.
- Wiltgen BJ, Silva AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14:313-317.
- Willshaw DJ, Dayan P, Morris RG. 2015. Memory, modelling and Marr: a commentary on Marr (1971) 'Simple memory: a theory of archicortex'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Winocur G, Moscovitch M. 2011. Memory transformation and systems consolidation. *J Int Neuropsychol Soc* 17:766-780.
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B. 2010. Memory formation and long-term retention in humans and animals: convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339-2356.
- Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M. 2007. Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci* 10:555-557.

Yamashita K, Hirose S, Kunimatsu A, Aoki S, Chikazoe J, Jimura K, Masutani Y, Abe O, Ohtomo K, Miyashita Y and others. 2009. Formation of long-term memory representation in human temporal cortex related to pictorial paired associates. *J Neurosci* 29:10335-10340.

Yassa MA, Reagh ZM. 2013. Competitive Trace Theory: A Role for the Hippocampus in Contextual Interference during Retrieval. *Front Behav Neurosci* 7:107.

Yassa MA, Stark CE. 2011. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci* 34:515-525.

Zola-Morgan SM, Squire LR. 1990. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science* 250:288-290.