

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**ATUALIZANDO OS CAMINHOS DO ENGRAMA: PAPEL DO  
CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR, NÚCLEO TALÂMICO  
REUNIENS E CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL NA  
CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA E GENERALIZAÇÃO DE  
MEMÓRIAS AVERSIVAS**

RODRIGO ALEJANDRO SIERRA ORDOÑEZ

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

Orientador: Prof. Jorge Alberto Quillfeldt  
Co-Orientador: Prof. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre, 2017

## DEDICATÓRIA

*Para minha amada esposa  
Lizeth Pedraza, você é responsável do  
cientista e homem que me tornei.*

*Para meu pai Alejandro Sierra e minha avó  
Vismaenza Ferro, os únicos, sinceros e incondicionais  
amores da minha vida.*

*Para quem agora só habita na minha memória  
e em forma de sensações, nunca será possível  
esquecer o verdadeiro amor de mãe.*

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer especialmente a quem mudou minha vida para sempre. Você linda esposa **Lizeth Pedraza** me ensino não somente a ser melhor homem, mas também melhor cientista. Alguns acreditam que sou eu quem ajuda você, mas não conseguem ver que quem aprende a cada segundo sou eu contigo. Você resgatou meu animo e desejo de luta, a confiança em que tudo esse mundo de conhecimento vale a pena, que existem pessoas como você apaixonadas não pelo resultado, a fama e os números e sim porque sentem alegria de aprender e descobrir. Gostaria ter um 10% da sua dedicação, entrega e persistência. Tomara consiga ficar até o fim dos meus dias ao teu lado para continuar aprendendo. Se hoje cheguei aqui é porque você sempre lutou do meu lado. Te amo como nunca amei ninguém.

Agradeço a minha avó **Vismaenza Ferro**, minha mãe nesse universo que mesmo na distancia continua cuidando de mim com amor e dedicação. Se alguém me entregou o amor mais sincero da vida foi você. Obrigado por acreditar em mim, por ver tanta coisas lindas que às vezes fica difícil imaginar que sejam parte de mim, pelas memórias do seu carinho, pelos abraços, pelos conselhos. Obrigado por existir.

Agradeço meu pai **Alejandro Sierra** por me ensinar que cada dia é uma nova batalha, que existem grandes guerras, grandes perdas e grandes conquistas. Amanhã qualquer uma delas ira acontecer, mas não será pela possibilidade de perder que tudo acabara porque novamente existira um amanhã e com ele novas esperanças. Você pai tem a capacidade de

regeneração emocional mais estranha que eu já vi na vida. Ainda me pergunto de onde tira tantas energias para que no outro dia após um milhão de dificuldades consiga acordar com um sorriso e encarar a vida como se nada tivesse acontecido. Espero tudo isso seja genético.

Agradeço especialmente aos professores **Jorge Quillfeldt** e **Lucas de Oliveira Alvares**. Foram meus mestres ao longo desses anos. Não só me ensinaram de ciência, também da vida. Nunca esquecerei que em mais de um momento as palavras do professor Jorge representaram as de um verdadeiro pai e coisas tão sutis como palavras adequadas mudaram minha forma de enxergar as dificuldades. Se não fosse pela oportunidade e confiança de ambos provavelmente meu caminho nesse mundo tivesse sido mais difícil.

Obrigado a todos meus colegas do **Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação** e de **Neurobiologia da Memória**. Aqueles que estão, aqueles que já foram e aqueles que apenas estão chegando são parte especial dessa história. Conviver esses anos com vocês foi a experiência mais enriquecedora da minha vida. Foi difícil ficar perto de muito de vocês enquanto a capacidade. É incrível como nosso laboratório tem a virtude de trazer tantas pessoas brilhantes ano após ano. Quem fica, saiba aproveitar o lugar no qual está, garanto que não é tão fácil chegar num laboratório como o nosso.

Se alguém mais se interessa nessas palavras de agradecimento e não me conhece pessoalmente, saiba que depois desses anos de mestrado e doutorado aprendi que um título não diz muita coisa de você. Muitos podem ter um doutorado, com dedicação e esforço, mas será que estão dispostos a ir além? Será que um título é o verdadeiro objetivo? Porque você faz aquilo que faz? Quem você quer ser? Aonde quer chegar? Quem é você no meio

de tantos doutores e pessoas brilhantes ao seu redor? Defina muito bem seus objetivos, chegar aqui é só o começo se verdadeiramente gostaria ir além.

## RESUMO

A consolidação sistêmica é um processo de reorganização estrutural onde memórias inicialmente dependentes do hipocampo passam a ser dependentes do córtex para serem evocadas. Classicamente, esse fenômeno tem sido associado com o passo do tempo, isto é, memórias recentes seriam dependentes do hipocampo enquanto memórias remotas seriam dependentes do córtex. A mesma variável “tempo” parece fundamental para mudanças na qualidade da memória em termos de quão precisa ela se expressa. Memórias testadas poucos dias após o treino são habitualmente precisas, enquanto maiores intervalos entre treino e teste aumentam a possibilidade de generalização, nesse caso estímulos discretos ou contextos neutros podem desencadear respostas condicionadas. Recentemente, uma forte relação entre consolidação sistêmica e generalização foi demonstrada, no entanto, se desconhece como esses processos ocorrem e quais são as vias implicadas na comunicação entre hipocampo e córtex que as favorecem. Aqui, usando o Condicionamento Aversivo ao Contexto, avaliamos duas estruturas, o Núcleo Talâmico Reuniens (NR) e o Córtex Entorrinal Lateral (CEL) como possíveis mediadores da consolidação sistêmica e generalização da memória. Nossos resultados mostraram que a atividade do NR é essencial para permitir que estruturas corticais inibidas antes do treino sejam novamente ativadas durante sessões de reativação/reconsolidação atualizando o engrama e permitindo a expressão da memória remota. Esses achados se complementaram com resultados eletrofisiológicos onde a inibição do NR prejudicou a indução de potenciação de longa

duração entre vias do hipocampo e o Córtex Cingulado Anterior. Por outro lado o CEL parece possuir uma janela de plasticidade alguns dias após o aprendizado (3 dias) que pode determinar a qualidade da memória no futuro. A inibição do CEL 3 dias após o treino mantém a precisão da memória em um ponto onde os controles generalizam. Esse fenômeno se mostrou mediado por uma via de sinalização dependente de receptores NMDA contendo a subunidade NR2B, a calcineurina e os receptores AMPA permeáveis ao cálcio. A mesma inibição que mantém a precisão parece também manter a dependência hipocampal. Propomos nesse texto que ambos, o NR e o CEL, são estruturas que controlam ativamente a consolidação sistêmica e generalização da memória possivelmente guiados pela atividade do córtex pré-frontal medial. O estudo das vias que permitem a comunicação hipocampo-córtex pode ser essencial para entender a própria natureza da consolidação sistêmica e estabelecer possíveis estratégias para retardar ou inibir a generalização de memórias aversivas, um clássico alvo terapêutico de transtornos de ansiedade como o Transtorno de Estresse Pós-traumático.

## **ABSTRACT**

Systems consolidation has been described as a structural reorganization process involving the neocortical and hippocampal networks underlying memory storage and retrieval. Classically, this phenomenon seems to be time-dependent in which recent memories are hippocampal-dependent while remote memories are cortical-dependent during retrieval. This same variable, "time", is critical to memory quality in terms of precision during the expression. Memories tested some days after training are usually precise, however, extended intervals between training and testing increase the chance of generalization, in this case, neutral contextual or discrete cues, are able to trigger conditioned responses. Recently, a close relationship between systems consolidation and memory generalization was suggested, nevertheless, how these processes occurred and the synaptic pathways implicated in cortico-hippocampal communication are unknown. Here, using Contextual Fear Conditioning, we evaluated two structures, the thalamic Nucleus Reuniens (NR) and the Lateral Entorhinal Cortex (LEC) as potential regulators of systems consolidation and memory generalization. Our results showed that the activity of the NR is essential for cortical activity recovery after pre-training suppression during reactivation/reconsolidation session allowing the updating of memory engram and appropriate remote memory expression. These findings were supported by electrophysiological evidence showing that NR inhibition disrupts the induction of long term potentiation between hippocampal and Anterior Cingulate Cortex pathways. On the other hand, the LEC has a window plasticity

opportunity after learning (3 days) that guides the future quality of memory expression. Inhibition of LEC on day 3 after training maintain memory precision while control group express generalized memory. This effects was mediated by signaling involving NR2B-containing NMDA , calcineurin and CP-AMPA receptors. The same inhibition procedure of LEC seems to maintain hippocampal dependency. We proposed that NR and LEC control actively systems consolidation and memory generalization probably facilitating top-down control by medial prefrontal cortex. Dissection of neural pathways associated to cortico-hippocampal communication is fundamental to understand the nature of systems consolidation and potential strategies to delay or prevents fear memory generalization, a classically hallmark of anxiety disorders such as Posttraumatic Stress Disorder.

## SUMÁRIO

**Dedicatória**

**Agradecimentos**

**Resumo**

**Abstract**

**Índice de Figuras**

**Lista de Abreviaturas**

<b>1.Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Consolidação sináptica e sistêmica como processos paralelos na estabilização de memórias de longa duração.....</b>	<b>5</b>
<b>3.Princípios e teorias da consolidação sistêmica: o hipocampo como repositório temporal da memória.....</b>	<b>11</b>
<b>4.Os caminhos entre hipocampo e córtex: vias diretas e indiretas entre ambas as estruturas.....</b>	<b>16</b>
4.1 O córtex Entorrinal: A via principal de entrada e saída de informação	

hipocampal.....	17
4.1.1 Funções mnemônicas do córtex entorrinal.....	20
4.2 O núcleo talâmico reuniens como mediador da comunicação córtex hipocampo.....	25
4.2.1 O núcleo reuniens na formação e manutenção de memórias de longa duração.....	28
4.3 Relação anatômica e funcional do córtex entorrinal e o núcleo reuniens.....	30
<b>5. Conceitos e evidencia experimental em torno á generalização da memória.....</b>	<b>31</b>
5.1 Consolidação sistêmica e generalização: duas caras da mesma moeda ou fenômenos independentes?.....	39
5.2 Limites entre a generalização adaptativa e patológica: Generalização por trás dos transtornos de ansiedade.....	41
5.3 O papel do Córtex Entorrinal na generalização da memória.....	44
5.4 O papel do Núcleo Reuniens na generalização da memória.....	45
<b>6. Hipótese de Trabalho.....</b>	<b>46</b>
<b>7. Objetivo Geral.....</b>	<b>47</b>
<b>8. Objetivos Específicos.....</b>	<b>47</b>
<b>9. Resultados.....</b>	<b>49</b>

8.1Artigo 1.....	49
8.2.Artigo 2.....	50
<b>10. Discussão Geral .....</b>	<b>90</b>
<b>11. Direções Futuras.....</b>	<b>113</b>
<b>12. Referências da introdução e discussão general.....</b>	<b>114</b>
<b>13. Anexos.....</b>	<b>138</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 4.1</b> Resumo das principais aferências do Córtex Entorrinal.....	<b>18</b>
<b>Figura 4.2</b> Resumo das principais eferências do Córtex Entorrinal.....	<b>19</b>
<b>Figura 4.3</b> Modelo mostrando as principais vias de comunicação entre hipocampo e Córtex Pré-frontal Medial por meio do Núcleo Reuniens.....	<b>27</b>

### DISCUSSÃO GERAL

<b>Figura 9.1</b> Modelo de Consolidação Sistêmica proposto por Frankland e Bontempi em 2005.....	<b>111</b>
<b>Figura 9.2</b> Atualização do modelo Consolidação Sistêmica de Frankland e Bontempi incluindo o Núcleo Reuniens e o Córtex Entorrinal Lateral.....	<b>111</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Antagonista do receptor AMPA/Cainato (**CNQX**)

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

Calcineurina (**CaN**)

Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (**LVGCC**, conforme expressão em inglês)

Cinase cálcio-calmodulina tipo II (**CAMK II**, conforme expressão em inglês)

Condicionamento Aversivo ao Contexto (**CAC**, da expressão CFC em inglês)

Corno de Amon 1, região hipocampal (**CA1**)

Corno de Amon 3, região hipocampal (**CA3**)

Córtex Entorrinal (**CE**)

Córtex Entorrinal Lateral (**CEL**)

Córtex Entorrinal Medial (**CEM**)

Córtex Cingulado Anterior (**CCA**)

Córtex Pré-frontal Medial (**CPFm**)

Córtex Pré-frontal Ventromedial (**CPFvm**)

Depressão de Longa Duração (**DLD**)

Esquiva Inibitória (**EI**)

Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo (**BDNF**)

Fator de Transcrição Zif 268 (**Zif 268**)

Fator de Transcrição c-fos (**c-fos**)

Inibidor dos receptores ampa permeantes a Cálcio ou CP-AMPA (**NASPM**)

Inibidor da Calcineurina (**FK-506**)

Labirinto Aquático de Morris (**LAM**)

Modelo dos Múltiplos Traços (**MMT**)

Núcleo Reuniens (**NR**)

Núcleo Romboide (**ROM**)

Potenciação de Longa Duração (**PLD**)

Proteína cinase A (**PKA**)

Proteínas cinases associadas Shank e Guanilato (**GKAP**, conforme expressão em inglês)

Proteínas cinases ativados por mitógenos (**MAPK**, conforme expressão em inglês)

Proteína cinase dependente de AMPc (**PKA**, conforme expressão em inglês)

Proteína cinase dependente de cálcio (**PKC**, conforme expressão em inglês)

Proteína cinase dependente de GMPc (**PKG**, conforme expressão em inglês)

Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (**CREB**, conforme expressão em inglês)

Receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (**AMPA**, conforme expressão em inglês)

Receptor N-metil-D-aspartato (**NMDA**)

Receptores NMDA contendo a subunidade NR2B (**NR2B**)

Receptor AMPA permeável ao cálcio (**CP-AMPA**, conforme expressão em inglês)

Receptor GABA tipo A (**GABA-A**)

Receptor GABA tipo B (**GABA-B**)

*Sharp-wave ripples (SPWRs, conforme expressão em inglês)*

Subunidade GluA2 do receptor AMPA (**GluA2**)

Transtorno de Ansiedade Generalizada (**TAG**)

Transtorno de Estresse Pós-traumático (**TEPT**)

Transtorno de Pânico (**PAC**)

## 1. INTRODUÇÃO

Sem dúvida somos aquilo que lembramos (Izquierdo I, 2011). A nossa capacidade de reter informações e construir uma história de vida definem a nossa personalidade e a forma na qual interagimos com o entorno. Atualmente é bem aceito que o processo de aquisição de novas informações envolve um processo gradativo e não instantâneo (Dudai., 2004). Como função cognitiva necessária para a sobrevivência, a memória demonstra uma grande flexibilidade, de fato, pontos críticos podem ser identificados que determinam se uma nova informação será persistente e acessível ao longo do tempo ou, pelo contrário, não deixará registro algum no futuro imediato, as vezes tão imediato como segundos ou minutos (Izquierdo I, 2011).

Müller e Pilzecker foram os primeiros em usar o termo “consolidação” para se referir aos processos de estabilização pós-aprendizado que poderiam determinar a acessibilidade futura a novas informações (McGaugh, 2000). Mais de 40 experimentos realizados entre 1882 e 1900 permitiram demonstrar que informações recém-adquiridas são susceptíveis a interferências externas que influenciam tanto o conteúdo como a persistência da memória. No entanto, e como mencionado anteriormente, esse período de vulnerabilidade está limitado a uma janela temporal, isto é, a interferência é tempo dependente e quando aplicada algumas horas depois do aprendizado perde a capacidade de influenciar as novas informações. Incrivelmente, a evidência experimental do processo de consolidação da memória oferecida por Müller e Pilzecker foi ignorada até o ano 1949 onde estudos em roedores apoiaram as conclusões dos pesquisadores alemães. De fato, a administração de

um choque eletroconvulsivo logo após o aprendizado gerava uma profunda amnésia anterógrada nos animais (Duncan., 1949). Essa base experimental concomitante com as hipóteses de Donald Hebb sobre a teoria de duplo-traço de memórias de curta e longa duração foi um gatilho para que nos anos subsequentes um esforço para construir uma firme “teoria da consolidação” fosse evidente (Dudai., 2012).

Anos de pesquisa, em particular provenientes da farmacologia e neurofarmacologia do comportamento, permitiram refinar essas observações iniciais dando lugar ao termo “consolidação sináptica” (McGaugh, 2000). Dessa vez, as simples descrições comportamentais se transformaram em estruturas encefálicas, redes neuronais, sistemas de neurotransmissores, cascatas de sinalização e processos de transcrição/tradução de proteínas essenciais para a formação da memória (Izquierdo et al., 2006).

Dentro as estruturas, o hipocampo ganhou destaque como centro para o processamento de memórias explícitas, principalmente aquelas ricas em conteúdo espacial/contextual (Squire and Alvarez., 1995). Provavelmente, o caso clínico mais conhecido da história da neurociência envolvendo estruturas hipocámpais e parahipocámpais é do paciente Henry Molaison, melhor conhecido como H.M. Com uma história de crises epiléticas recorrentes que começaram com 10 anos de idade, o paciente H.M foi submetido a uma cirurgia conduzida pelo neurocirurgião William Beecher Scoville como última opção para o tratamento da doença. O procedimento que envolvia a remoção bilateral do lobo temporal medial, onde se encontra entre outras estruturas o hipocampo, conseguiu diminuir as crises epiléticas, no entanto os efeitos colaterais do procedimento foram ainda mais devastadores que a própria doença. O paciente H.M se tornou incapaz de armazenar novas informações

(amnesia anterógrada) ao mesmo tempo em que mostrou uma deterioração significativa de memórias de eventos antes da cirurgia (amnesia retrograda). Um dos aspectos mais interessantes do quadro amnésico do paciente H.M era a janela temporal de perda de informações. A amnesia retrograda de H.M parecia ser marcante para memórias que foram adquiridas perto da cirurgia enquanto que aquelas mais distantes, como memórias da infância pareciam preservadas (Squire and Wixted., 2011).

Brenda Milner, na época estudante de doutorado de Donald Hebb, dedicaria cinco décadas de estudo ao caso H.M. Em efeito, experimentos e testes realizados ao longo da vida de H.M permitiram posicionar o hipocampo como estrutura chave na formação e manutenção de memórias episódicas. Ao mesmo tempo, a capacidade conservada de H.M para reter informações procedimentais permitiria a primeira divisão de sistemas de memória paralelos que poderiam armazenar informações de diferentes natureza (Squire and Wixted., 2011). Mas por trás da capacidade de lembrar memórias antigas de H.M existia uma pergunta aberta: onde são armazenadas essas memórias se o hipocampo foi lesionado?

Um sistema com a capacidade de armazenar informações remotas que funcionasse na ausência do hipocampo significava que tal estrutura seria somente um repositório temporal da memória. Enquanto a memória fosse recente, o hipocampo seria fundamental para permitir sua evocação, mas ao longo do tempo seriam outras estruturas as responsáveis por essa função. Essa hipótese daria surgimento ao termo “consolidação sistêmica”. O psicólogo francês Ribot foi o primeiro a sugerir que as memórias poderiam ser reorganizadas com o tempo. De fato, a conhecida “Lei de Ribot” descreve achados experimentais que demonstravam o gradiente temporal dos quadros amnésicos, onde lesões

teriam um efeito maior em informações adquiridas perto do evento enquanto as informações adquiridas longe seriam melhor preservada.

A consolidação sistêmica envolve a participação de estruturas corticais que seriam o repositório final de memórias inicialmente dependentes do hipocampo. Como será mostrado ao longo deste texto, o processo implica uma comunicação direta e indireta entre ambas as estruturas que permite por meio de um processo lento que memórias sejam evocadas na ausência de atividade hipocampal.

A consolidação sistêmica não somente significa a reorganização estrutural para a conservação de memórias, também uma transformação na qualidade da informação armazenada. Especificamente, memórias dependentes do hipocampo se mostram precisas, ricas em detalhes, enquanto memórias dependentes do córtex parecem ser semantizadas, onde uma ideia geral sem detalhes constitui o traço recuperado. Contudo, e em comparação com a consolidação sináptica, a consolidação sistêmica ainda não foi totalmente caracterizada anatômica e celularmente.

Como se comunicam o hipocampo e o córtex para permitir essa transformação ao longo do tempo? Quais são os processos moleculares associados com tal processo? Quais são as consequências de armazenar memórias semantizadas? São diferentes de memórias detalhadas? No caso de eventos emocionalmente aversivos, poderia a consolidação sistêmica participar de alguma maneira na fisiopatologia de transtornos de ansiedade?

Essas e outras perguntas são o fio condutor desse texto que resume experimentos realizados nos últimos 5 anos no “Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação” que buscam caracterizar o processo da consolidação sistêmica, um objetivo que começaria 2 décadas

atrás por integrantes do nosso laboratório, inclusive, muito antes do próprio termo surgir.

## **2. CONSOLIDAÇÃO SINÁPTICA E SISTÊMICA COMO PROCESSOS PARALELOS NA ESTABILIZAÇÃO DE MEMÓRIAS DE LONGA DURAÇÃO**

A “Consolidação Sináptica” é considerada um processo rápido de mudanças moleculares que ocorrem no período imediatamente após o aprendizado e que se mantém mais ou menos durante 6 ou 8 horas (Izquierdo and Medina, 1997). Esse intervalo tem constituído uma janela de oportunidades para melhorar (McGaugh and Roozendaal., 2009), impedir (Bisaz et al., 2014) ou mudar a persistência de memórias de longa duração (Rossato et al., 2009). A consolidação sináptica se mostra dependente da ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), que permitem o influxo de  $Ca^{++}$  na célula (Collingridge et al., 1992). O receptor NMDA é complexamente regulado por co-agonistas que permitem seu funcionamento normal além da ligação do seu agonista direto glutamato ou aspartato (Cotman et al., 1988). O funcionamento normal do receptor NMDA depende da ligação conjunta da glicina e do glutamato (Albensi, 2007) junto com uma previa despolarização da membrana em torno do receptor para promover a sua ativação conduzida por receptores ionotrópicos não-NMDA como o ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) ou o receptor cainato (Isaac et al., 1999). Essa previa despolarização permite que o íon  $Mg^{++}$  saia do canal, que em condições normais obstruir a entrada de cálcio extracelular (Liu and Zhang, 2000).

O influxo de cálcio pelo receptor NMDA modula sinalizações intracelulares que tem por objetivo ativar cinases dependentes de cálcio como a proteína cinase dependente de cálcio

(PKC e PKA) (Rosenegger and Lukowiak, 2010) e a cálcio-calmodulina cinase tipo II (CAMK II) (Wayman et al., 2011). A principal função dessas cinases é fosforilar diversos tipos de receptores e fatores de transcrição que podem aumentar a densidade de receptores na membrana sináptica (por exemplo promovendo exocitose e endocitose de receptores AMPA) e induzir a sinalização para a síntese de novas proteínas. De fato, a inibição de síntese de proteína tem constituído umas das principais ferramentas para descrever mudanças moleculares produto da experiência (Kida et al., 2002). Novas proteínas após o aprendizado tem um numero amplo de funções, entre elas: a incorporação de receptores de membrana, aumento de proteínas de ancoramento, produção de fatores de crescimento como o BDNF e remodelação de espinhos dendriticos (Luine and Frankfurt., 2013) . Em conjunto, a fase final da consolidação sináptica permite a formação de um traço físico promovido pelo aprendizado onde novas conexões são formadas e as já existentes reestruturadas (Dudai., 2004).

Esses processos inicialmente ocorrem localmente, isto é, são processos celulares em determinadas estruturas que serão o início para o estabelecimento de novas conexões sinápticas e formação de redes neuronais que envolvem mudanças no nível sistêmico. Neste ponto a “consolidação sistêmica” aparece como um processo subsequente á consolidação sináptica que tem por objetivo a manutenção e transformação da memória ao longo prazo. No entanto, estudos em roedores tem mostrado que na verdade a consolidação sistêmica inicia durante o próprio processo de aprendizado. Lesburguères e Bontempi (2011), usando uma tarefa de transmissão social de preferencia, encontraram que durante o aprendizado o córtex começa um processo de marcação em estruturas responsáveis pela futura recuperação daquela memória, isto é, aquelas que serão necessárias após a consolidação

sistêmica. Esse processo se mostrou dependente do funcionamento normal de receptores NMDA, aumento do marcador sinaptofisina e marcadores epigenéticos que permitem uma progressiva transformação de memórias hipocampo dependentes a córtex dependentes. Esses achados concordam com resultados posteriores mostrando que o aprendizado desencadeia a atividade de fatores de transcrição que aumentam o tamanho das zonas ativas em membranas pós-sinápticas e número de vesículas pré-sináptica no córtex prefrontal medial (CPFm), processo que evidencia um provável processo de aumento na eficácia sináptica em estruturas corticais produto de novos aprendizados (Bero et al., 2014). Adicionalmente, Einarsson e colaboradores (2012) já tinham mostrado que a inibição de síntese de proteínas no córtex cingulado anterior (CCA) após o treino no Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) pode prejudicar a consolidação sináptica da memória.

É importante salientar que mesmo antes do próprio uso do termo consolidação sistêmica, estudos conseguiram mostrar que estruturas corticais poderiam ser ativadas durante o próprio processo de consolidação sináptica. Izquierdo e colaboradores (1997) mostraram que uma atividade em sequência entre diferentes estruturas era essencial para a consolidação da memória na esQUIVA inibitória. Usando a infusão bilateral do antagonista de receptores NMDA, AP-5, ou do agonista GABAérgico, muscimol, uma profunda amnésia anterógrada foi evidenciada quando os fármacos foram infundidos imediatamente após o treino na amígdala e no hipocampo dorsal. O mesmo efeito só foi atingido no córtex entorrinal e parietal quando administrados 180 min após o aprendizado. Adicionalmente um significativo recrutamento de estruturas corticais também foi mostrado na evocação da memória independente do dia de teste. Quando o antagonista de receptores AMPA, CNQX, foi administrado pré-teste, o tratamento consegue prejudicar a evocação na amígdala e no

hipocampo dorsal 24 h após o treino. Por outro lado, no córtex entorrinal, o CNQX se mostrou efetivo tanto 24 após como 31 dias após o aprendizado. Já o córtex parietal parece essencial em todos os tempos avaliados, 24h, 31 e 61 dias após o treino. Esses achados, que podem ser considerados uma das primeiras evidências da consolidação sistêmica, mostram que a consolidação sináptica envolve a atividade de um grande número de estruturas responsáveis pela formação da memória e sua progressiva transformação ao longo do tempo. Provavelmente o resultado mais interessante para a finalidade desse texto, seja o papel do córtex entorrinal tanto na evocação de memórias recentes (24h) como remotas (31 dias) e a atividade sustentada do córtex parietal concomitante com o menor envolvimento do hipocampo na evocação ao longo do tempo.

Adicionalmente, o conceito clássico de consolidação sistêmica como um processo progressivo tem sido questionado por evidências mostrando uma rápida consolidação sistêmica na presença de “esquemas”. O esquema pode ser definido como estruturas de conhecimento prévio no qual novas informações adquiridas podem ser incorporadas quando possuem regras parecidas (Bartlett, 1932). Tse e colaboradores (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). O animal era informado do local onde poderia encontrar o reforço pela exposição previa a um cheiro com o qual o buraco do campo aberto foi impregnado. Desta forma, os animais deviam construir uma representação espacial da localização de cada buraco e o cheiro associado com ele. Nesta tarefa, o hipocampo se mostrou essencial para o aprendizado da associação entre a localização do buraco e o cheiro que o representava, no entanto, quando novas associações eram apresentadas e o animal simplesmente devia

modificar a representação contextual existente com pequenas variações, por exemplo, um local associado com um novo cheiro, o hipocampo era necessário durante uma janela de aproximadamente 3 horas. Inibições farmacológicas após esse tempo eram insuficientes para afetar novas associações. Esses resultados confirmam que 1) aprendizados prévios podem modificar o processamento de aprendizados subsequentes e 2) a consolidação sistêmica é um processo flexível que vai muito além de uma passiva reorganização dependente do tempo.

Wartman e Holahan (2014) mostraram que animais treinados em duas tarefas dependentes do hipocampo, o labirinto aquático de Morris seguido pelo labirinto radial, expressam um padrão precoce de expressão de c-fos no CCA, uma estrutura previamente mostrada como fundamental na recuperação de memórias remotas (Frankland et al., 2004; Haubrich et al., 2016). 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 ou a aprendizados subsequentes de diferente natureza (dependentes e não dependentes do hipocampo).

Experimentos adicionais utilizando o CAC, mostraram que outros fatores como a intensidade do treino (Pedraza et al., 2016) e a história de aprendizados aversivos prévios do animal (Pedraza et al., 2017) modificam a velocidade na qual ocorre a consolidação sistêmica.

Esse processo paralelo entre consolidação sináptica e sistêmica emergiu também de análises eletrofisiológicas avaliando a atividade sincrônica entre hipocampo e córtex logo após o aprendizado. Estudos sugerem que o hipocampo codifica novas informações

sensoriais predominantemente durante oscilações do tipo teta (4-8 Hz) (Düze et al., 2010), Em períodos “off-line” como em estado de repouso ou durante o sono a atividade sincrônica entre hipocampo e córtex pode constituir o mecanismo por trás do progressivo fortalecimento de estruturas corticais e independência hipocampal durante a evocação (Sara., 2010). Em particular, durante o sono de ondas lentas (Hz), uma atividade tem despertado o interesse da comunidade científica, as chamadas de “*sharp-wave ripples*” (SPWRs) ( ~180 Hz). As SPWRs são curtas flutuações no potencial de campo hipocampal caracterizadas por uma alta frequência e baixa amplitude (Born., 2010). Essas rápidas oscilações podem representar atividades que ocorreram durante experiências de aprendizado. Células de lugar no hipocampo, ativas durante a codificação de informações contextuais, são reativadas novamente durante as SPWRs mas em escalas reduzidas de tempo (Inostroza and Born., 2013). Durante as SPWRs o potencial de campo no neocórtex oscila entre 0.1-4Hz, essa baixa oscilação parece ser associada com flutuações de diferentes populações neuronais que alternam entre elevados estados de atividade (up-states) e períodos de praticamente total silenciamento (down-states) (Born et al., 2006). A indução experimental de baixas frequências no córtex por meio de estimulação magnética transcraniana melhora a consolidação da memória (Bellesi et al., 2014) mostrando que baixas oscilações no córtex são essenciais para esse processo. Assim como no hipocampo, o córtex possui ao longo das ondas lentas rápidas flutuações de alta frequência (12-15Hz) chamadas de “spindles”(Dudai et al., 2015). Ambos os fenômenos, SPWRs no hipocampo e spindles no córtex ocorrem concomitantemente. A inibição seletiva de uma dessas atividades pode prejudicar a consolidação de memórias espaciais (Girardeau et al., 2009). O efeito pode ser atingido por meio da manipulação logo após o aprendizado apontando mais

uma evidência do precoce envolvimento da interação hipocampo-córtex para a estabilização de novas informações.

Mesmo com uma sólida evidência experimental da importância em paralelo do hipocampo como o córtex na formação da memória, quando o foco é voltado para a evocação podemos encontrar uma dissociação. Como será mostrando na seguinte sessão, o fato de múltiplas estruturas estarem envolvidas na inicial codificação de novas informações, não necessariamente implica que as mesmas estruturas participarão da recuperação dessas informações ou todas serão importantes no mesmo momento. Essas observações seriam essenciais para propor o hipocampo como um repositório temporal da memória, provavelmente limitado pelas suas próprias prosperidades físicas.

### **3. PRINCÍPIOS E TEORIAS DA CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA: O HIPOCAMPO COMO REPOSITÓRIO TEMPORAL DA MEMÓRIA**

As origens da ideia do hipocampo como uma estrutura temporária no armazenamento da memória provêm das primeiras teorias computacionais do processamento no sistema nervoso. David Marr, um dos pioneiros na abordagem matemática da neurociência publicaria em 1971 o artigo “Simple memory: a theory of archicortex”, nele Marr mistura modelos de aprendizagem associativo (Willshaw et al., 1969) e competitivo (Grossberg 1973) para explicar como eventos podem ser armazenados em populações neuronais específicas interligadas em diferentes níveis ou camadas. Cada um desses níveis pode responder seletivamente a diferentes estímulos. A atividade de só um grupo de células pode ser suficiente para disparar a reconstrução completa de um traço, tomando em consideração

que grupos celulares ou camadas estão influenciados entre si. Nesse contexto, Marr propõe que a função das células piramidais do neocórtex é organizar, classificar e descartar informação entrante no sistema com a finalidade de refinar aquilo que será armazenado ao longo prazo na memória (Marr 1970). Por outro lado, o hipocampo e o neocórtex seriam estruturas em constante retroalimentação permitindo que a memória seja representada pela atividade conjunta de células em ambas as estruturas. No modelo, o neocórtex seria o repositório final da memória e o hipocampo uma estrutura auxiliar com capacidade temporal, mas fundamental para permitir uma hierarquia entre as distintas camadas, tarefa que seria insuficiente só com a capacidade computacional do neocórtex. Adicionalmente, Marr propõe que o principal momento para o armazenamento temporal da memória no neocortex seria durante a noite, onde o limitado processamento sensorial facilitaria essa função (Willshaw et al., 2015). Contudo, o modelo de Marr tem sido revisado e provavelmente não constitui o melhor modelo computacional para explicar a capacidade limitada de armazenamento de memórias e do processamento hipocampal, principalmente à luz de evidências atuais em torno da anatomia e fisiologia da relação hipocampo-córtex (Willshaw et al., 1990).

Essas primeiras aproximações da neurociência computacional seriam a base das principais teorias ao redor da consolidação sistêmica. Em efeito, o Modelo *Standard* da Consolidação Sistêmica (SCM; Standard Consolidation Model) se baseia na ideia de Marr que experiências de aprendizado podem ser codificadas de forma paralela em circuitos do hipocampo e córtex. Adicionalmente, por meio de um processo de reativação de circuitos entre hipocampo e córtex, circuitos cortico-corticais seriam fortalecidos ao longo do tempo concomitante com o enfraquecimento do registro hipocampal, levando a que o traço de

memória fosse principalmente resgatado durante a evocação por estruturas corticais. O modelo também propõe que uma vez a memória foi corticalizada, o hipocampo deve ser submetido a um processo de inibição ativa, provavelmente controlada pelo CPFm. Tal inibição teria o papel de evitar a codificação redundante de informação. Por meio de vias diretas ou indiretas o CPFm poderia evitar que o hipocampo fosse engatilhado durante a exposição a informações sensoriais com um prévio registro na memória, por sua vez, isso permitiria que aquele registro antigo fosse ativado para permitir a evocação de algum tipo de informação associada. Quando a informação sensorial entrante não é capaz de ativar um prévio registro, o hipocampo seria liberado na inibição ativa do pré-frontal permitindo a codificação de novas informações (Frankland and Bontempi, 2005), um papel parecido ao proposto por Marr em 1971 na seleção e classificação de informações pelo córtex. Um estudo recente mostrou 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 (Rajasehupathy et al., 2015). Como será mostrado na seção **“Os caminhos entre hipocampo e córtex: vias diretas e indiretas entre ambas as estruturas”** a comunicação entre hipocampo e córtex envolve várias opções para mediar tal processo de inibição, no entanto até o momento não existe uma evidencia clara de como e quando essas conexões anatômicas participariam da consolidação sistêmica e se efetivamente controlam a atividade hipocampal durante a codificação da memória.

O modelo *Standard* sugere uma independência total do hipocampo após a consolidação sistêmica que, por sua vez, seria para todo tipo de memória, em contraposição, outra teoria, a de “Múltiplos Traços” (MTT; Multiple Trace Theory), contempla que lesões bilaterais

completas do hipocampo podem gerar um quadro amnésico com gradiente temporal que vai prejudicar por igual memórias episódicas recentes e remotas, no entanto as memórias semânticas seriam conservadas (Nadel and Moscovitch 1997). Essas conclusões surgem de evidências clínicas mostrando que o hipocampo é recrutado durante a evocação de memórias remotas episódicas/autobiográficas (Nadel et al., 2000; Moscovitch et al., 2005) enquanto memórias semânticas parecem prescindir dessa estrutura (Rosenbaum et al., 2001). Dessa forma a teoria de Múltiplos Traços se afasta da ideia de repositório temporal do hipocampo para propor um papel de “repositório seletivo” onde independente da idade da memória, informações contextuais continuariam precisando dessa estrutura para serem recuperadas.

Em roedores, Goshen e colaboradores (2011) mostraram que a inibição optogenética de células piramidais da região CA1 do hipocampo 4 semanas depois do condicionamento, prejudica a evocação do CAC. No entanto o estudo também mostrou que a persistente inibição do hipocampo antes do teste, aumenta a atividade do CCA e o efeito desaparece, possivelmente porque na ausência do hipocampo o córtex é suficiente para permitir a evocação da memória remota.

Finalmente, um terceiro modelo se concentra principalmente na natureza qualitativa da memória ao decorrer da consolidação sistêmica. O modelo chamado de “Transformação da Memória” proposto por Winocur (2007) sugere que memórias dependentes do hipocampo são caracteristicamente detalhadas enquanto memórias dependentes do córtex seriam “semantizadas” ou genéricas. Estudos em modelos animais sugerem que de fato o CCA é uma estrutura chave na evocação de memórias generalizadas no CAC (tópico melhor

explorado na secção “**Consolidação sistêmica e generalização: duas caras da mesma moeda ou fenômenos independentes?**”) (Einarsson et al., 2015; Cullen et al., 2015; Pedraza et al., 2017). Esses resultados convergem na evidencia que a mesma estrutura chave após a consolidação sistêmica (o CCA) (Frankland et al., 2004) seria também a responsável pela expressão da memória na sua forma genérica. Por outro lado, ratos que tiveram lesionado o hipocampo 28 dias depois do aprendizado mostram déficit na expressão de memórias semantizadas/generalizadas durante o CAC e uma tarefa de preferencial social condicionada (Winocur et al., 2007). Esse ultimo resultado resgata parte das hipóteses levantadas pela teoria de Múltiplos Traços onde o hipocampo continuaria sendo necessário na evocação de memórias ricas em informação contextual mesmo após a consolidação sistêmica.

De fato, evidencias atuais tem mostrado que existe uma forte relação entre dependência hipocampal e a evocação de memórias precisas ou generalizadas. Pedraza e colaboradores (2016) usando o CAC encontraram que ao longo do tempo, animais susceptíveis aos efeitos do muscimol intrahipocampal durante a evocação expressavam memórias precisas quando expostos a contextos novos, isto é, conseguiam discriminar entre o contexto treino (alto congelamento) e a exposição a novos ambientes (baixo congelamento). No entanto, quando o muscimol não tinha mais efeito os animais expressavam medo por igual em ambos os contextos. Esses resultados se mostraram dependentes tanto do tempo quanto das condições do treino. Intensidades de treino mais elevadas promoviam uma rápida independência hipocampal e generalização da memória.

Cada uma das teorias aqui mencionadas tem uma base experimental que sustentam suas

conclusões. Esse acúmulo de evidências, por vezes contraditórias, dificultam a unificação para uma teoria geral ou amplamente aceita da consolidação sistêmica. Diferentes modelos animais e evidências clínicas tem apontado em várias direções e muitas das discrepâncias são explicadas em termos de diferenças entre os modelos usados e tipos de lesão. Contudo uma possível resposta para essas diferenças seja o envolvimento de estruturas extrahipocámpais que poderiam mediar a comunicação entre hipocampo e córtex durante a consolidação sistêmica ou ter um papel direto na evocação da memória.

#### **4. OS CAMINHOS ENTRE HIPOCAMPO E CÓRTEX: VIAS DIRETAS E INDIRETAS ENTRE AMBAS AS ESTRUTURAS**

A consolidação sistêmica como um processo dependente da interação hipocampo-córtex, depende de vias que permitem a comunicação entre ambas às estruturas. Essas vias podem ser tanto monossinápticas como polissinápticas e envolver comunicação recíproca ou unidirecional. Estudos anatômicos e funcionais sugerem que ambas as estruturas, hipocampo, e em particular o CPFm, podem interagir a) diretamente e por meio de duas vias de relevo através do b) córtex entorrinal ou c) o núcleo talâmico reuniens. Mesmo que a consolidação sistêmica possa envolver estruturas corticais além do córtex CPFm (Izquierdo et al., 1997), focaremos nas estruturas dessa região pensando no seu papel crítico durante a evocação de memórias remotas (Frankland et al., 2004).

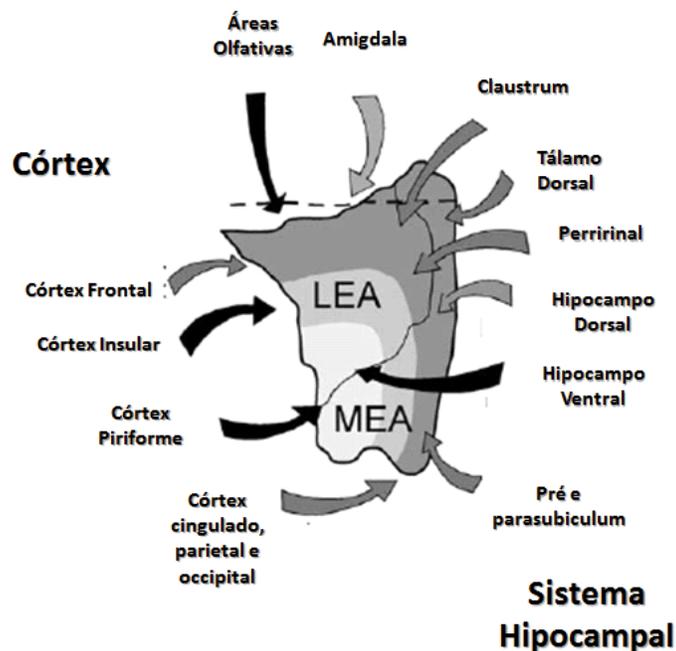
#### **4.1. O córtex Entorrinal: A via principal de entrada e saída de informação hipocampal**

O córtex entorrinal (CE) faz parte dos córtices rinais (entorrinal, perinal e posrrinal). Diferentes estudos sugerem que o CE tem densas projeções ao hipocampo (Steward, 1976; Witter and Amaral, 1991; Agster and Burwell, 2013) e funciona como uma estrutura intermediária entre hipocampo e grande número de regiões corticais (Sørensen, 1985; Agster and Burwell; 2009). As projeções que chegam ao CE podem vir diretamente do córtex como de um prévio processamento nos córtices perinal e posrrinal (Burwell, 2000; Kerr et al., 2007). Baseado no seu padrão de conectividade, o CE pode ser dividido em córtex entorrinal medial (CEM) e córtex entorrinal lateral (CEL) (Dolorfo and Amaral, 1998; Kerr et al., 2007).

As projeções do CEM e CEL ao hipocampo são originadas nas camadas II e III do córtex entorrinal (Witter, 1989). Em efeito, as projeções provenientes da camada II formam a chamada via perfurante atingindo o giro denteado e a região CA3 do hipocampo (Witter, 2007). No caso da camada III ela pode atingir diretamente neurônios da região CA1 e o subiculum formando a via temporoammonica (Witter et al., 2000). Boa parte das informações entrantes do CEM relevadas primeiro no córtex pósrrinal, são provenientes do córtex retroesplênico, parietal e áreas visuais. Por outro lado, o CEL recebe informações de córtex de associação unimodal e polimodal por meio do córtex perinal (Suzuki and Amaral, 1994).

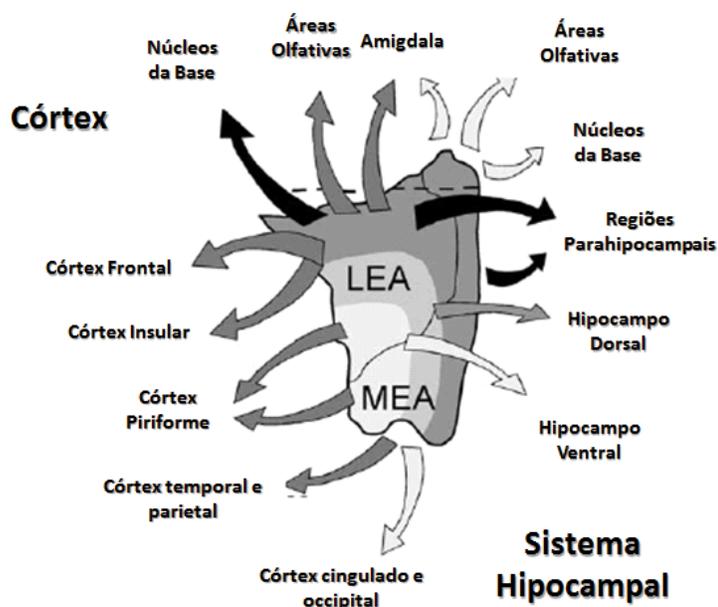
Em comparação com a detalhada descrição de vias comunicando o CE e suas subdivisões com o hipocampo, o conhecimento é menor quando se fala da relação entre CE e córtex

pré-frontal. É sabido que o CPFm recebe projeções das camadas superficiais do CE e ao mesmo tempo envia suas projeções para as camadas profundas do CE (Insausti et al., 1997; Jones and Witter, 2007). Tomando em consideração que ambos, o CEM e o CEL, são ricos em conexões com áreas de processamento sensorial, tem se sugerido que o CE é a principal via de entrada sensorial para o hipocampo e CPFm contribuindo na reconstrução de traços mnemônicos (Takehara-Nishiuchi., 2014). Contudo é importante salientar que as conexões entre o CE e suas subdivisões com o CPFm são escassas quando comparadas com outras áreas como o córtex insular e parietal. Por outro lado, são amplamente distribuídas ao longo das camadas do CE (Kerr et al., 2007). As figura 4.1 e 4.2 mostram um resumo das principais conexões do CEM e CEL com regiões corticais e subcorticais.



**Figura 4.1**

Resumo das principais aferências do Córtex Entorrinal. Observe que a força das conexões é representada pela cor da seta. Cores mais obscuras representam conexões mais fortes. (Adaptado de Kerr et al., 2007, Em: Functional Neuroanatomy of the Parahippocampal Region: The Lateral and Medial Entorhinal Areas).



**Figura 4.2**

Resumo das principais eferências do Córtex Entorrinal. Observe que a força das conexões é representada pela cor da seta. Cores mais obscuras representam conexões mais fortes. (Adaptado de Kerr et al., 2007, Em: Functional Neuroanatomy of the Parahippocampal Region: The Lateral and Medial Entorhinal Areas).

#### 4.1.1 Funções mnemônicas do córtex entorrinal

Provavelmente, umas das descobertas mais significativas entorno ao CE na formação da memória surge dos experimentos mostrando a atividade de “células de grade” (*grid cells*) na região caudal dessa estrutura (Moser et al., 2014). Estudos tem mostrado que a lesão do CE pode prejudicar a formação de memória contextuais no Labirinto Aquático de Morris (LAM), uma tarefa que precisa de informação aloccêntrica para ser realizada (Good and Honey, 1997; Oswald & Good, 2000). No entanto, outros estudos não conseguiram replicar esses resultados, fato que foi atribuído ao tamanho das lesões (Burwell et al 2004). Por

outro lado, lesões após o treino mostraram uma dissociação entre regiões dorsolaterais e ventromediais do CE. Em efeito, lesões da região dorsolateral prejudicam a expressão da memória recente no LAM enquanto lesões ventromediais não tem efeito no desempenho (Steffenach et al., 2005). Adicionalmente se lesões envolvendo tanto o CEM como CEL são realizadas 6 semanas após o treino, a evocação da mesma tarefa pode ser afetada (Cho and Kesner, 1996). Esse envolvimento do CE em memórias recentes e remotas sugerem que tal estrutura pode ser um regulador ativo e constante da evocação da memória (no entanto veja Quillfeldt et al., 1997). De fato, Remondes e Schuman (2004) mostraram que a evocação de memória remota poderia ser regulada pela via temporoammonica, no entanto a lesão dessa via não teve efeito durante a evocação da memória recentes no LAM. Lesões com um comprometimento maior do CEM parecem afetar significativamente o processamento e navegação espacial quando comparado com lesões do CEL (Morrisey and Takehara-Nishiuchi., 2014) que por sua vez parece influenciar a estratégia usada pelos animais durante o treino no LAM ( comportamento de busca guiado por dicas interiores ou exteriores do labirinto) (Oswald & Good, 2000), mostrando o CEM como fundamental para a integração sensorial e espacial do hipocampo.

Além dos resultados obtidos com o LAM, uma série de experimentos provenientes da esquiva inibitória (EI), uma tarefa envolvendo processamento emocional e contextual tem permitido estabelecer o papel, em particular do CEL, na formação, consolidação e evocação de memórias aversivas contextuais (Izquierdo et al., 2016). Ferreira e colaboradores (1992) encontraram que o antagonista de receptores NMDA, AP-5, ou do agonista de receptores GABA-A, muscimol, administrados no CEL 90 ou 180 min depois do treino da EI possuem

efeito amnésico, no entanto a administração dos mesmos fármacos imediatamente ou 360 min depois do treino não prejudicaram a memória. Imediatamente após o treino, infusões dos mesmos fármacos na amígdala e no hipocampo dorsal se mostraram amnésicos, mas não em tempos posteriores. Resultados iguais foram reportados na avaliação de memória contextual usando a habituação ao campo aberto. Por outro lado, a administração do antagonista de receptores AMPA, CNQX, conseguiu reproduzir os mesmos efeitos nos mesmos tempos (Jerusalinsky et al., 1992). Esses resultados sugeriam que o CEL é fundamental durante a consolidação sináptica tardia da EI (entre 90 e 180min após o treino). Contudo, Williner e colaboradores (1993) mostrariam que se o CEL é inibido antes do treino na EI, tratamentos geralmente amnésicos administrados 90min após o treino no CEL não tinham mais efeito, uma evidencia da plasticidade das estruturas envolvidas na formação do traço. Provavelmente, a eliminação no CEL durante o treino foi compensada por outra região para garantir uma adequada consolidação dessa memória emocional, tirando ou diminuindo o papel do CEL 90 min após o treino. Uma interpretação apoiada por evidencias mostrando múltiplos sistemas de memória que podem competir, atuar sinergicamente ou compensar a ausência de outros durante o aprendizado (Packard and Goodman., 2013).

Esses resultados durante a consolidação seriam estendidos anos mais tarde para o papel do CEL na evocação da EI. Quillfeldt et al., (1994; 1997) infundindo CNQX no CEL em diferentes dias de teste após o treino, reportaram que o CNQX tem efeito amnésico na recuperação da memória 1 e 30 dias após o treino, mas não 60 dias. Esses efeitos conseguiam ser revertidos pela concomitante administração de baixas doses de AMPA (1.0

microgramas) junto com o CNQX (Quillfeldt et al., 1994). Desses estudos algumas conclusões podem ser tiradas: 1) Como reportado em estudos no LAM, o CEL parece estar envolvido na evocação de memórias recentes e remotas, no entanto esse envolvimento parece ter um limite, que na EI seria de 60 dias após o treino. 2) Esses achados mostraram uma evidencia precoce da consolidação sistêmica tomando em consideração que estruturas como o hipocampo e a amígdala eram essenciais imediatamente após o treino e gradativamente estruturas corticais como o CE e o córtex parietal eram mais importantes para a consolidação da memória (Zanatta et al., 1996) e 3) mesmo que nesses estudos a função de estruturas do córtex pré-frontal medial associadas com a expressão da memória remota (Frankland et al., 2004; Frankland and Bontempi, 2005) não foram avaliadas, a independência do CEL na evocação 60 dias após o treino, sugere que o CE pode ser necessário enquanto conexões cortico-corticais ainda não foram totalmente estabelecidas (60 dias após o treino onde só o córtex parietal foi susceptível a interferência durante a evocação (Zanatta et al., 1996; Izquierdo et al., 1997)). Esse ultimo ponto é especulativo e futuros experimentos poderiam comprovar essa hipótese. É importante salientar que quando as mesmas manipulações e tempos foram usados após outra tarefa espacial, o reconhecimento de objetos, inibidores de síntese de proteína mostraram efeitos amnésicos na consolidação quando administrados imediatamente mas não 180 ou 360min após o treino (Lima et al., 2009), fato que leva a pensar que a natureza da memória (conteúdo emocional) também muda a forma e tempo que é recrutado o CEL durante a consolidação, de fato, alguns estudos tem mostrado evidencia indireta de que a janela de consolidação sináptica e a susceptibilidade a interferência não é igual para todo tipo de memórias contextuais (Villar et al., 2017).

Estudos posteriores mostram que vias de sinalização mediadas pela PKA são essenciais no CEL para a consolidação da EI, principalmente entre 3 e 6h após o treino (Pereira et al., 2001; Izquierdo et al., 2006) e a evocação da memória 24h após o treino (Barros et al., 2000). Novamente, a atividade de cinases no hipocampo, amígdala, CE e córtex parietal seguiram um padrão sequencial corroborando o envolvimento gradativo dessas estruturas ao longo da consolidação sináptica (Izquierdo et al., 2006). Também na EI, Bevilaqua e colaboradores (2005) encontraram que a inibição de receptores NMDA, CAMKII ou inibição de síntese de proteínas pode prejudicar a formação da memória de extinção quando administrados no CEL, aportando evidência adicional do envolvimento dessa estrutura na atenuação de memórias aversivas.

Tem sido sugerido que o CE poderia ser um ativo regulador da formação de representações contextuais em memórias aversivas. Lesões do CE produzem uma marcada amnesia anterógrada no CAC (Maren and Fanselow, 1997), um efeito que poder ser também atingido por meio da lesão específica do CEM (Majchrzak et al., 2006). Similar aos efeitos compensatórios sugeridos no artigo de Williner e colaboradores (1993), lesões que inibem a entrada de informação sensorial por meio do CE sem afetar a formação hipocampal propriamente dita, tem mostrado que estruturas adicionais poderiam suprir as funções do CE e promover a formação de memórias contextuais (Good and Honey., 1997; Bannerman et al., 2001). Essa conclusão surge de resultados onde paradoxalmente, grandes extensões de lesão ao CE podem não ter efeito na formação do CAC (Phillips and LeDoux's., 1995).

A integração de informação contextual e emocional no CAC pode ser modulada, em parte, pelas vias que comunicam o CE com a amígdala. Ambas as subdivisões do CE recebem densas projeções dessa estrutura (Kerr et al., 2007). As células intercaladas da amígdala enviam projeções para o CE contribuindo para o processamento de estímulos nocivos como aqueles produzidos da exposição ao choque elétrico durante o condicionamento (Bienvenu et al., 2015).

Finalmente, algumas hipóteses sobre o papel do CE na consolidação sistêmica da memória têm sido levantadas. Em particular, Takehara-Nishiuchi (2014) propõe que o CE é uma estação de processamento entre o hipocampo e o córtex pré-frontal, em particular com o ACC. Nesse modelo, o CE além de permitir o processamento sensorial em ambas as estruturas, seria um regulador ativo da evocação dependendo da idade da memória. Memórias recentes seriam evocadas principalmente pela interação CE-hipocampo dorsal, enquanto as conexões CE-ACC seriam ativadas ao longo do tempo e com o decorrer da própria consolidação sistêmica. Essa hipótese parece ser apoiada por evidências eletrofisiológicas mostrando que a evocação de memórias remotas durante um condicionamento aversivo está associada com oscilações sincronizadas entre o CE e o CPFm, enquanto a sincronização teta entre hipocampo dorsal e CE diminui (Takehara-Nishiuchi, 2012). Poucos estudos em consolidação sistêmica usam tempos entre treino e teste superiores a 4 semanas. Nesta tese propomos que desenhos experimentais ampliando esse intervalo (como no caso de Quillfeldt et al., 1994) poderiam mostrar se o papel regulador acima proposto pode se manter ao longo do tempo independente da idade da memória. Hipotetizamos que tal papel regulador tem uma relação direta com o

fortalecimento de conexões cortico-corticais, no caso, a maturação de tais conexões no córtex poderia dispensar o relevo de informações pelo CE durante a evocação de memórias remotas.

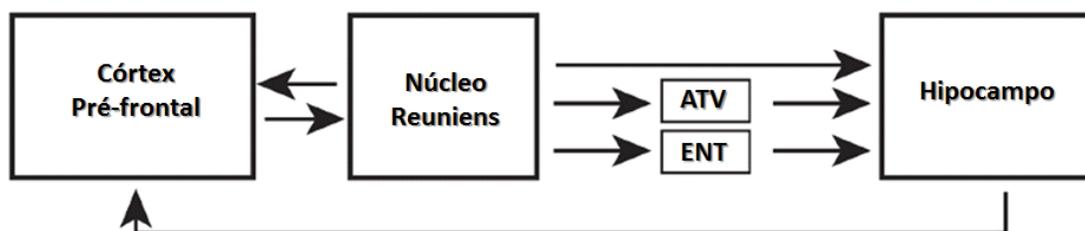
#### **4.2. O núcleo talâmico reuniens como mediador da comunicação córtex-hipocampo**

Um núcleo da região ventromedial do tálamo chamado de Núcleo Reuniens (NR) é a maior fonte de inputs talâmicos ao hipocampo (Herkenham, 1978; Wouterlood et al., 1990). Anatomicamente, o RE se encontra acima do terceiro ventrículo e se estende rostro-caudalmente ao longo do tálamo, tendo na sua periferia outro núcleo, o núcleo romboide (ROB) que mesmo muito relacionado ao NR possui conexões diferentes com outras estruturas (Bokor et al., 2002). Os axônios que saem do NR e se dirigem a região CA1 do hipocampo e subiculum (mas não para giro denteado e CA3) são principalmente glutamatergicos, de fato, a estimulação do NR produz uma marcada excitação em CA1 (Dolleman-Van der Weel et al., 1997).

Provavelmente, uma das características anatômicas mais importante do NR são suas conexões bidirecionais com o hipocampo e córtex pré-frontal. Em efeito, o CCA, o córtex prélimbico, córtex infralimbico e córtex agranular medial enviam projeções ao NR (Vertes., 2002). Por sua vez, o NR e ROB projetam de volta a todas as subdivisões do CPFm (Vertes., 2006). O NR parece ser um sistema de integração específico para a informação proveniente do CPFm ao hipocampo. Estudos misturando traçadores

enterogrados e retrógrados tem mostrado que estruturas como o córtex prefrontal podem projetar ao RE e núcleos talâmicos adicionais, no entanto, o NR é o único núcleo que projeta a CA1 (Vertes., 2007). As projeções do NR são mais robustas em direção ao hipocampo ventral que ao dorsal. Por outro lado, a região rostral do NR projeta principalmente ao hipocampo enquanto a caudal ao CPFm. Adicionalmente uma porcentagem baixa (3-9%) dos neurônios no NR projetam tanto ao hipocampo quanto ao CPFm por meio de axônios colaterais (Hoover and Vertes., 2012). Finalmente, alguns axônios do subiculum (~1%) podem projetar por um mecanismo similar a ambos, o NR e o CPFm (Varela et al., 2013). Estudos anatômicos sugerem que o CPFm recebe inputs diretos somente do hipocampo ventral (Swanson, 1981; Thierry et al., 2000), nesse caso o hipocampo dorsal precisaria de vias polisinápticas mediadas pelo NR ou o próprio CE para atingir o córtex. Mesmo com evidências recentes de vias monosinápticas entre ACC e CA1 por meio de CA3 (Rajasehupathy et al., 2015), o NR se mostra como a principal via de comunicação entre o córtex e hipocampo dorsal, interação que como serão mostradas a seguir, facilita diferentes funções mnemônicas que precisam o trabalho conjunto de ambas as estruturas.

Em comparação com o NR, o ROB não tem conexões tão robustas com todas as subdivisões do CPFm, mas mostra densas projeções ao núcleo acumbens, septum lateral, amígdala e com regiões parahipocámpais (Vertes., 2006). Estudos envolvendo lesão tem mostrado dificuldade em estabelecer funções diferentes para o NR e ROB principalmente pela sua proximidade, tamanho reduzido e conexões relativamente parecidas. A figura 4.3 mostra as principais conexões entre o NR, hipocampo e CPFm e seu papel mediador entre ambas as estruturas.



**Figura 4.3**

Modelo mostrando as principais vias de comunicação entre hipocampo e Córtex Pré-frontal Medial por meio do Núcleo Reuniens. Observe que neste modelo o Córtex Entorrinal aparece como mediador da comunicação entre reuniens e hipocampo. (Adaptado de Xu and Sudhof., 2013, Em: A neural circuit for memory specificity and generalization).

#### **4.2.1. O núcleo reuniens na formação e manutenção de memórias de longa duração**

Estudos tem mostrado que a inibição do NR com tetracaína, um bloqueador canais de sódio, 5 mas não 90 e 360 após a aquisição na evitação passiva produz um efeito amnésico na evocação 24h após o treino. Por outro lado, a administração do mesmo fármaco 5min antes do teste também consegue prejudicar a evocação da memória (Davoodi et al., 2011). O modelo de esquiva passiva usado nos experimentos mencionados e a esquiva inibitória são parecidos em termos de estruturas envolvidas e forma na qual são adquiridos (Izquierdo et al., 2016). É interessante que o NR mostra um envolvimento precoce na formação da memória (5 min após o treino) enquanto a nossa outra estrutura de interesse o CE, parece ser importante somente tardiamente (60 e 90 min após o treino), essa comparação sugere

que a comunicação NR-hipocampo é essencial para a consolidação sináptica da memória e poderia ser uma via para recrutar preferencialmente o CPFm (hipocampo-NR-CPFm), mesmo antes do CE, durante e minutos depois do aprendizado. De fato, administração de inibidores de síntese de proteínas imediatamente após o treino no CCA pode prejudicar a consolidação do CAC (Einarsson and Nader, 2012), contrário ao papel de outras estruturas corticais como o córtex parietal que parecem ter um envolvimento tardio (90 e 360min após o treino na esquivia inibitória (Izquierdo et al., 1997)).

Provavelmente uma das áreas de maior estudo sobre a funcionalidade do NR tem sido seu papel na memória de trabalho. Estudos tem mostrado que a lesão permanente do complexo NR/ROB gera déficit em tarefas de memória de trabalho no labirinto radial na mesma magnitude que as verificadas após lesão hipocampal (Hembrook and Mair, 2011). Estudos subsequentes usando um labirinto em T mostraram que a inibição com muscimol do NR/ROM prejudicou a utilização de dicas intra-labirinto para a busca de um reforço. O mesmo prejuízo foi encontrado com a lesão do CPFm ou hipocampo (Hallock et al., 2013). Esses primeiros experimentos permitem concluir que a lesão ou inativação dessas áreas talâmicas influencia testes comportamentais que dependem da integridade do CPFm e o hipocampo. Em efeito, alguns dos déficits induzidos pela lesão do NR/ROB podem ser revertidos pela administração intra-CPFm ou intrahipocampal de fármacos como a fisostigmina que aumenta o tônus de colinérgico nestas estruturas (Bobal and Savage, 2015).

Mecanismos de compensação como os sugeridos pelos experimentos de Williner e colaboradores (1993) com inibição pré-treino do CE tem sido mostrado também no

NR/ROB no LAM. Animais com lesão dessa estrutura antes do treino mostraram déficit durante a evocação da memória 24h após o treino em comparação com o controle, no entanto, continuam expressando retenção da tarefa (Dolleman-van der Weel et al., 2009; Loureiro et al., 2012). Com um intervalo de 5 dias após o treino animais com lesão ou sem lesão, mas com muscimol pré-teste no NR conseguem evocar a memória normalmente. Os autores sugerem que mesmo o NR/ROB seja útil para uma adequada estratégia de busca da plataforma no LAM, não é totalmente necessário para a formação do traço de memória, permitindo que outros sistemas compensem a ausência durante o treino.

Mesmo que a lesão antes do treino ou inibição pré-testes tenham pouco influencia na expressão de memórias recentes, o resultado muda se intervalos maiores entre treino e teste são avaliados. Loureiro e colaboradores (2012) mostraram um marcado déficit na recuperação da memória remota em animais com lesão 25 dias após o treino. Esse resultado permite levantar a hipótese que o complexo NR/ROB pode ser essencial na estabilização progressiva da memória de hipocampo-dependente a cortico-dependente.

Estudos avaliando a função do NR/ROB na formação e manutenção de memórias contextuais aversivas são escassos. Carvalho-Netto e colaboradores (2010) usando um condicionamento aversivo ao contexto por meio de exposição a predador mostraram que a lesão isolada do NR não afeta a expressão contextual de medo enquanto a lesão unilateral do núcleo talâmico anteromedial (que incluía regiões do NR) prejudica a expressão da resposta. Como será discutido depois (ver seção **“O papel do Núcleo Reuniens na generalização da memória”**) o NR parece fundamental na expressão de memórias precisas no CFC.

### **4.3. Relação anatômica e funcional do córtex entorrinal e o núcleo reuniens**

Na região CA1 do hipocampo, terminais axonais provenientes do NR quanto do CE convergem em células piramidais e interneurônios no *stratum molecular lacunosum* (Dolleman-van der Weel et al. 1995; Vertes et al. 2006). Xu e Sudhof (2013) tem proposto que as conexões NR-CA1 e CE-CA1 conjuntamente podem reduzir o limiar de plasticidade sináptica em CA1 facilitando processos de consolidação da memória. Recentemente, Dolleman-van der Weel et al., (2016) mostraram que axônios provenientes do NR e CE convergem nos mesmos dendritos apicais de neurônios piramidais em CA1. Esse resultado sugere que a atividade do hipocampo pode estar sob controle de ambas vias as quais por sua vez possuem fortes conexões sinápticas com o CPFm. Contudo, como essa relação tem uma relevância na formação e manutenção de memória é desconhecida. Uma recente linha de pesquisa avaliando a possibilidade de supressão voluntária de memórias em humanos sugere que essas vias poderiam de fato controlar a evocação de memória hipocampal. Anderson e colaboradores (2016) hipotetizam que as vias CE-hipocampo ao ser uma porta de entrada sensorial ao sistema hipocampal, quando privadas, impediriam a realocação de informação suficiente para reconstruir o traço. Por outro lado, mesmo em funcionamento normal das vias CE-hipocampo, projeções provenientes do NR poderiam modular a atividade diretamente do hipocampo ou do próprio CE (vias NR-CE) que também interfeririam na recuperação do traço. Essa proposta é similar ao papel do CPFm reportada por Frankland e Bontempi (2005) onde o hipocampo poder ser inibido ativamente durante a evocação de memórias remotas para controlar a codificação de informações

redundantes. Neste sentido estabelecer se a modulação da atividade hipocampal via o CE e NR pode ser controlada pelo CPFm é um importante passo futuro.

## **5. CONCEITOS E EVIDENCIA EXPERIMENTAL EM TORNO DA GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA**

A consolidação sistêmica da memória tem sido associada ao fenômeno de generalização da memória. A generalização pode ser definida como um processo onde estímulos neutros, mas similares os envolvidos no aprendizado, podem desencadear uma resposta condicionada. A generalização é uma resposta inicialmente adaptativa que permite estender o comportamento a um número amplo de estímulos (Watson and Rayner, 1920). Na atualidade, estudos pré-clínicos tem se focado em entender a generalização por trás de memórias aversivas patológicas como aqueles presentes em Transtornos de Ansiedade como o Estresse-Pós-traumático (TEPT). É neste ponto de hipergeneralização onde uma função inicialmente adaptativa parece converter-se em disfuncional para o indivíduo (Jasnow et al., 2016). Tomando em consideração que os resultados que serão mostrados nesta tese foram realizados em memórias aversivas, centraremos a nossa atenção ao longo das próximas seções na generalização de respostas de medo e suas relações com alguns tipos de psicopatologia.

Um ponto de partida é como acontece a generalização. Em efeito, algumas teorias têm sido propostas para explicar esse fenômeno que de fato são bem próximas as próprias teorias da

consolidação sistêmica. Riccio e colaboradores (1992) propõem que a generalização é produto do “esquecimento dos atributos do estímulo”, nesse modelo, após o aprendizado e com o aumento de tempo entre treino e teste os animais esquecem as características específicas dos estímulos envolvidos durante o aprendizado, no entanto, uma essência geral do aprendizado persiste e mesmo na ausência de detalhes a memória pode ser expressa. O esquecimento dos estímulos teria como consequência que outros estímulos não relacionados conseguissem desencadear a resposta condicionada (por exemplo, um tom de uma frequência diferente ao usado durante o condicionamento poderia induzir a resposta de congelamento) e tomassem controle do comportamento (Riccio and Joynes., 2007). Estudos no CAC têm mostrado evidencia desta hipótese. Wiltgen e Silva (2007) encontraram que animais treinados no CAC e testados 1 dia depois do treino conseguem discriminar entre o contexto original e um contexto alternativo (baixos níveis de congelamento). No entanto, com aumento do intervalo entre treino e teste, os animais começam a expressar congelamento progressivamente ao contexto alternativo 14, 28 e 36 dias após o treino. Uma janela parecida usando o mesmo modelo foi reportada por Ruediger e colaboradores (2011). Quando os animais são expostos novamente ao contexto de treino com o intuito de reativar as características contextuais, é recuperada a discriminação contextual (Zhou and Riccio,1994), resultados que apoiam a interpretação do esquecimento dos estímulos. Um armazenamento dos detalhes contextuais tem sido associada classicamente ao hipocampo (Matus-Amat et al., 2004), em efeito, experimentos com ratos de 18 dias de nascidos onde neurônios do hipocampo ainda não estão totalmente funcionais, expressam uma rápida generalização da memória 24h após o treino (Anderson and Riccio, 2005).

Em nosso laboratório, tem sido mostrado um efeito parecido ao reportado por Ruediger e colaboradores (2011). As reativações periódicas por meio de exposições curtas ao contexto do treino permitem a memória se manter detalhada ao longo do tempo (menores níveis de congelamento no contexto alternativo mesmo com intervalos prolongados entre treino e teste). Além de manter os detalhes os animais continuam sensitivos ao tratamento amnésico do muscimol intrahipocampal, sugerindo que a diferença dos grupos não reativados e com uma memória generalizada, o protocolo consegue manter o envolvimento do hipocampo durante a evocação (de Oliveira Alvares et al., 2012). Estudos subsequentes permitiram estabelecer que tal fenômeno pudesse estar associado com processos de reconsolidação, um fenômeno associado com a atualização e fortalecimento de traços mnemônicos por meio de um novo processo de estabilização pós-evocação (de Oliveira Alvares et al., 2013). De forma interessante, Lee (2008) propõe que parte das funções biológicas da reconsolidação seria manter a relevância de informações armazenadas, neste contexto, as reativações seriam um indicador que a memória é importante e deve se manter o mais detalhada possível para facilitar a sua correta evocação.

O decaimento do traço hipocampal, isto é, o enfraquecimento da representação de estímulos contextuais poderia estar por trás da generalização (Hardt et al., 2013). Tal enfraquecimento pode ser modulado por uma perda do índice hipocampal. Memórias detalhadas poderiam ser recuperadas por meio do acesso cortical a representações hipocampais específicas, com o tempo esse índice poderia ser degradado gerando uma sobreposição maior de traços corticais e aumentando a susceptibilidade a interferência durante a evocação, assim promovendo a expressão de memórias generalizadas (Hardt et

al., 2013; Besnard and Sahay, 2016). Contudo, uma das grandes perguntas abertas é se realmente existe um mecanismo de “esquecimento” nesta teoria, como será visto mais para frente, algumas recentes e ainda limitadas evidências apoiam que eventos moleculares poderiam promover o decaimento do traço hipocampal.

Uma interpretação alternativa surge da hipótese de “Transformação da Memória” explicada em outra sessão (Winocur et al., 2007). A hipótese, tomando como base a própria consolidação sistêmica, sugere que memórias inicialmente dependentes do hipocampo seriam ricas em detalhes contextuais, no entanto com a transformação da memória em um traço mais estável no córtex, esses detalhes seriam perdidos e a memória só poderia ser recuperada “semantizada”. Essa visão também argumenta que o traço hipocampo pode continuar armazenado, no entanto quando a memória é remota, o córtex domina para recuperar o traço, facilitando a expressão da generalização (Winocur et al., 2009). Provavelmente essa coexistência de traços na hipótese de Winocur e colegas seja a principal diferença com o argumento da degradação/decaimento de informações dependentes do hipocampo (Rudy et al., 2005; Biedenkapp and Rudy, 2007).

Novamente, o ponto a serem questionadas ambas as teorias é como demonstrar se existe ou não degradação do traço hipocampal. Wiltgen e colaboradores (2010) mostraram que a recuperação de memória detalhada está associada com maior atividade hipocampal. Por outro lado, a inibição do CCA pode prejudicar seletivamente a expressão de memória generalizadas (Cullen et al., 2015). De igual forma, algumas manipulações podem trazer de volta o domínio hipocampal para evocar a memória depois de grandes intervalos entre

treino e teste. Por exemplo, Einarsson e colaboradores 2015 mostraram que uma breve reativação da memória remota pode tornar o hipocampo novamente susceptível a manipulações farmacológicas durante as 6h seguintes á reativação. Esses resultados sugerem que mesmo após uma memória ser expressa como generalizada, o envolvimento hipocampal pode ser recuperado ganhando controle do comportamento transitoriamente. Em conjunto esses achados parecem apoiar a ideia que um traço hipocampal detalhado é mantido ao longo do tempo, mas permanece inacessível em condições normais. Uma importante pergunta que surge aqui é se de alguma forma essa dificuldade de acesso pode ser produto de uma inibição ativa do córtex como mencionado por Frankland e Bontempi (2005). Estudos adicionais com a marcação dos genes de expressão imediata c-fos e zif 268 tem mostrado que o hipocampo é recrutado preferencialmente na evocação de memórias recentes e o CPFm durante a evocação de memória remotas, fato que ao mesmo tempo poderia indicar o estado da memória (precisa ou generalizada, ver a secção **“Consolidação sistêmica e generalização: duas caras da mesma moeda ou fenômenos independentes?”**) (Bontempi et al., 1999).

Mesmo com uma evidencia mais inclinada a apoiar a hipótese da Transformação da Memória, alguns achados recentes sugerem que mecanismos de esquecimento ativo poderiam ser identificados na generalização da memória. Hardt e colaboradores (2013) propõem que esses mecanismos devem existir não somente como estratégia óbvia para eliminação de informação redundante ou menos importante, mas também como promotores de transformação da memória ao longo do tempo. Em efeito, a hipótese levantada sugere que estados de menor interferência sensorial como o sono seriam ideais para o decaimento seletivo de informações. Por outro lado, processos de separação e integração de padrões (na

tradução livre de pattern separation e pattern completion) seriam fundamentais para definir quão susceptível pode ser a memória a interferência. No caso de memórias dependentes do hipocampo onde a separação de padrões é favorecida, a interferência seria menor, caso contrario ao que ocorreria no córtex onde existiria uma ampla sobreposição de traços e maior chance de interferência. Estudos recentes sugerem que o sono e seu característico estado de baixa interferência sensorial favorece o enfraquecimento de conexões sinápticas potenciadas durante a vigília (Diering et al., 2017; de Vivo et al., 2017).

Um mecanismo baseado na estabilidade de receptores AMPA na membrana tem sido proposto como possível mediador do decaimento de traços mnemônicos. Processos de depressão de longa duração (DLD) e depotenciação tem sido associado com a internalização de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 (Kim et al., 2002). Hardt e colaboradores (2013) sugerem que a estabilidade de tais receptores responsáveis pela manutenção da potenciação de longa duração (PLD) poderiam ser a base molecular do esquecimento. Experimentos futuros do mesmo grupo mostraram que efetivamente, o bloqueio na internalização desses receptores por meio do peptídeo GluA23Y consegue evitar o esquecimento de memórias menos emocionais como as provenientes de uma tarefa de reconhecimento de objetos, mas ao mesmo tempo consegue manter a precisão de memórias no CAC (Migues et al., 2017). Esses achados mostraram que mudanças na membrana de receptores AMPA podem promover o esquecimento de memórias menos aversivas enquanto promovem a transformação das aversivas (de precisas a generalizadas), processo que pode ser retardado quando a internalização dos GluA2 é inibida. Os resultados parecem sustentar que um mecanismo de esquecimento promove o decaimento de traços. O ponto conflitante novamente entre ambas as hipóteses, degradação do índice hipocampal e

transformação da memória, são os resultados mostrando que os detalhes da memória podem ser recuperados transitoriamente, fato que faz difícil conciliar as duas propostas. De fato, essa recuperação de detalhes em algumas circunstâncias excluiria a possibilidade que a informação seja efetivamente esquecida, mas a pergunta que ficaria seria, como detalhes não acessados podem ficar armazenados indefinidamente numa estrutura de capacidade de codificação limitada?

Finalmente a generalização é um fenômeno amplo que para os objetivos dessa tese tem sido explicado principalmente em memórias contextuais, no entanto o mesmo processo ocorre durante o condicionamento a estímulos discretos. Assim como o hipocampo tem um papel fundamental na discriminação entre contextos, a amígdala tem se mostrado como reguladora chave da discriminação entre estímulos condicionados. Em particular, animais transgênicos sem o receptor  $GABA_{1(a)}$  mostram uma generalização rápida entre estímulos de diferentes frequências que é dependente da intensidade do choque utilizado (Shaban et al., 2006). É importante salientar que os receptores  $GABA_{1(a)}$  na amígdala lateral são responsáveis pela manutenção da LTP pré-sinápticas entre sinapses cortico-amigdalinas, sugerindo que a inibição pré sináptica dessa via ajuda a manter a discriminação entre estímulos condicionados.

Por outro lado o núcleo central da amígdala parece também essencial nesse processo de discriminação. Por meio de uma tarefa de discriminação e eletrofisiologia *in vivo* Ciocchi e colaboradores (2010) mostraram que a diminuição da atividade tônica dessa estrutura promove a generalização a estímulos não associados com o estímulo incondicionado, enquanto aumento favorece a discriminação. Junto com os experimentos eletrofisiológicos,

os autores sugerem que a modulação da atividade do núcleo central é suficiente para mudar o sinal/ruído no processamento sensorial que poderia melhorar ou prejudicar a discriminação entre estímulos. Da mesma forma, a lesão do núcleo da estria terminal, anatomicamente denominado como amígdala estendida, melhora a discriminação entre estímulos (Duvarci et al., 2009).

Provavelmente uma das maiores diferenças entre generalização contextual e a outros estímulos, além do envolvimento do hipocampo na primeira, é que na generalização a estímulos discretos não existe um claro processo dependente do tempo. Em efeito, este tipo de generalização pode ser avaliado alguns dias após o treino em comparação com experimentos avaliando generalização contextual. Uma pergunta que surge é se memórias dependentes da amígdala sofrem o mesmo processo de “semantização” que ocorre em memórias contextuais. Recentemente, uma revisão da literatura aborda essa pergunta onde diferentes experimentos tem confirmado o envolvimento da amígdala durante a evocação independente do tempo, mesmo com um processo de reorganização cortical muito parecido como aquele que acontece em memórias contextuais (Bergstrom et al., 2016). O anterior poderia explicar porque a generalização de memórias a outros estímulos pode ser tão rápida onde basicamente não existe um traço em decaimento progressivo. Contudo poderíamos concluir que a generalização contextual é produto de mudanças sistêmicas enquanto a generalização a outros estímulos dependentes de amígdala são produto de fenômenos locais, principalmente em circuitos GABAérgicos (Ruediger et al., 2011).

### **5.1. Consolidação sistêmica e generalização: duas caras da mesma moeda ou**

### **fenômenos independentes?**

É a generalização de memórias contextuais uma consequência direta da consolidação sistêmica? Existe generalização contextual em memórias ainda dependentes do hipocampo? Essas duas perguntas são pertinentes à luz de evidências mostrando que nem toda forma de generalização contextual depende do tempo.

A generalização contextual parece fortemente associada com a variável sexo. Lynch e colaboradores (2013) mostraram que ao longo de 7 dias, tanto machos quanto fêmeas conseguem discriminar contextos numa tarefa de evitação passiva. No entanto, as fêmeas expressam maiores níveis de generalização no contexto alternativo a partir do dia 3 após o treino mostrando-se mais susceptíveis a generalizar respostas aversivas. Essas diferenças tem se mostrado relacionadas com hormônios masculinos e femininos. Por exemplo, a administração sistêmica, intracerebroventricular ou intrahipocampal de estradiol em fêmeas 24h antes do teste promove a generalização da memória, efeito que foi bloqueado pela administração concomitante de um antagonista do mesmo receptor (Lynch et al., 2016). O mesmo tratamento sistêmico em machos não teve o mesmo efeito e discriminação entre os contextos foi verificada (Lynch et al., 2016). Os desenhos experimentais usados em ambos os experimentos avaliam generalização somente 3 dias após o treino, mostrando que o tempo não é uma variável necessária para a expressão de generalização. Ao mesmo tempo é importante notar que tal generalização parece um efeito transitório na evocação da memória. Desafortunadamente experimentos avaliando a evocação da memória alguns dias depois o tratamento não foram feitos para avaliar essa hipótese. A administração sistêmica, intracerebroventricular ou intrahipocampal do antagonista seletivo para receptores

GABA<sub>B(1a)</sub>, CGP 36216, antes ou depois do CAC promovem a formação de memórias contextuais generalizadas, efeito que pode ser verificado 24h após o treino (Lynch et al., 2017).

Pedraza e colaboradores (2016) encontraram que a intensidade do treino, isto é, choques mais elevados durante o condicionamento, influenciam diretamente a generalização da memória. Níveis mais elevados de treinamento parecem acelerar a generalização. O mais importante é que em pontos onde a memória foi generalizada, também se mostrou independente do hipocampo, fato que foi verificado por meio da infusão intrahipocampal de muscimol antes do teste. Podemos concluir desses experimentos que a aversividade do aprendizado pode influenciar diretamente ambas, a generalização e própria consolidação sistêmica, mostrando os fenômenos como estreitamente relacionados. Estudos posteriores do mesmo grupo mostrariam que outras variáveis além do treino como os aprendizados subsequentes podem influenciar a forma em que esses processos ocorrem (Pedraza et al., 2017).

Esse grupo de resultados coloca em evidencia que: 1) não todas as formas de generalização dependem do tempo e cabe a possibilidade que generalizações precoces sejam um efeito transitório na evocação, 2) as condições do treino podem mudar quanto a generalização como a dependência hipocampal e 3) é possível já durante o treino induzir a formação de memórias generalizadas.

O trabalho de Lynch e colaboradores (2017) onde foi verificada a generalização do CAC 24h após o treino pela administração de CGP 36216 não avaliou se efetivamente essa memória é dependente do hipocampo, conseqüentemente duas possibilidades podem ser

consideradas para explicar esses resultados: 1) o hipocampo pode armazenar as memórias generalizadas quando induzidas farmacologicamente ou 2) o tratamento recruta precocemente estruturas tipicamente associadas com a expressão de memórias generalizadas como o CCA. Avaliar essas alternativas será importante em experimentos futuros.

## **5.2.Limites entre a generalização adaptativa e patológica: Generalização por trás dos transtornos de ansiedade e de estresse**

A generalização em humanos tem sido avaliada de forma muito similar que em outros animais. Desta forma, na literatura é possível encontrar modelos de generalização contextual e a estímulos condicionados. O estudo de algumas populações clínicas, principalmente diagnosticadas com algum tipo de transtorno de ansiedade tem permitido estabelecer que a generalização entre estímulos condicionados e seguros possa ser um alvo terapêutico importante (Grupe and Nitschke, 2013).

Pacientes com transtorno de ansiedade generalizada (TAG) ou transtorno de pânico (PAC) mostram uma rápida generalização entre estímulos condicionados e seguros (Lissek et al., 2014; 2010). Resultados similares têm sido encontrados em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) onde altos níveis de ansiedade podem ser desencadeados por estímulos condicionados quanto neutros (Lissek et al., 2005). Esses resultados parecem estar associados com déficit na separação de padrões, isto é, pacientes com TEPT teriam dificuldade na classificação de estímulos durante experiências sensoriais que levariam a que outros estímulos ou contextos a recuperassem a informação aversiva (Kheirbek et al.,

2012). Levy-Gigi e colaboradores (2015) encontraram que pacientes com TEPT possuem um volume hipocampal menor em comparação com pacientes saudáveis, fato que poderia estar associado com o déficit na separação de padrões, uma função classicamente associada com tal estrutura. O mesmo grupo tinha mostrado em estudos anteriores que um volume hipocampal menor em pacientes com TEPT também prejudicava a generalização de informações não aversivas, desta vez, os participantes tinham que usar estratégias já aprendidas durante uma tarefa associativa em uma experiência similar. Os resultados mostraram que pacientes com TEPT possuem um déficit marcado neste tipo de generalização quando comparados com sujeitos controle (Levy-Gigi et al., 2012). Esses resultados indicam que o menor volume hipocampal aumenta a generalização de eventos aversivos enquanto prejudica a generalização de tarefas não aversivas. Como em animais, regiões do CPFm parecem essenciais na expressão de memórias generalizadas. Em pacientes com TAG uma maior resposta generalizada a estímulos seguros foi associada com hipoativação do córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) (Greenberg et al., 2013). O mesmo resultado tem sido encontrado em pacientes com TEPT (Shin and Liberzon, 2010) onde além de uma hipergeneralização de memórias aversivas, uma menor atividade do CPFvm parece dificultar processos de extinção (Milad et al., 2005). Junto ao CPFvm, uma hipoativação do CCA nesta população clínica tem sido sugerida como responsável pela persistência de memórias traumáticas. Em efeito, estudos em neuroimagem sugerem que a atividade dessas estruturas é fundamental para o controle da amígdala, que por sua vez se mostra hiperativa em pacientes com TEPT (Rauch et al., 2006).

Por outro lado, a insula, uma estrutura associada em humanos a consciência de estados corporais internos e a regulação do sistema nervoso autônomo (Craig, 2009) tem se

mostrado hiperativada em pacientes com TAG (Greenberg et al., 2013). A insula parece ser ativada gradativamente enquanto mais parecido é o estímulo neutro ao estímulo original, no entanto parece que não existe uma relação direta entre o diagnóstico de TAG e modificações nesse gradiente (Lissek et al., 2014). Quando experimentos parecidos foram conduzidos em mulheres, a hiperatividade da insula em pacientes diagnosticadas com TEPT se mostrou relacionada com a generalização da memória aversiva (Bruce et al., 2012), resultados que podem indicar, assim como em animais (Lynch et al., 2013), que variáveis sexuais podem influenciar a resposta de generalização. Por sua vez, homens parecem ter maior vulnerabilidade a experimentar eventos traumáticos, no entanto a maior prevalência é em mulheres (Perkonig et al., 2000) junto com um curso mais crônico da patologia (Breslau et al., 1999), fatores que poderiam estar associados também com uma generalização mais rápida a estímulos neutros em mulheres.

Enquanto em modelos animais existe evidências acumuladas sobre o papel conjunto ou individual do hipocampo e do CPFm em memórias recentes e remotas, em humanos um padrão claro tem sido difícil de estabelecer. Bonnici e colaboradores (2012) mostraram que não existem estruturas específicas que respondam a evocação de memórias autobiográficas remotas ou recentes, também o hipocampo parece participar da evocação independente da idade da memória e tanto hipocampo quanto o CPFm parecem ser ativos conjuntamente em memórias recentes e remotas. É interessante que esses resultados concordam com a teoria de múltiplos traços onde o hipocampo seria essencial para qualquer informação episódica. Lesões envolvendo o CPFm (e também outras estruturas frontais) parecem prejudicar a recuperação de memórias autobiográficas remotas (Levine *et al.*, 1998; Piolino *et al.*, 2003) mas resultado similar tem sido encontrado com a lesão do hipocampo posterior (Winocur &

Moscovitch., 2011). Os estudos com lesão tem se focado na possibilidade de evocar informações recentes e remotas, mas não na sua qualidade/precisão. Experimentos avaliando falsas memórias tem mostrado que a lesão do CPFvm, uma estrutura mencionada anteriormente como hipoativa no TEPT, diminuem falsos reconhecimentos em comparação com pacientes sadios (Spalding et al., 2015). O CPFvm ao estar ausente dos pacientes com lesão diminui a possibilidade de expressão de memórias genéricas ou semantizadas que poderiam influenciar a expressão de falsas memórias. Em outro estudo, Jeye e colaboradores (2017) encontraram que a atividade do córtex pré-frontal lateral esquerdo se encontra negativamente correlacionado com a atividade hipocampal, que por sua vez correlaciona-se com a produção de falsas memórias. Os autores sugerem que essa região poderia inibir ativamente o hipocampo para evitar a recuperação dos detalhes e favorecer falsas memórias. Em conjunto, essas evidencias indicam que o CPFm tem um papel importante na produção da própria generalização, que por uma possível inibição hipocampal, poderia favorecer a expressão de informação semantizadas assim como falsas memórias. Interessantemente, essa não é a primeira vez que se sugere que generalização e falsas memórias poderiam ser eventos relacionados (ver a revisão de Jasnow et al., 2012).

### **5.3.O papel do Córtex Entorrinal na generalização da memória**

Existem poucos estudos mostrando o papel do CE em processos de generalização. Frank e colaboradores (2000) por meio de registro com tetrodos no hipocampo e no CE, mostraram que enquantocélulas da região CA1 e as camadas profundas do CE parecem mostrar atividades específicas que dependem da trajetória e posição do animal num campo aberto, somente o CE mantém o mesmo padrão de atividade mesmo quando o contexto muda. Os

autores hipotetizam que esta falta de especificidade do padrão de disparo do CE poderia favorecer a generalização de comportamentos entre contextos diferentes. Esse processo de generalização tem sido associado com a via perfurante (CE-CA3) que poderia facilitar processos de separação de padrões, no entanto dificuldade de discriminação causada por estímulos muito parecidos ou induzidos externamente (por exemplo, diminuindo a neogênese) poderia disparar a evocação de varias memórias que dependem dessas sinapses permitindo a expressão do comportamento fora do contexto de aquisição (Rolls et al., 2016).

No caso de memórias aversivas, as lesões em ambos, CEM e CEL inibem a formação de memórias precisas no CAC. Em efeito, uma rápida generalização entre contextos foi verificada 24h após o treino (Burwell., et al., 2004a; Burwell., et al., 2004b).

#### **5.4.O papel do Núcleo Reuniens na generalização da memória**

Assim como no CE, existem poucas evidencias do papel do NR na generalização de memórias aversivas. Xu e, Südhof (2013) mostraram que o CPFm controla a generalização de memórias aversivas por meio de um circuito que regula o disparo de células no NR que por sua vez projetam ao hipocampo. Os autores sugerem que esse circuito poderia modular a excitabilidade de células em CA1 facilitando seu disparo e plasticidade sináptica induzindo memórias mais detalhadas. Adicionalmente se hipotetiza que a mesma função pode ser realizada pelo CE ou conjuntamente entre CE e NR, influenciando a atividade do hipocampo. Isso poderia ser válido tanto para a aquisição (momento chave na formação de memórias precisas) como para a evocação da memória.

## **6. HIPÓTESE DE TRABALHO**

Hipotetizamos que a modulação da atividade do NR e do LEC é suficiente para modificar a consolidação sistêmica de memórias aversivas contextuais e a sua precisão.

## **7. OBJETIVO GERAL**

Considerando-se o papel anatômico e funcional do Córtex Cingulado Anterior, o Núcleo Reuniens e o Córtex Entorrinal Lateral na evocação da memória ao longo do tempo, essa tese tem por objetivo avaliar como a interação de tais estruturas medeiam o processo da consolidação sistêmica e generalização de memórias aversivas.

## **8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **7.1. Artigo 1**

7.1.1. Avaliar o papel do córtex cingulado anterior durante a aquisição do CAC na estabilidade de memórias recentes e remotas.

7.1.2. Avaliar o papel da reativação/reconsolidação da memória na estabilidade de memórias remotas quando estruturas corticais são inibidas durante a aquisição do CAC.

7.1.3. Avaliar o papel do núcleo talâmico reuniens durante a reativação/reconsolidação da memória na estabilidade de memórias remotas.

7.1.4. Avaliar por meio de eletrofisiologia em animais anestesiados o papel do núcleo talâmico reuniens na indução e manutenção de potenciação de longa duração entre vias cortico-hipocampais.

## **7.2. Artigo 2**

7.2.1 Avaliar o papel do córtex entorrinal lateral na generalização da memória quando inibido repetidamente após o CAC.

7.2.2. Avaliar se no intervalo entre a aquisição do CAC e os testes de generalização, existem momentos críticos onde a inibição da atividade do córtex entorrinal lateral poderia ser essencial para a expressão da generalização.

7.2.3. Avaliar se a inibição do córtex entorrinal lateral pode mudar a dependência hipocampal ao longo do tempo.

7.2.4. Avaliar se os efeitos da inibição do córtex entorrinal na generalização da memória podem ser reproduzidos pela inibição do hipocampo dorsal ou do córtex cingulado anterior.

7.2.5. Avaliar os mecanismos moleculares por trás do efeito da inibição do córtex entorrinal lateral na generalização da memória.

## 9. RESULTADOS

**8.1 Artigo 1:** Publicado na revista “Hippocampus” em Fevereiro de 2017. São incluídos os nossos resultados avaliando o papel do Córtex Cingulado Anterior e o Núcleo Talâmico Reuniens na expressão de memórias aversivas remotas.

# Reconsolidation-induced Rescue of a Remote Fear Memory Blocked by an Early Cortical Inhibition: Involvement of the Anterior Cingulate Cortex and the Mediation by the Thalamic Nucleus Reuniens

Rodrigo O. Sierra <sup>1,2</sup>, Lizeth K. Pedraza,<sup>2,3</sup> Querusche K. Zanona,<sup>1,2</sup> Fabiana Santana,<sup>1,2</sup> Flávia Z. Boos,<sup>1,2</sup> Ana P. Crestani,<sup>1,2</sup> Josué Haubrich,<sup>1,2</sup> Lucas de Oliveira Alvares <sup>2,3</sup>, Maria Elisa Calcagnotto <sup>2,4</sup> and Jorge A. Quillfeldt <sup>1,2\*</sup>

**ABSTRACT:** Systems consolidation is a time-dependent reorganization process involving neocortical and hippocampal networks underlying memory storage and retrieval. The involvement of the hippocampus during acquisition is well described; however we know much less about the concomitant contribution of cortical activity levels to the formation of stable remote memories. Here, after a reversible pharmacological inhibition of the anterior cingulate cortex (ACC) during the acquisition of a contextual fear conditioning, retrieval of both recent and remote memories were impaired, an effect that was reverted by a single memory reactivation session 48 h after training, through a destabilization-dependent mechanism interpreted as reconsolidation, that restored the normal course of systems consolidation in order to rescue a remote memory. Next we have shown that the integrity of both the anterior cingulate cortex and the thalamic nucleus reuniens (RE) were required for this reactivation-induced memory rescue. Because lidocaine infused into the RE inhibited LTP induction in the CA1-anterior cingulate cortex pathways, it seems that RE is a necessary component of the circuit underlying systems consolidation, mediating communication between dorsal hippocampus and cortical areas. To our notice, this is the first demonstration of the rescue of remote memories disrupted by ACC inhibition during acquisition, via a reconsolidation-driven mechanism. We have also shown the importance of RE to ensure the interconnection among brain areas that collectively seem to control the natural course of systems consolidation and allow the persistence of relevant emotional engrams. © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** systems consolidation; reconsolidation; nucleus reuniens; remote memory; anterior cingulate cortex

## INTRODUCTION

The process by which memories become independent of the hippocampus and progressively stored in the neocortex is called systems consolidation. According to this time-dependent reorganization paradigm, memory encoding initially requires the integrity of medial temporal lobe, both to acquire and retrieve new extrinsic (recent) memories; subsequently, these structures are progressively released from the responsibility of retrieving the now dubbed remote memories (Teng and Squire, 1999).

Animals trained on a hippocampus-dependent spatial learning task had their brain activity monitored using (<sup>14</sup>C) 2-deoxyglucose uptake, showing that recent spatial memories promote more robust hippocampal activation than remote ones. In contrast, several neocortical areas showed the opposite pattern, being more activated upon retrieval of remote memories (Bontempi et al., 1999). This is probably why intrahippocampal treatments may disrupt recent memories while remote memories remain resistant to these manipulations (Raybuck and Lattal, 2014).

Notwithstanding the solid evidence on the involvement of cortical structures in remote memory retrieval much less is known about their role during acquisition/learning. Two decades ago, Willner et al. (1993) have shown that the pharmacological inhibition of the entorhinal cortex (EC) during acquisition of an aversive task was able to impair the response of the same brain structure to a pretest amnesic treatment. In that specific case, pre-training muscimol infused into the EC was able to abolish the late (100 min) post-training intra-EC amnesic effect of the same drug, in a non state-dependent way. However, this effect was not able to recruit the amygdala and the hippocampus, that remained sensitive to this treatment after training (Jerusalinsky et al., 1994): this suggests that engram encoding involves parallel, distinct anatomical pathways, indeed, one of the earlier

<sup>1</sup>Psychobiology and Neurocomputing Lab, Biophysics Department, IB, CEP 91.501-970, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup>Graduate Program in Neuroscience, ICBS, CEP 90.046-900, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Neurobiology of Memory Lab, Biophysics Department, IB, CEP 91.501-970, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>4</sup>Neurophysiology and Neurochemistry of Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity Lab, Biochemistry Department, ICBS, CEP 90.030-003, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: FINEP (“Rede Instituto Brasileiro de Neurociências”); Grant number: IBN-Net, No. 01.06.0842-00; Grant sponsors: CNPq (MCT), CAPES (MEC), FAPERGS (Edital PROBIC and Edital 001/2013 PQG).

\*Correspondence to: Jorge A. Quillfeldt, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Predio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: quillfe@ufrgs.br

Accepted for publication 3 February 2017.

DOI 10.1002/hipo.22715

Published online 00 Month 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

findings related to the soon-to-be-baptized “systems consolidation” (Dudai, 1996).

Among the different cortical areas, the specific involvement of the anterior cingulate cortex (ACC) in both recent and remote memory retrieval has been demonstrated: either pre-training NMDAR-NR2B inhibition, or preactivation anisomycin were able to disrupt consolidation or reconsolidation, respectively (Einarsson and Nader, 2012). On the other hand, Lesburgueres et al. (2011), studying social transmission of food preference in rats, have shown that cortical structures involved in remote memory retrieval must undergo a process they call “tagging” mediated by hippocampal activity at some early point of memory consolidation. These observations beg the question: which are the synaptic pathways underpinning this gradual communication between hippocampus and neocortex associated with systems consolidation? Candidates to support communication between hippocampal and cortical networks involved in systems consolidation may include midline thalamic nuclei (Mair et al., 2015) such as nucleus reuniens (RE) and rhomboid nucleus complex (Loureiro et al., 2012) that are reciprocally connected with both the CA1 subfield of the dorsal hippocampus and the mPFC (Vertes et al., 2006; Vertes et al., 2007). Indeed, Hallock et al., (2016) showed that lesion to the reuniens/rhomboid nucleus impairs spatial working memory and oscillatory synchrony between the dorsal hippocampus and prefrontal cortex. On the other hand, Xu and Südhof (2013) showed, by optogenetics, that the mPFC controls memory expression via signaling to the RE that, on its turn, signals back, both to the hippocampus and the mPFC modulating memory precision. The stability and strength of these networks involved in systems consolidation seems to rely on a continuous reactivation of the memory trace during wakefulness and sleep (Sara, 2010). Consistently, previous reports from our lab have shown that brief, repeated reactivation sessions were able to prevent memory from becoming generalized and hippocampus-independent (de Oliveira Alvares et al., 2012; Pedraza et al., 2016).

In this work, we investigated whether cortical activity, in particular ACC, is necessary during training in order to ensure the expression of both recent and remote fear memories. Being this the case, we next asked whether a reactivation-induced reconsolidation process would support the rescue of a remote contextual fear conditioning (CFC) memory acquired under ACC activity deprivation. Finally, we wanted to know the relevance of thalamic RE in mediating circuit communication necessary to ensure the persistence of relevant emotional memories via a process that could be described as “systems reconsolidation.”

## 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 at a constant temperature of 24°C, with water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with local and national guidelines for animal care (Federal Law no 11.794/2008), and the project was approved by the University’s Ethics Committee (process # 27375/2014).

### Stereotaxic Surgery and Cannulae Placement

Rats were anesthetized with i.p. ketamine/xylazine (75 and 10 mg kg<sup>-1</sup>, respectively) and bilaterally implanted with 22-gauge guide cannulae aimed at AP +0.27 mm (from bregma), LL ± 0.05 mm, DV -0.16 and a single (22-gauge) cannula at AP -0.16 mm (from bregma), LL 0.0 mm, DV -0.66 mm, each positioned 1.0 mm above, respectively, the ACC and the RE (Paxinos and Watson, 2007). Following a 1-week recovery from surgery, animals were submitted to the behavioral procedures.

### Drugs

Muscimol (Sigma–Aldrich) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) to a concentration of 1 µg µL<sup>-1</sup> (0.5 µL/side) and bilaterally infused into the ACC, while Lidocaine (2% in PBS) was infused into the RE.

Nimodipine (Sigma–Aldrich), an L-type voltage-gated calcium channel (LVGCCs) antagonist, was dissolved in sterile isotonic saline with 8% dimethyl sulfoxide (DMSO) to a concentration of 16 mg kg<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> and injected subcutaneously (s.c.).

### Intracerebral Infusion

At the time of infusion, a 27-gauge infusion needle was inserted into the guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the tip of the cannula and aimed either to the ACC or/and the RE. A volume of 0.5 µL was bilaterally infused at a slow rate (20 µL h<sup>-1</sup>), and the needle removed only after waiting for an additional 30 sec.

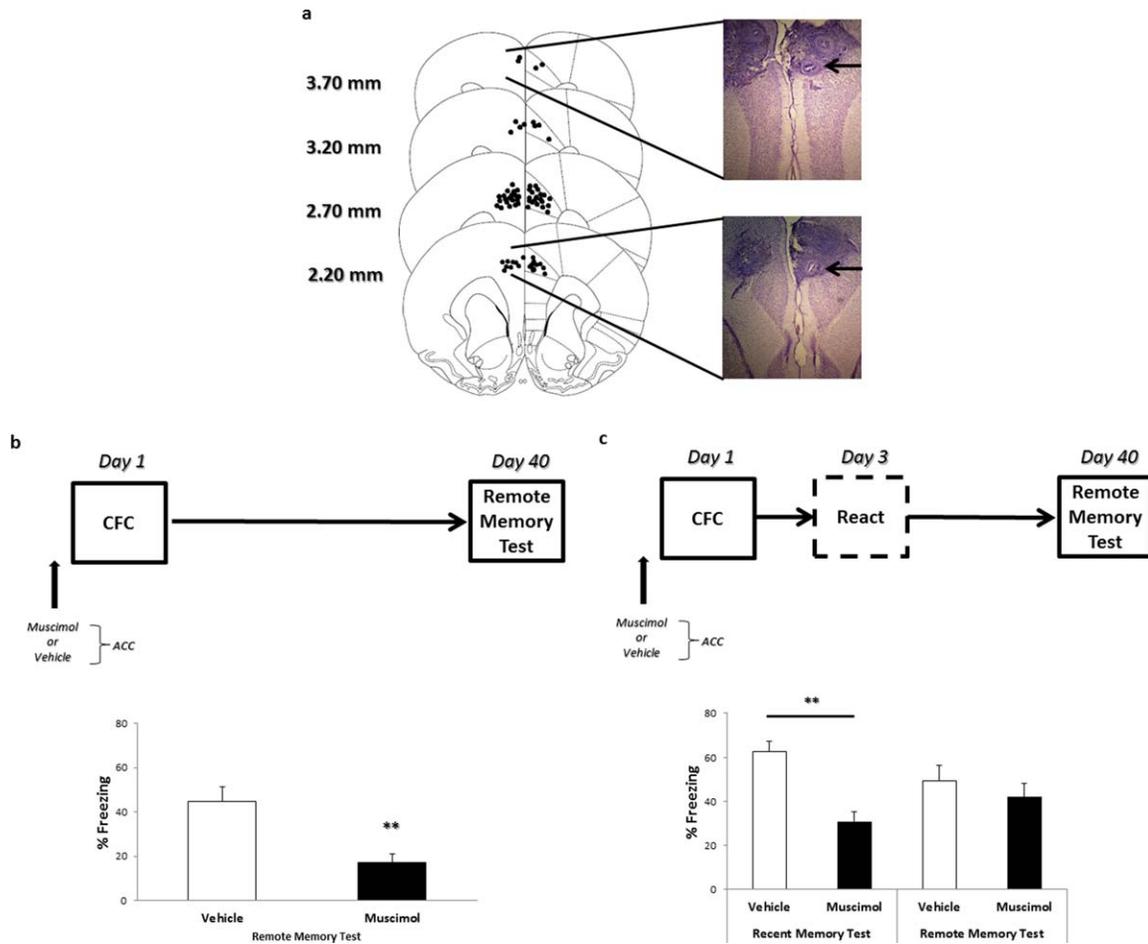
### Behavioral Procedure

#### Contextual fear conditioning (CFC)

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box, 25 × 25 cm<sup>2</sup> with a metallic grid floor. During training, rats were placed in the chamber for 3 min, received two footshocks (0.7 mA/2 s) separated by a 30-s interval; 60 s after the last shock they were returned to their homecages. Depending on the experiment, drugs were infused 15 min (muscimol) and 30 min (nimodipine) before training or 15 min (lidocaine) before recent memory test/reactivation. All drugs were infused intracerebrally, either into the ACC or the RE, except for nimodipine, which was subcutaneous.

#### Recent memory test/reactivation session

Except for the nonreexposed/reactivated group (Fig. 1b), subjects were reexposed to the context 2 days after training



**FIGURE 1.** Memory reactivation rescued a remote memory blocked by pre-training infusion of muscimol into ACC. All graphs show percent of freezing time expressed as mean ± SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. (a) Examples of Nissl stained sections and summary of microinjection cannula placements in the anterior cingulate cortex. The numbers on the left side of the individual sections indicate the distances from Bregma; (b) Non-reactivated animals infused with muscimol into the ACC expressed lower freezing levels compared to controls

(vehicle) in a remote memory test 40 days after training ( $P < 0.01$ , Independent  $t$  student test—Vehicle  $N = 8$ , Muscimol  $N = 9$ ); however in reactivated animals (c) 48h after training animals infused with muscimol into the ACC expressed lower freezing levels compared to controls. No differences were detected during remote memory test 40 days after training ( $P < 0.01$ , Repeated Measures ANOVA with Student–Newman–Keuls *post hoc* test—Vehicle  $N = 14$ , Muscimol  $N = 14$ ). [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

without the US (footshocks) during 240 s, allowing both (a) to measure recent (48 h) long-term memory recall and (b) to induce memory reactivation, whose effect was later accessed in a remote test session (38 days later). In our lab, reexposure to the context without the US for 3–5 min used to be enough to induce memory reactivation/reconsolidation (de Oliveira et al., 2008, 2013; Sierra et al., 2013; Sachser et al., 2015).

### Remote memory test session

All animals, reactivated or not, were tested 40 days after training.

### In Vivo Electrophysiological Procedure

Rats anesthetized with urethane ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) were placed in a stereotaxic apparatus (D. Kopf), and concentric bipolar

stimulating electrodes positioned in the Schaffer collateral (AP  $-4.0 \text{ mm}$  from bregma, LL  $-3.0 \text{ mm}$ , with the DV coordinates individually adjusted around  $-2.5 \text{ mm}$  below the cortical surface to obtain a maximal response). Glass micropipettes filled with  $0.3 \text{ moles L}^{-1}$  of sodium chloride were aimed to the contralateral ACC (AP  $+0.27 \text{ mm}$ , LL  $-0.05 \text{ mm}$ , and DV  $-0.16 \text{ mm}$  below the cortical surface). A single 27-gauge guide cannula was implanted at AP  $-0.16 \text{ mm}$  (from bregma), LL  $0.0 \text{ mm}$ , DV  $-0.66 \text{ mm}$ , positioned  $1.0 \text{ mm}$  above the thalamic RE before stimulus and recording electrodes were positioned. The stimulus intensity ( $300\text{--}600 \mu\text{A}$ ) was adjusted according to the I/V curve to a level at which the amplitude of the negative component could be reliably measured. Paired pulses (with  $50 \text{ ms}$  interval) were delivered at a rate of  $0.1 \text{ Hz}$  during  $15 \text{ min}$  in order to record baseline responses. Then, a volume of  $0.5 \mu\text{L}/\text{side}$  of lidocaine ( $2\%$  in PBS), or its vehicle

(PBS with 1% DMSO), was infused into the RE to verify, during the following 10 min, if this treatment induces any baseline modification. After that, LTP was induced by a high-frequency stimulation (HFS) consisting of 10 trains of 100 Hz pulses for 200 ms, with a 2-s interval between trains, and *in vivo* field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) evoked by paired pulses (with the same 50 ms intervals) were recorded for the following 50–60 min in the dorsal CA1 region of the hippocampus.

## Histology

The position of the cannulae was verified at the end of the experiments. The brains were removed and immersed in a fixation solution of 30% sucrose and 4% paraformaldehyde. Brains were then frozen and sliced (50  $\mu$ m coronal sections) using a cryostat. Sections were stained with Cresyl violet and, subsequently, examined to verify the location of the cannulae. Statistical analysis considered only animals with correct cannulae placements. Representative coronal sections and reconstruction of the cannula tip placements corresponding to the injection sites in the anterior cingulate cortex and nucleus reuniens are depicted in Figures 1a and 4a, respectively.

## Statistical Analysis

After checking for normality (Kolmogorov–Smirnov test) and homocedasticity (Levene test), data was analyzed either by independent *t* test, two-way or repeated measures ANOVA followed by Student–Newman–Keuls (SNK) *post hoc* test, when applicable, with significance set to  $P < 0.05$ .

# RESULTS

## Memory Reactivation Rescued a Remote Memory Blocked by Pretraining Infusion of Muscimol into ACC

To evaluate possible interactions between ACC inhibition before CFC training and subsequent memory reactivation in the stability of recent and remote memory expression, animals were reexposed (reactivated) or not (nonreactivated) to the training context 2 days after acquisition. In Figure 1b (nonreactivated group), the same suppressive effect of *remote* memory expression observed years ago (Willner et al., 1993; Jerusalinsky et al., 1994) after the inhibition of entorhinal cortex during learning (with pre-training muscimol) was reproduced for the ACC. Unlike that experiment, however, here the effect was observed 40 days after acquisition/learning, that is, at a late, remote point in time, taking place after the completion of systems consolidation (Frankland & Bontempi, 2005; Haubrich et al., 2016). Animals with pre-training infusion of muscimol expressed less freezing compared to vehicle group 40 days after training ( $t(15) = 3.647$ ;  $P = 0.002$ , independent *t* test). Furthermore, as explained in M&M, data from the reactivation session itself—which took place 48 h after training—quantify the retrieval of a

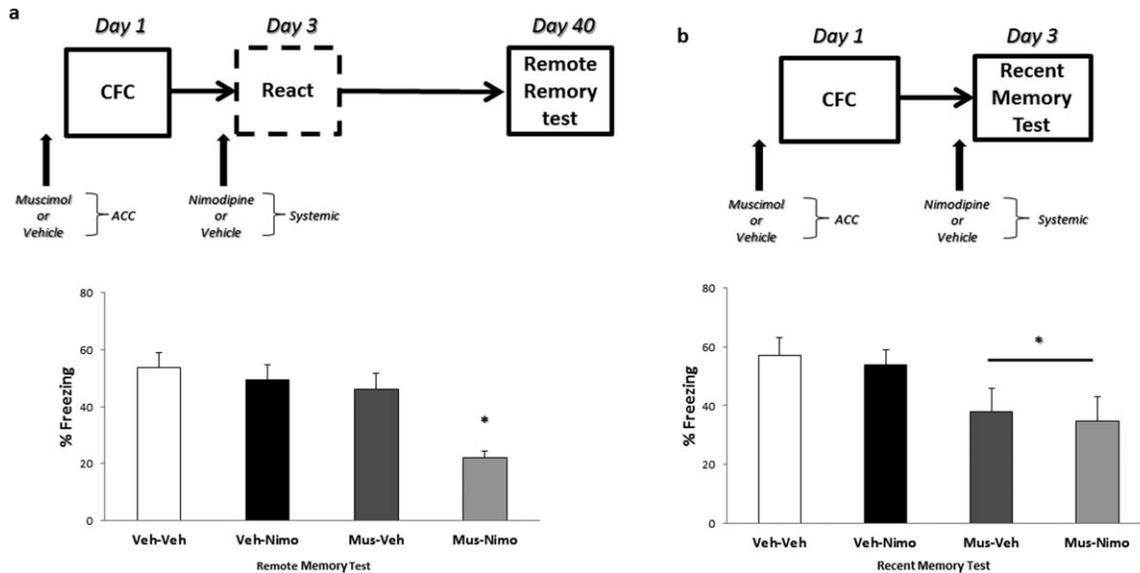
recently consolidated memory: two-way repeated measures ANOVA revealed significant effects of treatment before training (muscimol or vehicle) ( $F_{1,26} = 10.508$ ,  $P \leq 0.001$ ) and interaction of time (reactivation vs. remote memory)  $\times$  treatment ( $F_{1,26} = 5.494$ ,  $P = 0.026$ ) but not of time factor ( $F_{1,26} = 0.038$ ,  $P = 0.846$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that muscimol-treated animals displayed significantly lower freezing levels compared to their controls only on day 3 ( $P < 0.01$ , see Fig. 1c), with no differences detected during the remote memory test, 40 days after training.

Taken together, these results showed that ACC inhibition before CFC training disrupts recent and remote fear memory; however, remote memory was amenable to be rescued by a single memory reactivation. We hypothesize that ACC inhibition with muscimol during acquisition impairs early mechanism mediating cortico-hippocampal communication and systems consolidation affecting remote memory expression.

## Reconsolidation as the Mechanism: Reactivation-induced Rescue of a Remote Memory Involves a Nimodipine-Sensitive Trace Destabilization

Memory reconsolidation has been proposed as a general mechanism behind different plastic events that modify previously consolidated memories, including its strength (Lee, 2008), precision (de Oliveira Alvares et al., 2013), or nature by what is called *updating* (Haubrich et al., 2015). Because the rescue effect verified in our first experiment could be associated with simple memory retrieval rather than reconsolidation, the next experiment aimed to investigate if potential reconsolidation mechanisms taking place during reactivation may subsequently support remote memory expression. Because trace destabilization is recognized as a necessary step in most reconsolidation models (Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011) thus, all animals were reexposed during 4 min (without the US, i.e., the footshock) to the training context on day 3, after receiving a systemic injection of nimodipine, an L-type voltage-gated calcium channel (L-VGCC) antagonist known to block trace destabilization, which would prevent any interference upon reconsolidation. Previous experiments from our lab (de Oliveira et al., 2008; Sierra et al., 2013) demonstrated that reexposure sessions lasting 3–4 min were able to ignite protein synthesis dependent plastic modifications that culminate in memory reconsolidation. Figure 2a shows our findings (all groups were submitted to a reactivation session): two-way ANOVA revealed significant effects of treatment before training ( $F_{1,44} = 12.352$ ,  $P = 0.001$ ), treatment before reactivation ( $F_{1,44} = 8.109$ ,  $P = 0.006$ ) and pretraining  $\times$  prereactivation treatment's interaction ( $F_{1,44} = 4.065$ ,  $P = 0.049$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that animals treated with both, muscimol and nimodipine, expressed significantly lower freezing levels compared to the remaining groups during the remote memory test ( $P < 0.05$ , see Fig. 2a). In the recent memory test, two-way ANOVA revealed significant effects of treatment before training ( $F_{1,44} = 7.713$ ,  $P = 0.008$ ), but not of treatment before reactivation ( $F_{1,44} = 0.206$ ,  $P = 0.651$ )

F2



**FIGURE 2.** Reactivation-induced rescue of a remote memory involves a nimodipine-sensitive trace destabilization. All graphs show percent of freezing time expressed as mean ± SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. (a) During remote memory test on day 40, animals infused with muscimol pre-training and nimodipine preactivation expressed lower freezing levels compared to the remaining groups, showing that the reactivation session involves reconsolidation mechanisms ( $P < 0.05$ , two-

way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post hoc* test); (b) As expected, in a recent memory test 48 h after training, both groups infused with muscimol into the ACC expressed lower freezing levels compared to controls (vehicle), independent from s.c. nimodipine being administered before the reactivation session on day 3 ( $P < 0.05$ , Two-Way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post hoc* test—Vehicle–Vehicle,  $N = 10$ , Vehicle–Nimodipine,  $N = 14$ , Muscimol–Vehicle,  $N = 12$ , Muscimol–Nimodipine,  $N = 12$ ).

or pretraining × preactivation treatment’s interaction ( $F_{1,44} = 0.004$ ,  $P = 0.984$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that both muscimol-treated groups expressed lower freezing levels compared to their controls ( $P < 0.05$ , see Fig. 2b).

To our notice, this is the first evidence showing that reconsolidation is the process underlying the rescue of remote memory trace after being disrupted during acquisition by cortical (ACC) inhibition.

### Systems Reconsolidation: ACC Activity During Memory Reactivation Seems Crucial to Enable the Rescue of the Blocked Remote Memory

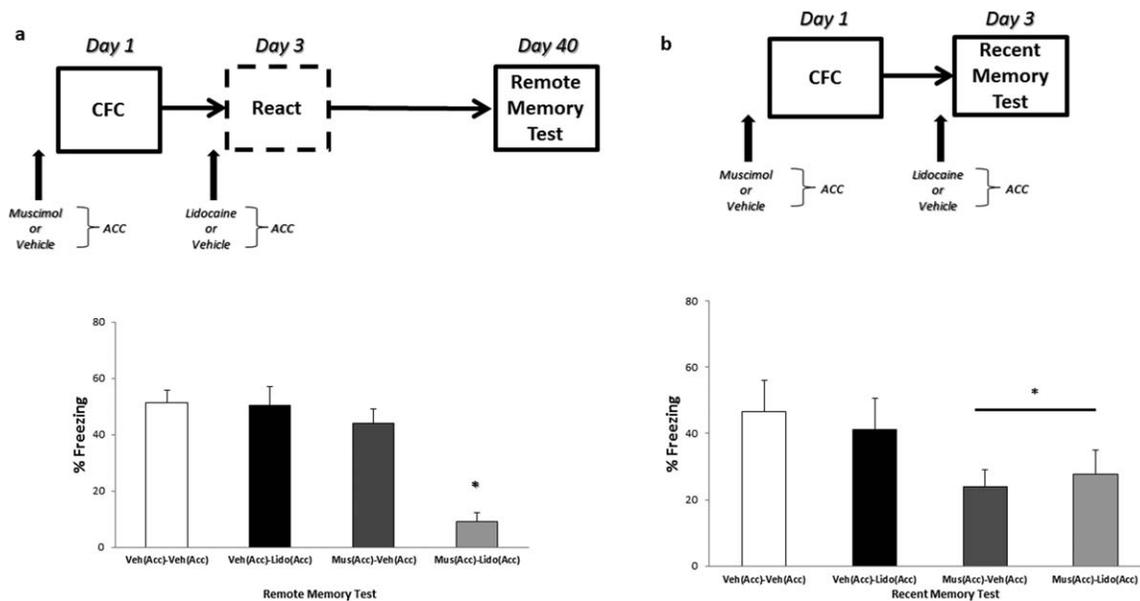
If ACC activity is crucial for remote memory rescue during reactivation, double inhibition of the ACC during both training and reactivation would impair remote memory expression. Hence, muscimol and lidocaine were infused into the ACC 15 min before the training and reactivation session, respectively (Fig. 3a). We did not use muscimol twice to intentionally avoid the possibility of state-dependency (and previously observed in our lab—see Sierra et al., 2013), and employed lidocaine as the preactivation treatment. The reversible suppression of local cortical activity induced by lidocaine is similar, yet not identical to muscimol, by inhibiting action potentials through the blockage of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels (Martin, 1991). In the remote memory test, two-way ANOVA revealed significant effects of treatment before training ( $F_{1,26} = 24.273$ ,  $P = 0.000$ ), treatment before reactivation

( $F_{1,26} = 13.065$ ,  $P = 0.001$ ) and pretraining × preactivation treatment’s interaction ( $F_{1,26} = 11.966$ ,  $P = 0.001$ ); SNK showed that muscimol and lidocaine groups displayed less freezing than the other groups ( $P < 0.05$ —see Fig. 3a). In the recent memory test, two-way ANOVA revealed significant effects of treatment before training ( $F_{1,26} = 5.100$ ,  $P = 0.032$ ), but not of treatment before reactivation ( $F_{1,26} = 0.016$ ,  $P = 0.900$ ) and pretraining × preactivation treatment’s interaction ( $F_{1,26} = 0.326$ ,  $P = 0.572$ ), and SNK showed that both groups treated with muscimol expressed lower freezing levels compared to controls ( $P < 0.05$ —Fig. 3b). These results confirm our initial assumption that cortical reengagement during memory reactivation, at least for ACC activity, promotes the rescue of remote memory expression.

### Involvement of RE: A Structure Necessary to Mediate the Rescue of a Blocked Remote Memory

Most systems consolidation models agree that cortico-hippocampal communication is crucial for memory reorganization through time (Frankland & Bontempi, 2005). The CA1 output layer projects to several cortical areas—ACC, orbitofrontal and retrosplenial cortex, among others—either directly or through the entorhinal cortex (Amaral & Lavenex, 2007; Rolls, 2015). Furthermore, prefrontal cortex projects to hippocampus through the thalamus, where nucleus reuniens (RE)

F3



**FIGURE 3.** ACC activity during memory reactivation seems crucial to enable the rescue of the blocked remote memory. All graphs show percent of freezing time expressed as mean ± SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. (a) During remote memory test on day 40, animals infused with muscimol pre-training and lidocaine pre-reactivation, both into the ACC, expressed lower freezing levels compared to the remaining groups, suggesting that ACC is reengaged by reactivation in order to promote remote memory expression ( $P < 0.05$ , two-way

ANOVA with Student–Newman–Keuls *post hoc* test); (b) During recent memory test, both groups infused with muscimol into the ACC expressed lower freezing levels compared to controls (vehicle), independent from lidocaine being administered before the reactivation session on day 3 ( $P < 0.05$ , Two-Way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post hoc* test—Vehicle (ACC)-Vehicle (ACC),  $N = 8$ , Vehicle (ACC)-Lidocaine (ACC),  $N = 7$ , Muscimol (ACC)-Vehicle (ACC),  $N = 8$ , Muscimol (ACC)-Lidocaine (ACC),  $N = 7$ ).

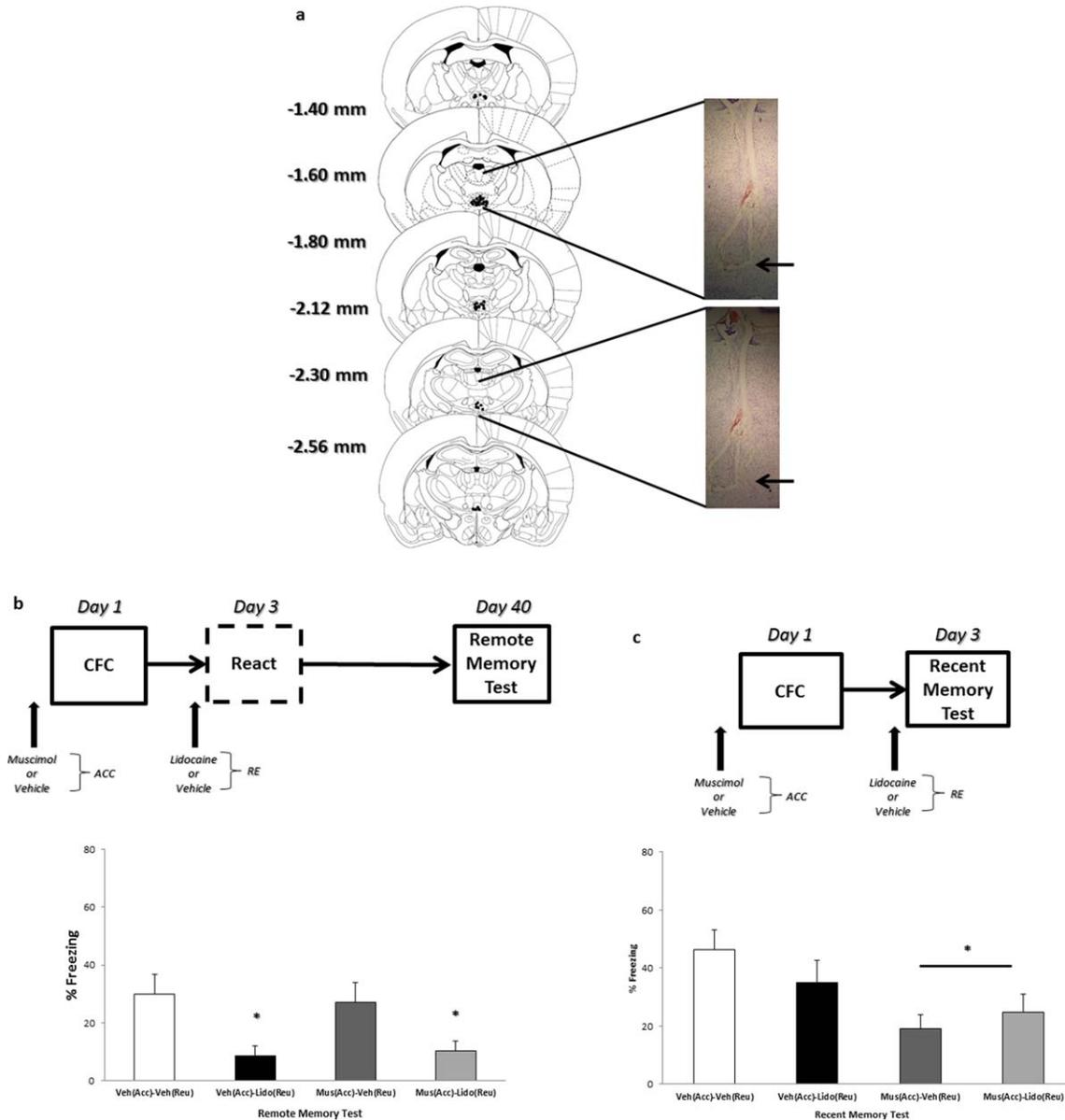
acts as a relay station between the mPFC and the hippocampus (Vertes et al., 2007). To know whether RE activity during reactivation is needed for effective remote memory rescue, we used an experimental design similar to the one above, with lidocaine infused preactivation into that structure (Fig. 4b). Thus, in the remote memory test, two-way ANOVA revealed significant effects of treatment before reactivation ( $F_{1,45} = 13.228$ ,  $P = 0.000$ ), but not of treatment before training ( $F_{1,45} = 0.013$ ,  $P = 0.907$ ) or pretraining × preactivation treatment’s interaction ( $F_{1,45} = 0.179$ ,  $P = 0.673$ ); SNK showed that both groups treated with lidocaine before memory reactivation expressed lower freezing levels compared to controls ( $P < 0.05$ ). In the recent memory test, two-way ANOVA revealed significant effects of treatment before training ( $F_{1,45} = 8.339$ ,  $P = 0.005$ ), but not for treatment before reactivation ( $F_{1,45} = 0.195$ ,  $P = 0.660$ ) or pretraining × preactivation treatment’s interaction ( $F_{1,45} = 1.752$ ,  $P = 0.192$ ); SNK showed that both groups treated with muscimol expressed lower freezing levels compared to control groups during the recent memory test ( $P < 0.05$ —see Fig. 4c).

The suppression of the rescue effect during reactivation session by blocking RE with lidocaine supports the scenario in which memory reactivation and the consequent reengagement of ACC are both mediated by indirect pathways involving RE. This mediating structure is so decisive, however, that its inhibition before the reactivation session is sufficient to impair even

the expression of remote memory of the control group, not treated with muscimol.

### The Inhibition of the Nucleus Reunienis with Lidocaine Impaired the Induction of Long-Term Potentiation in the CA1-ACC Pathway

The idea that the hippocampus exerts direct influence upon the prefrontal cortex has been substantiated by electrophysiological recordings of the mPFC after hippocampal stimulation in anesthetized and awake animals (Takita et al., 1999). Previous studies have shown that RE axons establish asymmetrical excitatory synapses with CA1 (Wouterlood et al., 1990), whose stimulation produces strong excitatory responses (Dolleman-Van der Weel et al., 1997). Also, pharmacological disruption of the dorsal hippocampus was able to impair memory consolidation (Igaz et al., 2002; Gafford et al., 2005; Gafford et al., 2011), reconsolidation (Lee, 2010; Sierra et al., 2013; Einarsson et al., 2015) and retrieval (Maren and Holt, 2000; Quinn et al., 2005; Cullen et al., 2015) of contextual fear memories. Notwithstanding the well-described functional parallel involvement of both the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in different mnemonic processes (Lee and Kesner, 2003; Lopez et al., 2012; Yang et al., 2015), the prefrontal area is known to receive direct inputs only from the ventral hippocampus (Jay et al., 1989; Thierry et al., 2000). Indeed, these unidirectional

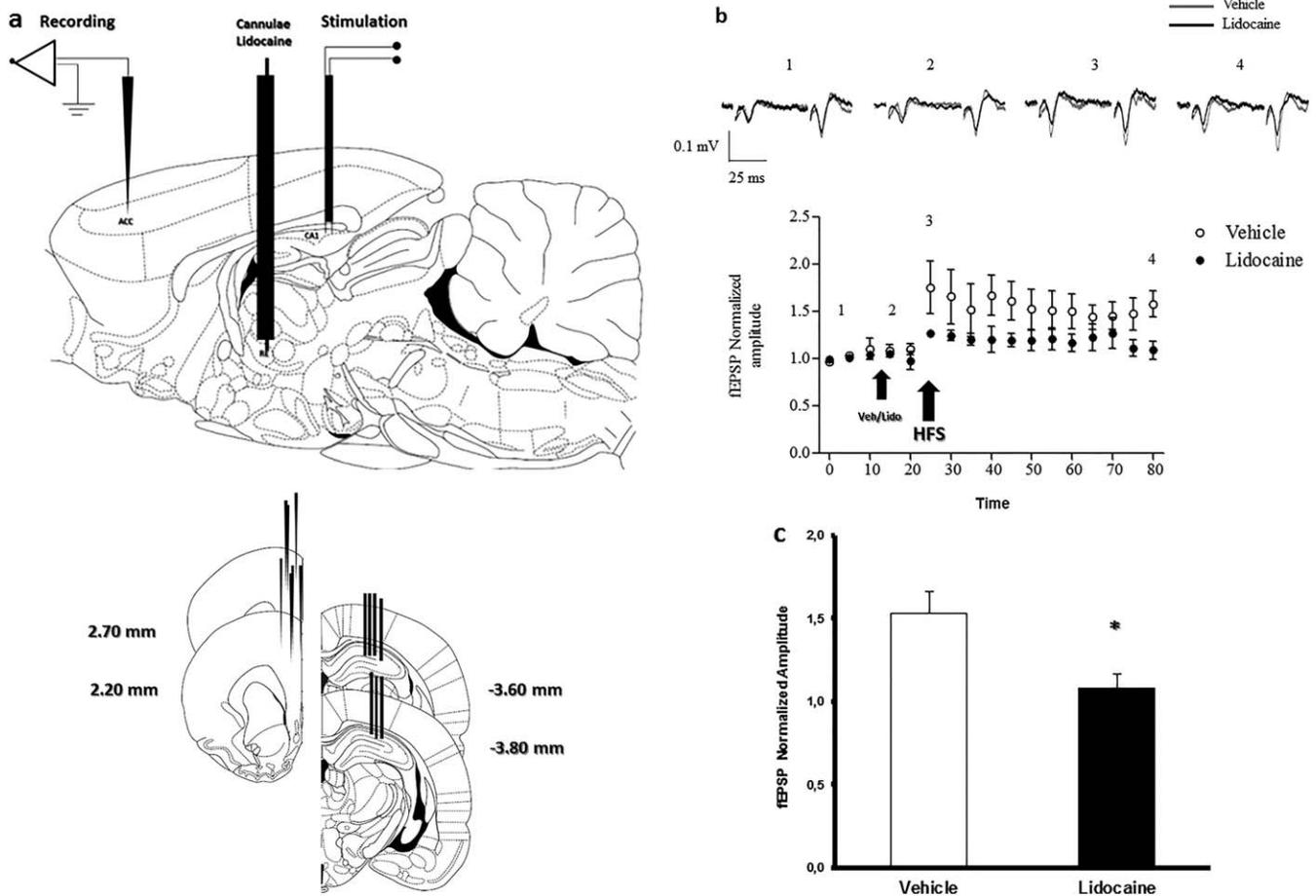


**FIGURE 4.** Lidocaine into the thalamic nucleus reuniens also abolishes the rescue effect of a reactivation session. All graphs show percent of freezing time expressed as mean  $\pm$  SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. (a) Examples of Nissl stained sections and summary of microinjection cannula placements in Nucleus Reuniens. The numbers on the left side of the individual sections indicate the distances from Bregma; (b) During remote memory test on day 40, animals infused with vehicle (into the ACC) pretraining and lidocaine (into the RE) preactivation, and muscimol pretraining/lidocaine preactivation expressed lower freezing levels compared to the groups vehicle pre-training/vehicle preactivation and muscimol

pretraining/vehicle pre-activation, suggesting an important mediation action of the nucleus reuniens in defining remote memory expression ( $P < 0.05$ , Two-Way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post hoc* test); (c) During recent memory test, both groups infused with muscimol into the ACC expressed lower freezing levels compared to controls, independent from s.c. lidocaine being administered before the reactivation on day 3 ( $P < 0.05$ , Two-Way ANOVA with Student–Newman–Keuls *post hoc* test—Vehicle (ACC)-Vehicle (RE),  $N = 12$ , Vehicle (ACC)-Lidocaine (RE),  $N = 12$ , Muscimol (ACC)-Vehicle (RE),  $N = 12$ , Muscimol (ACC)-Lidocaine (RE),  $N = 13$ ). [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

hippocampal projections to prefrontal cortex are originated from CA1 and the subiculum and innervate specifically the prelimbic cortex and medial orbital regions (Jay and Witter, 1991) without direct return projection to the hippocampus (Sesack et al. 1989; Hoover and Vertes 2007). On the other

hand, only recently a monosynaptic pathway between ACC and CA1 via CA3 has been suggested to explain an effect upon contextual memory retrieval (Rajasethupathy et al., 2015). In view of the absence of known direct projections between dorsal hippocampus and ACC, the fact that RE activity seems



**FIGURE 5.** Inhibition of the nucleus reuniens with lidocaine impaired the induction of LTP in the CA1-ACC pathway. (a) Summary of the location of recording and stimulation electrodes in the Dorsal Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. All animals were implanted with a single guide cannula positioned above the thalamic nucleus reuniens in order to infuse lidocaine or its vehicle. The numbers on the right and left sides of the individual sections indicate the distances from Bregma; (b) Representative traces of fEPSP evoked by paired pulse in different

time points before (1, 2) and after LTP induction (3, 4); Time course of fEPSP amplitude, with an arrow indicating stimulation onset and numbers; fEPSP displays potentiation after HFS only if infused with vehicle, not lidocaine ( $P < 0.05$ , independent  $t$  student test); (c) Plots of fEPSP normalized amplitude. Lidocaine prevents LTP induction compared to vehicle-treated group: normalized change in fEPSP amplitude after stimulation ( $t = 75\text{--}80$  min) ( $P < 0.05$ , independent  $t$  student test—Vehicle,  $N = 3$ , Lidocaine,  $N = 4$ ).

to be essential to allow the rescue of a remote memory (Fig. 4b) supports a putative role for this structure in mediating communication between dorsal hippocampus and ACC during systems consolidation. We then studied the LTP induction in the ACC after high-frequency stimulation (HFS) of the CA1-prefrontal pathway, and how it may be modulated by RE activity (Fig. 5b). Lidocaine directly infused into RE did not affect baseline fEPSP normalized amplitude that is, did not change basal excitability of field responses (Fig. 5b). However, RE inhibition by lidocaine was able to prevent LTP in CA1-prefrontal pathway ( $t(5) = 3.053$ ;  $P = 0.028$ , independent  $t$  test—Fig. 5b,c). Paired pulse facilitation did not differ between pre and post drug infusion baselines, neither for the vehicle ( $t(3) = 1.924$ ;  $P = 0.194$ , paired  $t$  test), nor for the lidocaine group ( $t(4) = 0.316$ ;  $P = 0.772$ , paired  $t$  test). These results

support the pivotal role of indirect pathways involving midline thalamic nuclei (such as, e.g., RE) in synaptic plasticity between the hippocampus and the prefrontal cortex.

F5

Hippocampus

## DISCUSSION

Our findings began confirming the involvement of ACC in the formation of long-term, yet “recent” memory, that is, in cellular consolidation (Fig. 1c), consistently with what was described by Einarsson and Nader (2012), only that, now, transient inhibition of this area during acquisition/learning of contextual fear conditioning impaired memory retrieval 40 days

after training (Fig. 1b). This supports the idea that, in order to ensure adequate systems consolidation, some cortical areas must be active during acquisition, concomitantly to the hippocampus and other subcortical areas, known to be necessary for cellular consolidation of the engram. This disruption, when ACC was blocked during acquisition, was reversed by a single memory reactivation session 48 h after training (Fig. 1c), with the demonstrable participation of ACC in the rescue process (Figs. 2a and 3a). Thus, ACC not only supports consolidation (Figs. 1c, 2b, and 3b), but also further plastic events taking place during reactivation (Fig. 3a), which, in turn, depends on the destabilization of the memory trace (Fig. 2a). All things considered, it seems reconsolidation is the mechanism underlying remote memory rescue, which is also consistent with the effectiveness of the short reexposure time of 4 min (Bustos et al., 2009; de Oliveira Alvares et al., 2013; Sachser et al., 2015). Finally, we gave a further step and have shown the involvement of RE as a necessary relay between cortical and subcortical areas operating during reconsolidation (Fig. 4b), using lidocaine in a dose unable to affect (recent) memory retrieval by itself (Fig. 4c), despite being effective in preventing LTP induction in the CA1-prefrontal pathways (Fig. 5b,c): these results bring a new insight into the brain circuitry mediating the persistence of fear memory traces, that in turn is driven by systems consolidation processes.

In the first experiment, our results suggest that the functional integrity of ACC circuitry during CFC acquisition seems necessary to ensure its later involvement with remote memories (Fig. 1b). We have previously shown the independence from the hippocampus after 40 days, when the cortex seems to take control (Haubrich et al., 2016), that is, systems consolidation had already take place (Bontempi et al., 1999; Frankland & Bontempi, 2005). This somehow replicates the effect of pre-training muscimol infused into the Entorhinal cortex observed by one of us (JAQ) two decades ago (Jerusalinsky et al., 1994, after Willner et al., 1993). In that study, despite not focusing on remote memory (training-test intervals were of 24 h), we found that blocking one cortical area did not necessarily affect the involvement of other brain regions, such as amygdala and hippocampus, which is consistent with the idea of a multiplicity of anatomical pathways involved in the register of the engram (a.k.a. Systems Consolidation, a phenomenon only later named as such - see: Dudai, 1996; Dudai & Morris, 2000). One possible hypothesis is that muscimol during acquisition somehow impaired early plasticity events that establish cortico-hippocampal communications that will, later, allow the proper operation of systems consolidation mechanisms that establish remote memories. This being true, reactivation seems to allow the rescue of the disrupted remote memory by restoring the normal course of operation of systems consolidation.

The second experiment aimed to investigate the rescue mechanism, using nimodipine to block trace destabilization (Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011), a necessary component of reconsolidation. Nimodipine dose was chosen to be subeffective, which is why it had no effect upon recent (Fig. 2b) or remote (Fig. 2a) memories, also being unable to

revert, by itself, the muscimol blockade of long-term, recent memory (Fig. 2b). Nimodipine was effective only when remote memories were involved (Fig. 2a), retrieved after a 40-day interval which is enough time for systems consolidation to take place (see Fig. 2a). To our notice, this is the first evidence suggesting a role for reconsolidation as a process behind this rescue of the normal course of systems consolidation—an instance of “systems reconsolidation?”—allowing for the retrieval of an adequate remote memory despite its early disruption by ACC inhibition during acquisition.

We have recently investigated the multifunctional character of reconsolidation, enabling memories to keep their relevance either by updating, or by the maintenance of their strength or precision (de Oliveira Alvares et al., 2013). The present study expands the concept of “updating” to encompass memory persistence—as shown in the rescue phenomenon induced by memory reactivation—in the establishment of retrieve reliable remote memories, probably by repairing neural circuits in order to attain a level of integrity similar to that established naturally via a normal-course systems consolidation.

Next we investigated if ACC circuitry is the cortical locus of the rescue effect, since in the previous experiment only systemic nimodipine was used. We avoided muscimol to circumvent the complications of possible state-dependent effects (previously studied in our lab—see Sierra et al., 2013), thus, we used lidocaine instead (Martin, 1991). The local inhibition of ACC with lidocaine during reactivation was also able to prevent the reactivation-induced rescue effect (Fig. 3a). Importantly, lidocaine before reactivation did not affect recent memory retrieval; this result was similar to that obtained with intra ACC muscimol in previous experiments of our lab (Haubrich et al., 2016). Dash et al. (2004) suggest that learning events trigger genomic changes in neurons from the hippocampus and neocortical areas resulting in simultaneous long-term memory storage. In fact, trace fear conditioning results in an immediate increase in Erk activity in the mPFC and hippocampus 1 h after training; inhibition of Erk impairs long-term memory for this task in both mPFC and hippocampus (Runyan et al., 2004). Recently, Bero et al. (2014) showed that memory encoding triggers synaptic plasticity-related transcriptional factors involved in a significant increase of the size of active zones, postsynaptic densities and the number of docked vesicles within individual synapses of the mPFC. These studies converge with the present one to support the view that early plasticity mechanisms are necessary in the hippocampus and cortical structures in parallel, especially to promote remote memory formation. Early ACC activity during acquisition and reconsolidation could establish circuitual scaffolding to support the progressive, hippocampus-driven systems consolidation process.

In the fourth experiment we investigated the local suppression of RE activity during reactivation to understand whether and how this relay structure participates in this multi-area network: lidocaine infused into RE also prevented the reactivation session from rescuing a remote memory (Fig. 4b), despite the fact that the chosen concentration of lidocaine had an effect on itself (but not upon recent memory—see Fig. 4c). This is

consistent with what is known about RE, a major source of thalamic inputs to the hippocampus (Wouterlood et al., 1990; Dolleman-van der Weel et al., 1997) and an important target for mPFC/ACC projections (Vertes, 2002, Vertes et al., 2007), possibly mediating bidirectional cortico-hippocampal networks (Cassel et al., 2013). Not surprisingly, RE was shown to be involved in memory and other cognitive processes (Loureiro et al., 2012; Jankowski et al., 2014).

Our behavioral experiments on RE were complemented by the demonstration that local lidocaine, in the same concentration, was able to block induced LTP in the CA1-prefrontal pathways without changing basal excitability of field responses, showing the functional relationship between Hippocampus and ACC mediated by RE activity (Fig. 5a–c). Interestingly, a recent study demonstrated that hippocampal sharp-wave ripples were able to modulate ACC neuronal firing (Wang and Ikemoto, 2016). Our results did not exclude the possibility of additional structures such as the entorhinal cortex in being involved in memory organization during systems consolidation. For instance, Apergis-Schoute et al., (2006) have shown that axons of medial prefrontal cortex form asymmetric synapses with GABA-immunonegative dendritic spines in both perirhinal and entorhinal cortices, suggesting an additional route to control information flow into and out of the hippocampus through excitatory inputs to those cortical areas. Similar to RE, entorhinal cortex is reciprocally connected with the prefrontal cortex (Agster and Burwell, 2009) and functional disconnection between prefrontal and entorhinal cortex impairs episodic-like memories in tasks such as object recognition and spatial working memory (Chao et al., 2016). Importantly, a recent study have shown that RE and entorhinal axons converge partially onto the exact same apical dendrites of CA1 pyramidal cells (Dolleman-van der Weel et al., 2016) agreeing with previous suggestions that RE-CA1 and entorhinal-CA1 synapses may act reducing the threshold for synaptic plasticity, facilitating memory consolidation processes taking place in the CA1 region (Xu and Sudhof, 2013). Our chemical inhibition contrasts with the study of Eleore et al. (2011) in which an HFS applied into RE in behaving animals also blocked the acquisition of classical eyeblink conditioning without disrupting the LTP evoked at RE-mPFC and RE-CA1 synapses. Closer to our findings, two studies detected a transient synaptic depotentiation and repotentialiation after an object recognition test in mice (Clarke et al., 2010) or a reactivation/reconsolidation session (Bonin and De Koninck, 2015), particularly promising mechanisms that, however, were not investigated here.

The neural pathways controlling hippocampus-to-ACC signal transmission remains unclear, however, some lines of evidence have shown that monosynaptic (Cenquizca and Swanson, 2007; Rajaseethupathy et al., 2015) or polysynaptic (Wang and Ikemoto, 2016) pathways may be involved in this communication. Prefrontal cortex is known to receive direct projections only from the ventral hippocampus (Jay et al., 1989; Thierry et al., 2000) and direct monosynaptic communication from ACC drives hippocampal neuron activity in both CA1 and CA3 subregions (Rajaseethupathy et al., 2015). It is not far fetched to hypothesize that LTP induction from

CA1 to ACC may be under polysynaptic modulatory action (Wang and Ikemoto, 2016) involving, for example, regions such as the amygdala, entorhinal cortex and RE (Sesack et al., 1989; Witter et al., 1989; Vertes et al., 2006, 2007; Chao et al., 2016). Bertram and Zhang (1999) have shown that HFS in RE induces long-term potentiation in CA1. Also, there is evidence suggesting that, during sleep, organized firing patterns between the hippocampus and the prefrontal cortex seem to be essential to mnemonic processes such as systems consolidation (Stickgold, 1998; Sutherland and McNaughton, 2000; Sirota et al., 2003). In view of these set of suggestive facts, we may suppose a prefrontal-hippocampal loop involving reciprocal projections to the RE as a putative supporting mechanism to maintain plasticity/LTP integrating hippocampal and neocortical circuits: LTP induction in CA1 would be able to induce heterosynaptic facilitation by reducing the threshold for synaptic plasticity via RE and/or entorhinal cortex (Xu and Sudhof, 2013), both structures reciprocally connected with the prefrontal area. This would put the prefrontal cortex in the control of CA1 synaptic strength after LTP induction, a potential mechanism for the progressive hippocampal-cortical communication that may underly the memory systems consolidation process. This is consistent, for instance, with the suggested memory trace formation mechanism based upon reverberation of excitation in closed neuronal circuits established in the hippocampus and entorhinal cortex (Buzsáki and Gage, 1989; Zosimovskii and Korshunov, 2010). To this point this proposed mechanism to explain our findings is highly speculative, and to be settled, depend on future experiments.

In conclusion, we have shown, for the first time, (a) the rescue of remote memories disrupted by local inhibition during acquisition, via a reconsolidation-driven mechanism and (b) the potential neural substrate allowing cortico-hippocampal communication during systems consolidation associated with RE activity. Because retrieval of 40-day old traces generally takes place after the natural completion of its systems consolidation, reactivation seems to allow the rescue of the disrupted remote memory by restoring the normal course of operation of that process—a possible case of “systems reconsolidation.” Both structures, ACC and RE, seem to collectively control the course of the systems consolidation process and allow the persistence of a relevant emotional engram, or rescue it if somehow disrupted.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Mrs. Zelma Regina V. de Almeida, Adriano Emanuel Machado, and Fernanda Nogueira Lotz Alves for their competent and kind assistance.

## REFERENCES

- Agster KL, Burwell RD. 2009. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 19: 1159–1186.

- Amaral D, Lavenex P. 2007. Hippocampal neuroanatomy, Chapter 3. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. pp. 37–114. *The Hippocampus Book*. NY: Oxford University Press.
- Apergis-Schoute J, Pinto A, Paré D. 2006. Ultrastructural organization of medial prefrontal inputs to the rhinal cortices. *Eur J Neurosci* 24:135–144.
- Bero AW, Meng J, Cho S, Shen AH, Canter RG, Ericsson M, Tsai LH. 2014. Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:11852–11857.
- Bertram EH, Zhang DX. 1999. Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: A comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92:15–26.
- Bonin RP, De Koninck Y. 2015. Reconsolidation and the regulation of plasticity: Moving beyond memory. *Trends Neurosci* 38:336–344.
- 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.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: Decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34:446–457.
- Buzsáki G, Gage FH. 1989. Absence of long-term potentiation in the subcortically deafferented dentate gyrus. *Brain Res* 484:94–101.
- Cassel JC, Pereira DV, Loureiro M, Cholvin T, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP. 2013. The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog Neurobiol* 111:34–52.
- Centurion LA, Swanson LW. 2007. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:26.
- Chao OY, Huston JP, Li JS, Wang AL, de Souza Silva MA. 2016. The medial prefrontal cortex-lateral entorhinal cortex circuit is essential for episodic-like memory and associative object-recognition. *Hippocampus* 26:633–645.
- Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM. 2010. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2652–2657.
- Cullen PK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC, Jasnow AM. 2015. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol Learn Mem* 124:19–27.
- 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 AL, Pasqualini GB, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA. 2008. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154:1648–1655.
- 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.
- Dolleman-van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP. 1997. Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J Neurosci* 17:5640–5650.
- Dolleman-van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP. 2016. Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat. *Brain Struct Funct* doi: 10.1007/s00429-016-1350-6.
- Dudai Y. 1996. Consolidation: Fragility on the road to the engram. *Neuron* 17:367–370.
- Dudai Y, Morris RGM. 2000. To consolidate or not to consolidate: What are the questions? In: Bolhuis JJ, editor. *Brain, Perception, Memory—Advances in Cognitive Sciences*. pp. 149–162. Oxford: Oxford University Press.
- Einarsson EO, Nader K. 2012. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 19:449–452.
- 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.
- Eleore L, Lopez-Ramos JC, Guerra-Narbona R, Delgado-García JM. 2011. Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. *PLoS One* 6:e23538.
- Flavell CR, Barber DJ, Lee JL. 2011. Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nat Commun* 2:504.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Gafford GM, Parsons RG, Helmstetter FJ. 2005. Effects of post-training hippocampal injections of midazolam on fear conditioning. *Learn Mem* 12:573–578.
- Gafford GM, Parsons RG, Helmstetter FJ. 2011. Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience* 182:98–104.
- Hallock HL, Wang A, Griffin AL. 2016. Ventral midline thalamus is critical for hippocampal-prefrontal synchrony and spatial working memory. *J Neurosci* 36:8372–8389.
- 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* 26:924–932.
- Hoover WB, Vertes RP. 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212:149–179.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22:6781–6789.
- Jankowski MM, Islam MN, Wright NF, Vann SD, Erichsen JT, Aggleton JP, O'Mara SM. 2014. Nucleus reuniens of the thalamus contains head direction cells. *Elife* 3:e03075. doi: 10.7554/elifelife.03075
- Jay TM, Witter MP. 1991. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574–586.
- Jay TM, Glowinski J, Thierry AM. 1989. Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 505:337–340.
- Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Bueno e Silva M, Bianchin M, Schmitz P, Zanatta MS, Ruschel AC, Paczko N, Medina JH, Izquierdo I. 1994. Effect of the infusion of the GABA-A receptor agonist, muscimol, on the role of the entorhinal cortex, amygdala, and hippocampus in memory processes. *Behav Neural Biol* 61:132–138.
- Lee JL. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264–1266.
- Lee JL. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4:168.

- Lee I, Kesner RP. 2003. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci* 23:1517–1523.
- Lesburgueres E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifileff P, Bontempi B. 2011. Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science* 331:924–928.
- Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel JC, de Vasconcelos AP. 2012. Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841.
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira d, V. 2012. The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J Neurosci* 32:9947–9959.
- Mair RG, Miller RL, Wormwood BA, Francoeur MJ, Onos KD, Gibson BM. 2015. The neurobiology of thalamic amnesia: Contributions of medial thalamus and prefrontal cortex to delayed conditional discrimination. *Neurosci Biobehav Rev* 54:161–174.
- Maren S, Holt W. 2000. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav Brain Res* 110:97–108.
- Martin JH. 1991. Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127:160–164.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. San Diego: Academic Press.
- Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, de Oliveira AL. 2016. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus* 26:362–371.
- Quinn JJ, Loya F, Ma QD, Fanselow MS. 2005. Dorsal hippocampus NMDA receptors differentially mediate trace and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 15:665–674.
- Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, Lo M, Liston C, Deisseroth K. 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* 526:653–659.
- 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.
- Rolls ET. 2015. Diluted connectivity in pattern association networks facilitates the recall of information from the hippocampus to the neocortex. *Prog Brain Res* 219:21–43.
- Runyan JD, Moore AN, Dash PK. 2004. A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning. *J Neurosci* 24:1288–1295.
- Sachser RM, Crestani AP, Quillfeldt JA, Mello E Souza T, de Oliveira Alvares L. 2015. The cannabinoid system in the retrosplenial cortex modulates fear memory consolidation, reconsolidation, and extinction. *Learn Mem* 22:584–588.
- Sara SJ. 2010. Reactivation, retrieval, replay and reconsolidation in and out of sleep: Connecting the dots. *Front Behav Neurosci* 4:185.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. 1989. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213–242.
- Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J, de Oliveira AL, Quillfeldt JA. 2013. Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem* 20:379–387.
- Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsáki G. 2003. Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2065–2069.
- Stickgold R. 1998. Sleep: Off-line memory reprocessing. *Trends Cogn Sci* 2:484–292.
- Sutherland GR, McNaughton B. 2000. Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr Opin Neurobiol* 10:180–186.
- Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem* 15:426–433.
- Takita M, Izaki Y, Jay TM, Kaneko H, Suzuki SS. 1999. Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. *Eur J Neurosci* 11:4145–4148.
- Teng E, Squire LR. 1999. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400:675–677.
- Thierry AM, Giovanni Y, Dégénétais E, Glowinski J. 2000. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411–419.
- Vertes RP. 2002. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp Neurol* 442:163–187.
- Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ. 2006. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 499:768–796.
- Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C. 2007. Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 71:601–609.
- Wang DV, Ikemoto S. 2016. Coordinated Interaction between hippocampal sharp-wave ripples and anterior cingulate unit activity. *J Neurosci* 36:10663–10672.
- Willner P, Bianchin M, Walz R, Bueno E, Silva M, Zanatta MS, Izquierdo I. 1993. Muscimol infused into the entorhinal cortex prior to training blocks the involvement of this area in post-training memory processing. *Behav Pharmacol* 4:95–99.
- Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. 1989. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* 9:216–228.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP. 1990. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: Light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179–203.
- Xu W, Südhof TC. 2013. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339:1290–1295.
- Yang H, Hou H, Pahng A, Gu H, Nairn AC, Tang YP, Colombo PJ, Xia H. 2015. Protein phosphatase-1 inhibitor-2 is a novel memory suppressor. *J Neurosci* 35:15082–15087.
- Zosimovskii VA, Korshunov VA. 2010. Return of excitatory waves from field CA1 to the hippocampal formation is facilitated after tetanization of Schäffer collaterals during sleep. *Neurosci Behav Physiol* 40:315–323.

**8.2 Artigo 2:** Versão preliminar do manuscrito a ser submetido avaliando o papel do  
Córtex Entorrinal Lateral na generalização de memórias aversivas.

**Title:** Lateral Entorhinal Cortex controls systems consolidation and fear generalization through CP-AMPA trafficking

**Running title:** Lateral Entorhinal Cortex controls fear generalization

**Author names:** Rodrigo O. Sierra<sup>1,4</sup>, Lizeth K. Pedraza<sup>2,4</sup>, Walquiria Nunes-Souza<sup>2,4</sup>, Pablo Solari<sup>1,4</sup>, Lucas de Oliveira Alvares<sup>2,4</sup>, Jorge A. Quillfeldt<sup>1,4</sup>

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Psychobiology and Neurocomputing Lab, <sup>2</sup>Neurobiology of Memory Lab, <sup>3</sup>Biophysics Department, IB, CEP 91.501-970, and <sup>4</sup>Graduate Program in Neuroscience, ICBS, CEP 90.046-900 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:** Jorge A. Quillfeldt and Rodrigo O. Sierra, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Predio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: [quillfe@ufrgs.br](mailto:quillfe@ufrgs.br) or [sierra.ro@hotmail.com](mailto:sierra.ro@hotmail.com)

## **Abstract**

Discrimination between safe and threatening stimuli is critical for adaptive responses. A failure in this process contributes to the development of anxiety disorders such as post-traumatic stress disorder. Systems consolidation and contextual fear generalization has been observed as a time-dependent process related to trace reorganization between hippocampus and prefrontal cortex. Here, using contextual fear conditioning we showed for the first time that Lateral Entorhinal Cortex controls memory transformation from detailed to generalized memories. The inhibition of Lateral Entorhinal Cortex by muscimol seven days or only on day 3 after training is able to prevent fear generalization. The same effect was verified after dorsal hippocampal but not Anterior Cingulate Cortex inhibition, suggesting that communication between Lateral Entorhinal Cortex and dorsal hippocampus is essential for this outcome. Interestingly, fear generalization depends on CP-AMPA stability regulated by NR2B-containing NMDAR and the protein phosphatase 2B/calcineurin in that structure. Our results suggest that Lateral Entorhinal Cortex mediates progressive fear generalization by a hypothetical mechanism regulating weakening between LEC-dorsal hippocampal connections and trace decay. Preventing overgeneralization by direct modulation of Lateral Entorhinal Cortex activity could be considered as potential target to reduce maladaptive fear responses.

## Introduction

The efficient discrimination between safe and threatening stimuli is critical for adaptive responses in dynamic environments. At the same time, memory generalization allows extension of previous acquired knowledge to novel learning experiences. However, this process becomes pathological when fear responses are overgeneralized to neutral stimuli, contributing to anxiety disorder development. Generalization of fear responses is considered as a hallmark of diagnostic criteria of post-traumatic stress disorder (PTSD) (Jovanovic et al., 2012; Lopresto et al., 2016). In fact, PTSD patients express fear responses to contextual cues not paired with aversive stimulus during Pavlovian fear conditioning (Kaczurkin et al., 2017).

Classically, contextual fear generalization has been observed as a time-dependent process in which extensive intervals between training and testing increases fear response to non-paired context (Riccio et al., 1992). Nevertheless, recent studies confront this view since training intensity during contextual fear conditioning (CFC) is able to accelerate fear generalization (Pedraza et al., 2016). Interestingly, discrimination between paired and non-paired context has a close relationship with hippocampal involvement during retrieval (Wiltgen et al., 2010), suggesting that this structure orchestrates specifically the reconstruction of detailed memories (but see Lynch et al., 2017). Loss of details during CFC could be explained by a gradual forgetting of context information while the conditioned response is able to persist; in that case, a more schematic memory can be

expressed triggered by ambiguous stimuli (Anderson and Riccio, 2005; Riccio and Joynes, 2007; Jasnow et al., 2012). However, whether molecular mechanisms of forgetting may be associated with this process is unknown. Migues et al., (2016) showed that blockade of GluA2/AMPA synaptic removal in dorsal hippocampus was able to maintain contextual fear discrimination 2 weeks after training. The same treatment in hippocampal slices prevents LTP depotentiation in CA1. The authors suggest a decay-like forgetting process of hippocampal long-term memories that controls fear generalization.

On the other hand, systems consolidation theory proposes that contextual memories are reorganized over time. Indeed, hippocampus is initially required for retrieval, but is no longer involved in the expression of remote memories (Markowitsch et al., 1993; Teng & Squire, 1999; Frankland et al., 2004). This suggestion is in accordance with the standard model of systems consolidation and the hippocampal-dependent retrieval of detailed memories whereas schematic memories could be accessed by neocortical structures (Squire and Alvarez, 1995). In fact, studies suggest that medial prefrontal cortex (mPFC), and in particular, Anterior Cingulate Cortex (ACC) is essential for the expression of generalized memories (Einarsson et al., 2015; Cullen et al., 2015).

Despite efforts to characterize the role of hippocampus and prefrontal cortex during systems consolidation and their relationship with fear generalization, the synaptic pathways underpinning this gradual communication between both structures remain elusive. Recently, we showed that midline thalamic nucleus reuniens (RE) acts as a relay station between the ACC and the hippocampus to control the natural course of systems

consolidation allowing the persistence of relevant emotional engrams (Sierra et al., 2017). Additionally, Xu et al., (2013) showed that the mPFC controls memory expression via signaling to the RE that, in turn, signals back, both to the hippocampus and the mPFC modulating memory precision. These findings lead us to hypothesize that interconnection among brain areas that guide systems consolidation could be the same that transform detailed into generalized memories.

Importantly, axons of mPFC form asymmetric synapses with GABA-immunonegative dendritic spines in both perirhinal and entorhinal (CE) cortices, showing a critical route to control information flow into and out of the hippocampus through excitatory inputs to those cortical areas (Apergis-Schoute et al., 2006). Moreover, a recent study showed that RE and entorhinal axons converge partially onto the exact same apical dendrites of CA1 pyramidal cells (Dolleman-van der Weel et al., 2016). Functional disconnection between prefrontal and entorhinal cortex impairs episodic-like memories in tasks such as object recognition and spatial working memory (Chao et al., 2016). In addition, during remote memory retrieval of trace eyeblink conditioning, strongly synchronized oscillations between Lateral Entorhinal Cortex (LEC) and mPFC were verified, however, theta synchronization between the LEC and hippocampus decrease (Takehara-Nishiuchi, 2012). These results suggest that LEC plays an important role during memory reorganization over time. Takehara-Nishiuchi (2014) proposes that the CE is an anatomical bridge between hippocampus and mPFC providing both structures with access to the sensory and association neocortical regions during memory retrieval. Although, throughout of systems consolidation process, CE

changes from hippocampal recruitment to ACC recruitment in order to ensure memory retrieval. This establishes a hypothetical scenario where CE could be critical for the expression of detailed and generalized memories as function of systems consolidation itself.

In this work, we investigate the role of the LEC in the expression of generalized memories and their relationship with the systems consolidation phenomenon. Moreover, we evaluated a potential molecular mechanism controlling hippocampal trace decay and the expression of fear generalization mediated by LEC-dorsal hippocampal interactions.

## **Material and Method**

**Subjects.** Male adult Wistar rats (270-320g) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, 4-5 per cage, under a 12h light/dark cycle at a constant temperature of 24° C, with water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with local and national guidelines for animal care (Federal Law no 11.794/2008), and the project was approved by the University's Ethics Committee (process # 27375/2014).

**Stereotaxic surgery and cannulae placement.** Rats were anesthetized with i.p. ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively) and bilaterally implanted with 22-gauge guide cannulae aimed at Lateral Entorhinal Cortex (AP -6.7 mm (from bregma), LL  $\pm$  5.2 mm, DV - 6.5), Anterior Cingulate Cortex (AP +2.7 mm (from bregma), LL  $\pm$  0.5 mm, DV - 1.6) or Dorsal Hippocampus (AP -4.0 mm (from bregma), LL  $\pm$  3.0 mm, DV -1.6 mm) positioned 1.0 mm above of each structure (Paxinos and Watson, 2007). Following a 1-

week recovery from surgery, animals were submitted to the behavioral procedures.

### ***Drugs***

Muscimol (1µg/µl), Ifenprodil (1µg/µl), FK-506 (10µg µg/µl) and NASPM (0.4µM) all of Sigma Aldrich, were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and bilaterally infused (0.5µl/side) into the LEC, ACC or dorsal hippocampus, depending on the experiment performed.

***Intracerebral infusion.*** At the time of infusion, a 27-gauge infusion needle was inserted into the guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the tip of the cannula and aimed either to the LEC, ACC or dorsal hippocampus. A volume of 0.5 µl was bilaterally infused at a slow rate (20 µl/h), and the needle removed only after waiting for an additional 30 sec.

### ***Behavioral procedure.***

Contextual Fear Conditioning (CFC): The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box, 25x25cm with a metallic grid floor. During training, rats were placed in the chamber for 3-min, received 8 footshocks (1.0mA/2 sec) separated by a 30sec interval; 60sec after the last shock they were returned to their homecages. This strong protocol was demonstrated to induce fear memory generalization 15 days after training (Pedraza et al., 2016).

Context apparatus: Conditioning context consisted of an illuminated Plexiglas box of 25x25cm cm, grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart, and fan background noise. The novel context was a rectangular box 2/3 the size of the conditioning context, smooth floor, vanilla essence, and without fan background noise.

Pharmacological treatment: Muscimol was infused daily into LEC during 9 days following CFC (Fig. 1b) or only on day 3 or 6 after training into LEC or ACC or dorsal hippocampus (Fig 2 and 3 b-c). In another set of experiments, Ifenprodil, FK-506 and NASPM were infused into LEC only on day 3 after training (Fig. 4 a-c).

Test session: Animals were tested for 4 min either in a novel context (Novel) and in the conditioning context (Ctx) on day 15 and 16 after training, respectively.

***Histology.*** The position of the cannulae was verified at the end of the experiments. The brains were removed and immersed in a fixation solution of 30% sucrose and 4% paraformaldehyde. Brains were then frozen and sliced (50µm coronal sections) using a cryostat. Sections were stained with Cresyl violet and, subsequently, examined to verify the location of the cannulae. Statistical analysis considered only animals with correct cannulae placements. Representative coronal sections and reconstruction of the cannula tip placements corresponding to the injection sites in the Lateral Entorhinal Cortex, Anterior Cingulate Cortex and Dorsal Hippocampus are depicted in Figures 1a and 3a.

***Statistical analysis.*** After checking for normality (Kolmogorov-Smirnov Test) and homocedasticity (Levene test), data was analyzed by two-way or three-way repeated

measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls (SNK) *post hoc* test, with significance set to  $p < 0.05$ .

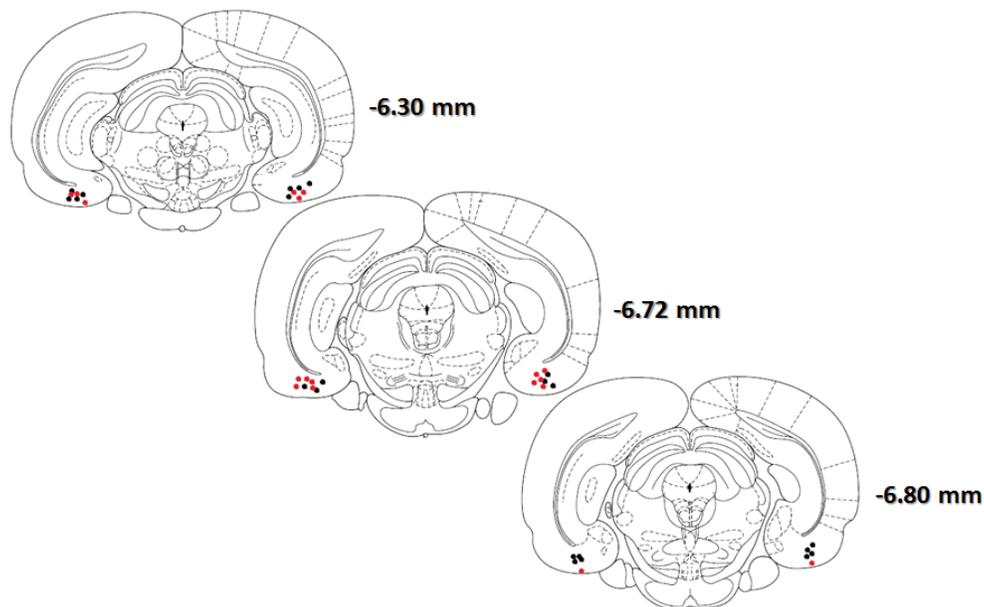
## **Results**

### **Daily inhibition of the LEC after training is able to prevent fear generalization**

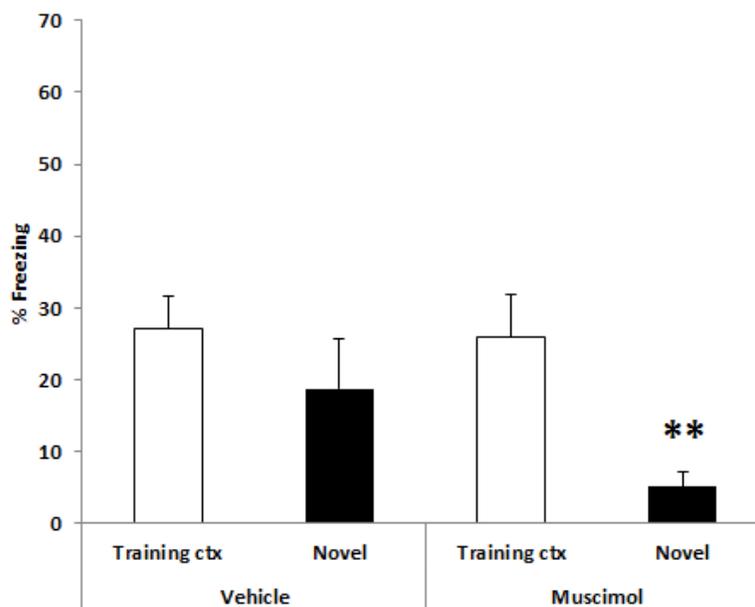
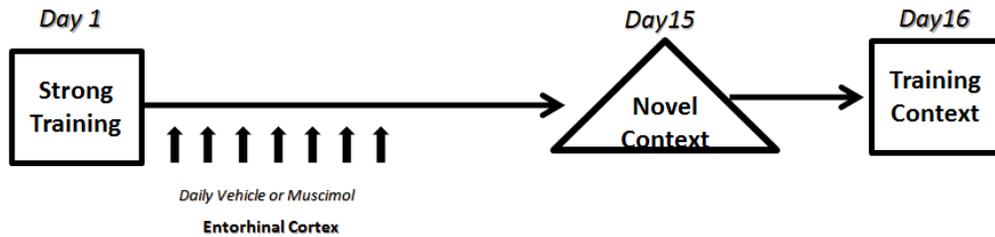
Lateral Entorhinal Cortex has been implicated in memory retrieval of hippocampal-dependent memories. For instance, Quillfeldt et al., (1996) showed that AMPA receptor in the LEC are necessary for recent and remote memory retrieval of step-down inhibitory avoidance 1 and 31, but not 60, days after training. Ross and Eichenbaum (2006) showed that 21 days after training of social transmission food preference, a hippocampal-dependent task, retrieval is associated with strong activation of piriform, entorhinal, and orbitofrontal cortex. These findings together with electrophysiological evidence on synchronized oscillations between LEC and mPFC and the decrease of theta synchronization between the LEC and hippocampus during remote memory expression (Takehara-Nishiuchi, 2012) suggest that LEC is essential to memory reorganization from hippocampal-dependent to hippocampal-independent retrieval. Because a close relationship between hippocampal dependency and memory generalization was recently suggested (Pedraza et al., 2016, Pedraza et al., 2017) we hypothesize that LEC inhibition could delay systems consolidation and memory generalization. In order to address this assumption, animals were exposed to CFC and tested on day 15 and 16 after training to novel context and training context,

respectively. During 7 days following CFC, animals were infused into LEC with muscimol (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) in order to suppress neural activity in this structure. Two-way Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of context factor (training vs. novel) ( $F_{1,18} = 14.862$ ,  $p = 0.001$ ) and treatment x context interaction ( $F_{1,18} = 4.544$ ,  $p = 0.047$ ) but not of treatment factor (vehicle vs. muscimol) ( $F_{1,18} = 2.788$ ,  $p = 0.112$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that muscimol-treated animals displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context ( $p < 0.01$ ). However, the control groups expressed the same freezing levels in both contexts (Fig 1b). This result suggests that LEC inhibition prevents memory generalization arising the possibility that LEC mediates the progressive transformation of detailed into generalized memories.

**Figure 1a**



**Figure 1b**



**Figure 1 – LEC inhibition seven days following training prevents memory generalization.** All graphs show percent of freezing time expressed as mean  $\pm$  SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. **(a)** Example of microinjection cannula placements in the Lateral Entorhinal Cortex (Vehicle: black and Muscimol; red). The numbers on the left side of the individual sections indicate the distances from Bregma; **(b)** Muscimol-treated animals displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context (Vehicle  $n=11$ , Muscimol  $n=9$ ,  $p < 0.01$ ;

Two-Way ANOVA with Student-Newman-Keuls *post hoc* test). However, the control groups expressed the same freezing levels in both contexts.

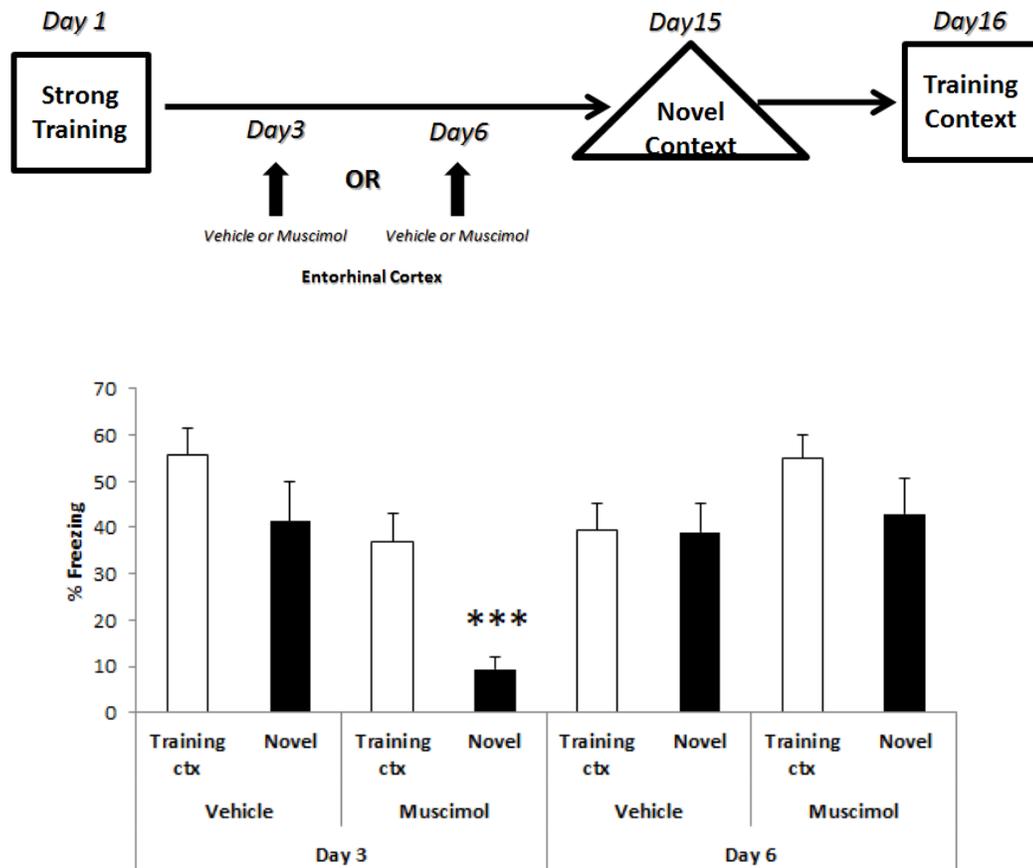
### **The prevention of fear generalization depends on a critical window that enables fear memory modulation**

In order to establish whether the effect reported above is dependent on daily infusion or if critical days could be identified that trigger memory precision in the muscimol-treated group, animals were conditioned and tested in the same conditions of the first experiment. However, muscimol infusions into the LEC were performed only on day 3 or 6 after training.

Three-way Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of context factor ( $F_{1,40} = 14.610$ ,  $p = < 0.001$ ), day (administration on day 3 or 6) x treatment interaction ( $F_{1,40} = 10.907$ ,  $p = 0.002$ ) and day x context interaction ( $F_{1,40} = 4.221$ ,  $p = 0.046$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that muscimol-treated animals displayed significantly lower freezing levels on day 3 during novel context exposition compared to training context ( $p = < 0.001$ ). However, the control group expressed the same freezing levels in both contexts. No differences were detected on day 6 between and within groups (Fig 2). We found that LEC inhibition on day 3, but not on day 6, is critical to prevent fear generalization during testing. These results suggest that manipulation of intrinsic activity of LEC soon after training is able to change memory quality over time. Interestingly, these results were independent of memory reactivation since muscimol infusion on day 3 after

short context reexposure produces the same facilitatory effect (data not shown).

**Figure 2**



**Figure 2 – LEC inhibition only on day 3 after training prevents memory generalization.** All graphs show percent of freezing time expressed as mean  $\pm$  SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. Muscimol-treated animals displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition on day 3 compared to training context (Day 3: Vehicle  $n=12$ , Muscimol  $n=10$ ; Day 6: Vehicle  $n=12$ , Muscimol  $n=10$ .  $p = < 0.001$ ; Three-Way ANOVA with Student-Newman-Keuls *post hoc* test). However, the control groups expressed the same freezing levels in both contexts. No differences were detected on day 6 between and within groups.

## **Inhibition of Dorsal Hippocampus is able to prevent fear generalization at the same time point of LEC inhibition**

Entorhinal cortex is reciprocally connected with hippocampus (Kerr et al., 2007) and the medial prefrontal cortex (Agster and Burwell, 2009). During the Morris Water Maze task, LEC maintains higher levels of c-fos and Zif 268 expression after retrieval of recent and remote memories (Barry et al., 2016). It is well accepted that remote memories could be more schematic, a phenomenon promoted by memory reorganization during systems consolidation (Winocur et al., 2007). Indeed, retrieval of recent contextual fear memories induces higher hippocampal activation than remote memories (Bontempi et al., 1999) and several areas of medial prefrontal cortex, including the anterior cingulate cortex (ACC), are more activated during retrieval of remote memories (Frankland et al., 2004). Interestingly, ACC has been shown to be necessary for the expression of generalized memories (Einarsson et al., 2015; Cullen et al., 2015; Pedraza et al., 2017). We hypothesize that LEC inhibition preventing fear generalization could be associated with LEC-dorsal hippocampal rather than LEC-ACC pathways; in that case, dorsal hippocampal inhibition on day 3 could reproduce the effect of LEC inhibition. In order to address this assumption, animals were conditioned and tested in the same conditions of our last experiments, however, muscimol was infused into dorsal hippocampus or ACC on day 3 after training.

Two-way Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of context factor (training vs. novel) ( $F_{1,14} = 17.843$ ,  $p = < 0.001$ ) but not of treatment factor (vehicle vs. muscimol) ( $F_{1,14} = 1.006$ ,  $p = 0.332$ ) and context x treatment interaction ( $F_{1,18} = 0.434$ ,  $p$

= 0.520); SNK *post-hoc* analysis showed that muscimol-treated animals into hippocampus displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context ( $p = < 0.05$ ). However, the control group expressed the same freezing levels in both contexts (Fig 3b). On the other hand, muscimol into ACC on day 3 did not show any difference during context discrimination: treatment factor (vehicle vs. muscimol) ( $F_{1,17} = 0.184$ ,  $p = 0.672$ ), context factor (training vs. novel) ( $F_{1,17} = 1.245$ ,  $p = 0.279$ ) and context x treatment interaction ( $F_{1,17} = 0.000$ ,  $p = 0.986$ ) (Fig 3c). Taken together, these results suggest that LEC and dorsal hippocampal work in the same direction on day 3 to transform detailed into generalized memories. We hypothesize that both structures express a transient form of synaptic plasticity that controls this process.

Figure 3a

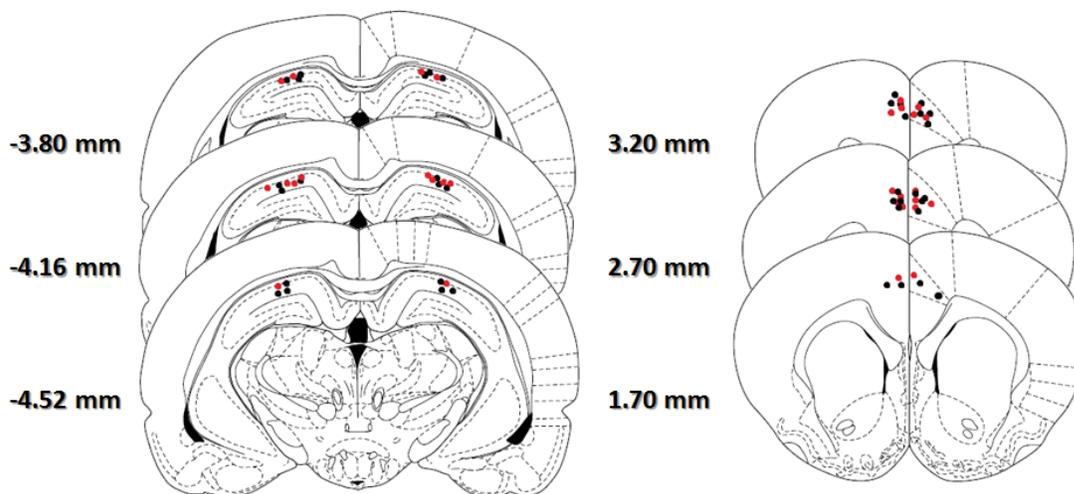


Figure 3b

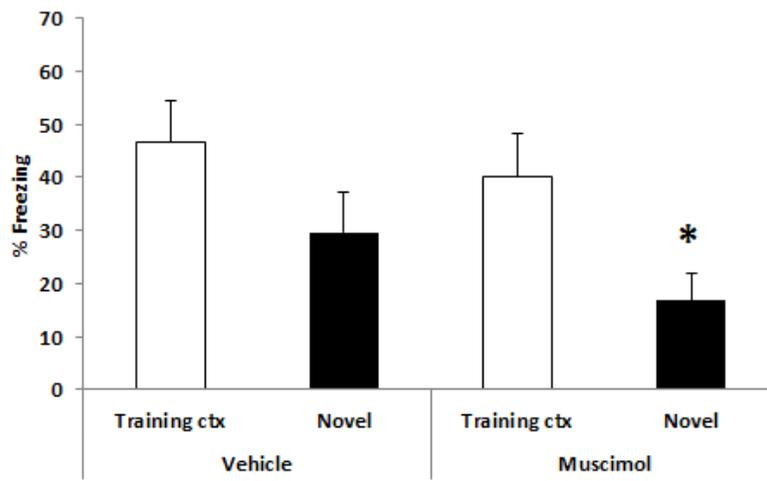
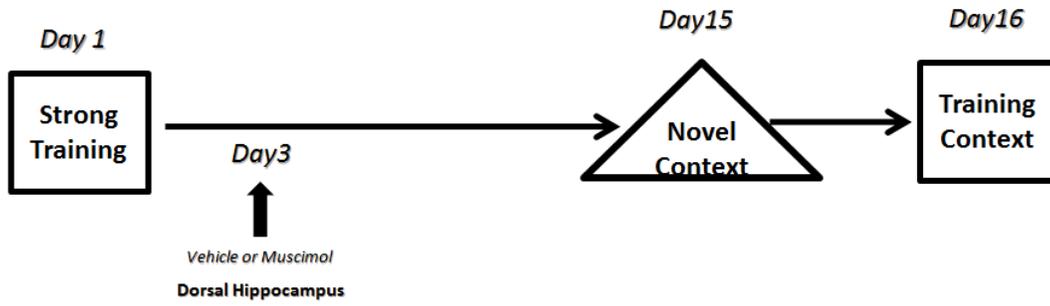
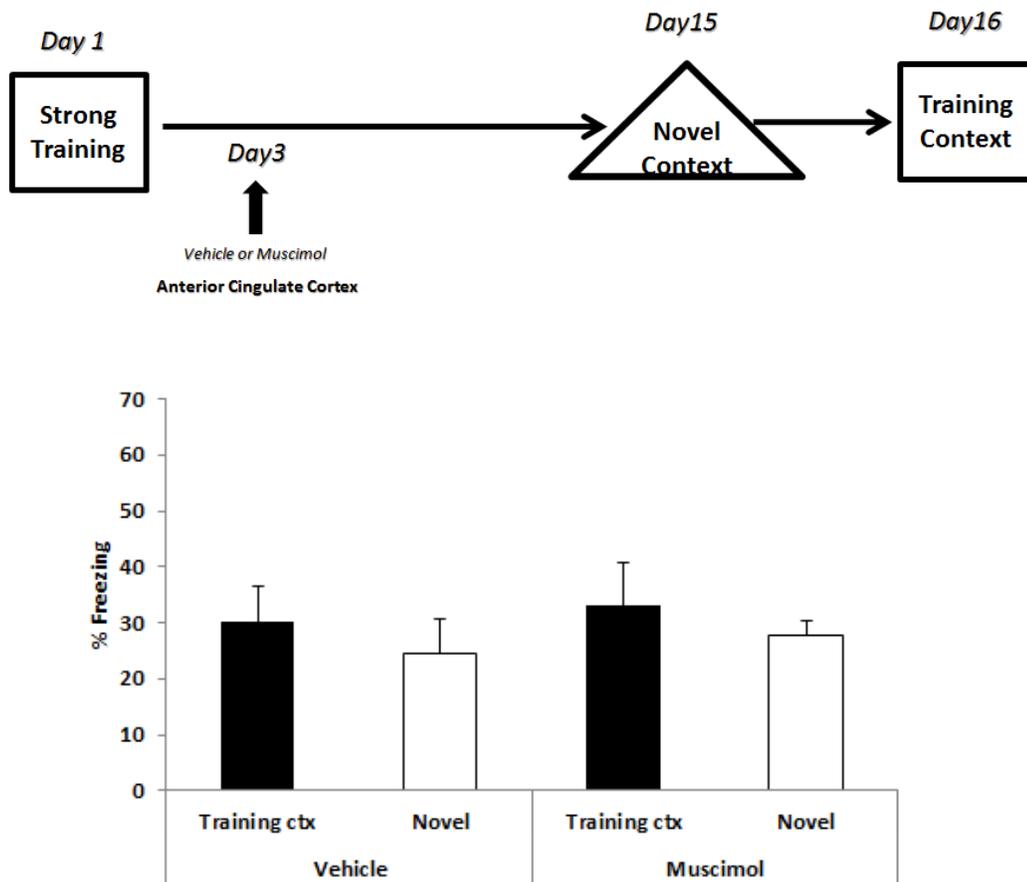


Figure 3c



**Figure 3 – Dorsal hippocampus but not ACC inhibition prevents memory generalization.** All graphs show percent of freezing time expressed as mean  $\pm$  SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. **(a)** Example of microinjection cannula placements in the Dorsal Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex (Vehicle: black and Muscimol; red). The numbers on the left side of the individual sections indicate the distances from Bregma; **(b)** Muscimol-treated animals in dorsal hippocampus on day 3 displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context (Vehicle  $n=9$ , Muscimol  $n=7$ .  $p = < 0.05$ ; Two-Way ANOVA with Student-Newman-Keuls *post hoc* test). **(c)** However, muscimol into ACC did not show any

difference during context discrimination (Vehicle n=10, Muscimol n=9).

### **Synaptic incorporation of CP-AMPA receptors into the LEC as a mechanism guiding fear generalization**

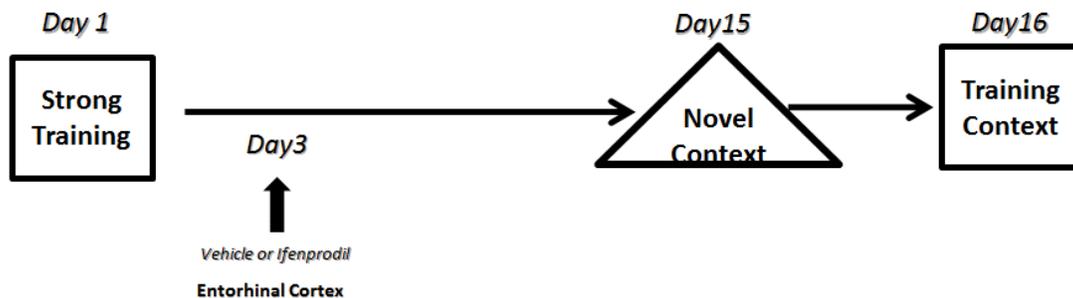
Memory storage and maintenance of contextual fear memories seem to be dependent on stability and regulation of AMPA receptor (AMPA) trafficking. Both contextual fear memory and LTD have been associated with AMPAR removal from synapses (Beattie et al., 2000; Miguez et al., 2010; Sanderson et al., 2012; Miguez et al., 2014), a phenomenon suggested to drive forgetting of short-term and long-term memories (Hardt et al., 2013). Recently, Miguez et al., (2016) showed that the blockade of GluA2/AMPA receptors synaptic removal in dorsal hippocampus was able to maintain contextual fear discrimination 2 weeks after training. However, a number of high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-permeable containing GluA1 (CP-AMPA receptors) but lacking GluA2 subunits are also present in hippocampal and cortical synapses (Plant et al., 2006; Mattison et al., 2014; Lalanne et al., 2016). Clem and Huganir (2010) using auditory fear conditioning showed that CP-AMPA receptors are transiently increased in thalamic afferents to lateral amygdala neurons during 48h after training and disappeared on day 7. Surprisingly, CP-AMPA receptors in this window mediate long-term depression (LTD) and extinction-induces fear erasure. These results suggest that CP-AMPA receptors after fear conditioning promote synaptic weakening through LTD mechanisms.

Since NR2B-containing NMDA receptors (NMDAR) allows the increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> activated protein phosphatase 2B/calcineurin (CaN) and modulation of AMPAR trafficking and LTD (Sanderson et al., 2016; Yu et al., 2016), we investigate if this cellular mechanism of synaptic weakening could promote fear memory generalization into LEC. Animals were conditioned and tested in the same conditions of our last experiments, however, the NR2B receptor antagonist ifenprodil, the CaN inhibitor FK-506 or the CP-AMPA antagonist 1-naphthylacetyl spermine (NASPM) were infused into LEC 3 days after training.

Two-way Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs muscimol) ( $F_{1,14} = 8.213$ ,  $p = 0.012$ ), context factor (training vs. novel) ( $F_{1,14} = 19.645$ ,  $p = < 0.001$ ) and treatment x context interaction ( $F_{1,14} = 7.096$ ,  $p = 0.018$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that ifenprodil-treated animals displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context ( $p = < 0.001$ ). The control group expressed the same freezing levels in both contexts (Fig 4a). When FK-506 was infused, Two-way Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs. muscimol) ( $F_{1,22} = 12.966$ ,  $p = 0.001$ ), context factor (training vs. novel) ( $F_{1,22} = 37.672$ ,  $p = < 0.001$ ) and treatment x context interaction ( $F_{1,22} = 6.082$ ,  $p = 0.021$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that FK-506 -treated animals displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context ( $p = < 0.001$ ). However, the control group expressed the same freezing levels in both contexts (Fig 4b).

Finally, after NASPM infusion, Two-way Repeated Measures ANOVA revealed significant effects of treatment factor (vehicle vs muscimol) ( $F_{1,16} = 7.149, p = 0.016$ ), context factor (training vs. novel) ( $F_{1,16} = 24.121, p = < 0.001$ ) and treatment x context interaction ( $F_{1,16} = 5.587, p = 0.031$ ); SNK *post-hoc* analysis showed that NASPM -treated animals displayed significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context ( $p = < 0.001$ ). The control group expressed the same freezing levels in both contexts (Fig 4c). These results suggest that CP-AMPA turnover in LEC could be a potential mechanism weakening LEC-dorsal hippocampal connections allowing both hippocampal independency and fear generalization. Additionally, CP-AMPA stability seems to be regulated by NR2B-containing NMDAR and CaN controlling insertion and removal of synaptic CP-AMPA, respectively (Sanderson et al., 2016).

**Figure 4a**



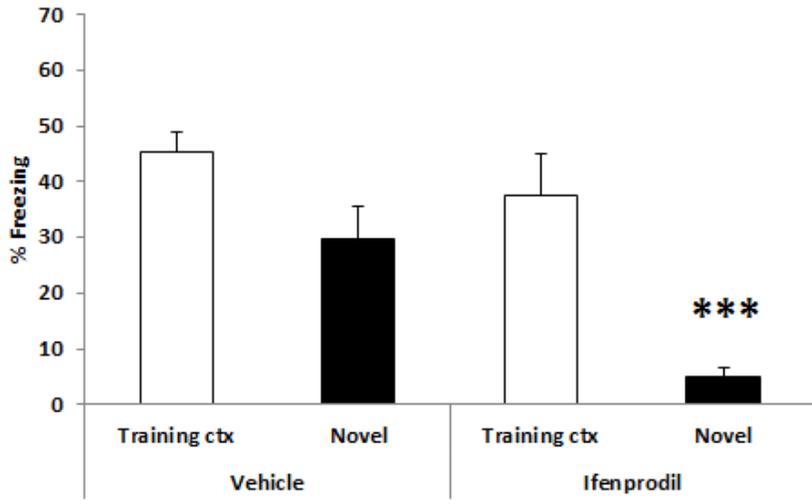


Figure 4b

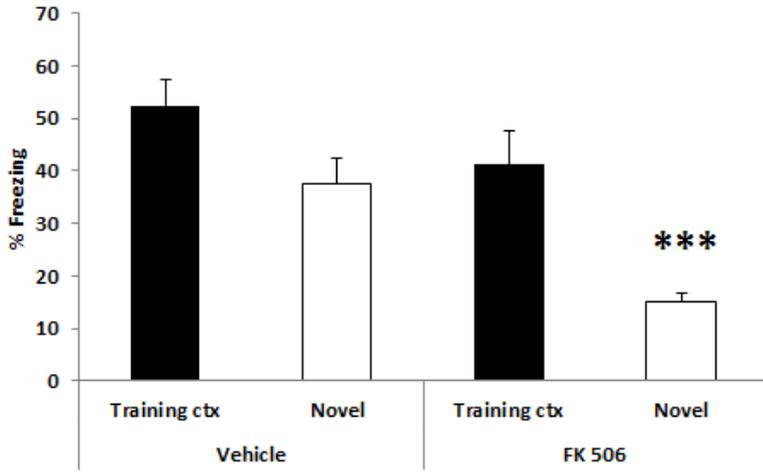
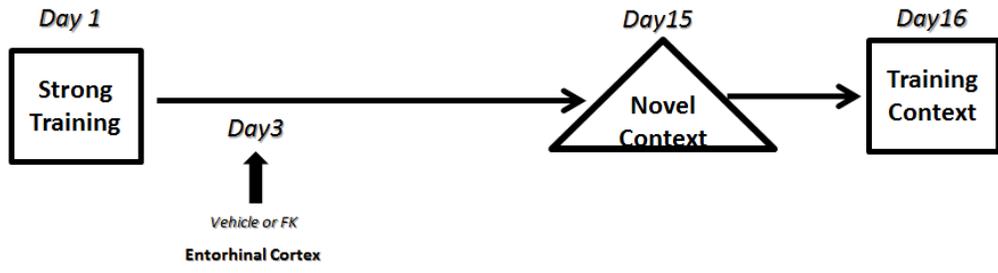
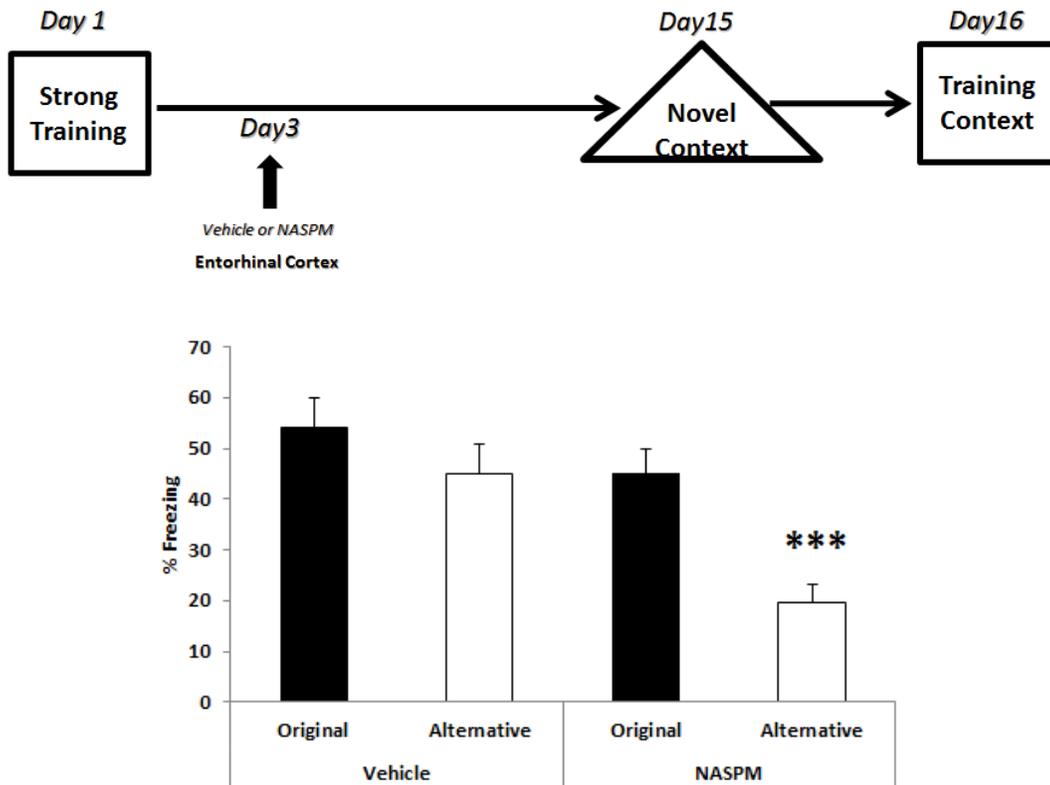


Figure 4c



**Figure 4 – Fear generalization depends on CP-AMPA stability regulated by NR2B-containing NMDAR and the protein phosphatase 2B/calcineurin in the LEC.** All graphs show percent of freezing time expressed as mean  $\pm$  SEM, and experimental design is shown in the top of each panel. (a) Ifenprodil, (b) FK-506 and (c) NASPM induce significantly lower freezing levels during novel context exposition compared to training context (a- Vehicle n=12, Ifenprodil n=8; b- Vehicle n=13, FK-506 n=11; c- Vehicle n=9, NASPM n=9.  $p < 0.05$ ; Two-Way ANOVA with Student-Newman-Keuls *post hoc* test). All control groups expressed the same freezing levels in both contexts.

## Discussion

Our findings significantly improve the understanding on brain structures and molecular substrates associated with fear generalization. Here, we showed that Lateral Entorhinal Cortex activity following contextual fear conditioning controls fear memory generalization (Fig 1b). Moreover, a critical time-window of 3 days after training was identified where disruption of intrinsic activity of LEC prevents fear generalization (Fig 2). Additionally, the same effect was verified after dorsal hippocampal (Fig 3b) but not ACC inhibition (Fig 3c), suggesting that communication between LEC and dorsal hippocampus is essential to transform detailed into generalized memories. Finally, a potential molecular mechanism dependent on turnover of CP-AMPA into the LEC seems to control hippocampal trace decay (Fig 4a-c).

Several studies have shown that the LEC has a time-dependent involvement during synaptic consolidation of contextual fear memories (Jerusalinsky et al., 1994; Quillfeldt et al., 1994; Izquierdo et al., 1995). In fact, AP-5 infusion into LEC is able to impair memory retrieval when infused 30, 60 or 90 min after training but not at earlier times (Zanatta et al., 1996). Willner et al. (1993) have shown that muscimol inhibition of the LEC during acquisition of step-down inhibitory avoidance impairs the response of the same brain structure to a pretest amnesic treatment. Moreover, the LEC seems to be critical to mediate hippocampal-prefrontal communication, indeed, synchronization of theta oscillations between LEC and prelimbic cortex during remote memory retrieval supports this idea (Takehara-Nishiuchi, 2012). Despite the apparently constant involvement of LEC during retrieval (Morrissey et al., 2012), two decades ago experiments performed by one of us (JAQ) showed that 60 days

after training LEC is unresponsive to amnestic treatments during remote memory retrieval (Quillfeldt et al., 1996), suggesting an additional temporal window where LEC is not required after systems consolidation.

The classical view of systems consolidation as a time-dependent phenomenon has been tested recently. In fact, several conditions such as training intensity (Pedraza et al., 2016), memory reactivation (de Oliveira Alvares et al., 2012; Einarsson et al., 2015) and sequential learning (Haubrich et al., 2016; Pedraza et al., 2017) change the rate of systems consolidation. Importantly, not only hippocampal and cortical recruitment during memory retrieval are modified under these conditions, but also the expression of generalized memories. In this study, using a previous protocol that accelerates hippocampal independence during retrieval and induces memory generalization 15 days after training (Pedraza et al., 2016) we showed that LEC inhibition is sufficient to prevent fear generalization. Indeed, intrinsic activity of LEC soon after training (3 days) but not late (6 days) is critical for the expression of contextual generalization. Interestingly, the same effect was verified after dorsal hippocampal inhibition, suggesting that both structures are able to orchestrate plasticity processes associated with reorganization of memory in terms of quality and structural dependence.

Functional studies describe the Medial Entorhinal Cortex (MEC) as providing of spatial information to the hippocampus while LEC provides non-spatial information (Fyhn et al., 2004; Steffenach et al., 2005; Knierim et al., 2013). The LEC receives considerably more

input from the piriform cortex, insular regions, the amygdala and olfactory structures (Kerr et al., 2007), therefore an important source for processing contextual emotional significance. The anatomical studies are supported by evidence showing that electrophysiological properties of LEC and MEC are different during contextual representation (McNaughton et al., 2006; Tsao et al., 2013). On the other hand, entorhinal-CA1 pathways are able to modulate synaptic plasticity in dorsal hippocampus via layer II of entorhinal cortex to the dentate gyrus and temporoammonic (TA) pathway contact distal dendrites of CA1 neurons. In fact, simultaneous stimulation of the TA and Schaffer-collateral (SC) fibers reduce both; magnitude and duration of SC plasticity. Moreover, this simultaneous stimulation triggers an earlier return to baseline synaptic transmission when compared with plasticity elicited by SC stimulation alone (Remondes and Schuman., 2002). This result matched with a previous experimental and computational model suggesting that TA reduces LTP at the SC-CA1 synapses by homosynaptic LTD (Wu et al., 1998). Our results showed that this scenario could be underpinning memory precision expressed after modulation of CP-AMPA turnover into LEC 3 days after training. For instance, Sanderson et al., (2016) showed in vitro that A-kinase anchoring protein (AKAP) anchored to PKA is required during LTD induction of SC-CA1 synapses to facilitate NMDAR-dependent recruitment of CP-AMPARs. In turn, CP-AMPAR and NMDA signaling are then required to trigger AKAP-CaN removal of these CP-AMPARs recruited during induction allowing the appropriate expression of LTD. This phenomenon was reduced but not eliminated with continuous application of NASPM. Our finding showing that both inhibition of CP-AMPAR recruitment via NR2B-containing NMDA receptors and removal by CaN prevent fear generalization into LEC showing a potential mechanism of synaptic weakening

between LEC and dorsal hippocampus controlling expression of detailed memories. These observations beg the question: could the LEC control memory expression based on LTD and LTP mechanisms recruiting preferentially the hippocampus or medial prefrontal cortex depending of the state of systems consolidation?

Frankland and Bontempi (2005) proposed that prefrontal cortex regulates hippocampal activity during remote memory retrieval. In this model, prefrontal cortex is able to inhibit hippocampal activity by direct and indirect pathways when animals are exposed to familiar information preventing redundant encoding. Novel experiences engage hippocampal activity in the absence of cortical inhibition allowing the storage of new hippocampal dependent memories. Since strongly synchronized oscillations were verified between LEC and mPFC with concomitant decrease in LEC and hippocampus theta synchronization during remote memory (Takehara-Nishiuchi, 2012) we suggest that LEC could contribute to active inhibition of hippocampal activity after systems consolidation supporting both, cortical recruitment during remote memories and expression of generalized memories. Although this idea does not eliminate the pivotal role of medial prefrontal cortex during contextual encoding, indeed, we previously suggested that LTP induced in hippocampal-cortical pathways (a potential mechanism of progressive systems consolidation) could be under control of that structure by active regulation of CA1 synaptic strength via nucleus reuniens (RE) (Sierra et al., 2017). Accordingly, a recent study has shown that RE and entorhinal axons converge partially onto the exact same apical dendrites of CA1 pyramidal cells (Dolleman-van der Weel et al., 2016) agreeing with previous suggestions that RE-CA1 and entorhinal-CA1 synapses may act reducing the threshold for synaptic plasticity,

modulating consolidation and the quality of memory expression (Xu and Sudhof, 2013). However, this assumption is not entirely new. Anderson et al., (2015) evaluating inhibitory control mechanism that suppresses unwanted traces in humans, concluded that entorhinal cortex could disrupt memory retrieval preventing the hippocampus from integrating inputs from neocortical regions involved in processing retrieval cues. Nevertheless, an additional system via RE could inhibit hippocampal activity directly to prevent unwanted activation when entorhinal cortex drives retrieval process. This proposed mechanism to explain our findings is highly speculative, and to be settled, depending on future experiments to establish the control of hippocampal activity by prefrontal cortex via RE and LEC.

The forgetting of textual details associated with fear generalization has been known as "the forgetting of stimulus attributes" (Thomas and Riccio, 1979; Riccio et al., 1984, 1992). This view proposes that loss of memory precision is dependent on the time between training and testing. Training context cues are forgotten more rapidly than the conditioned fear response itself (Jasnow et al., 2017) consequently, increases of time between training and testing also increase the chance of generalized fear expression. However, the molecular mechanisms of this process are unknown. Recently, Sachser et al., (2016) showed that forgetting of long-term memories depends on of NMDARs, L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel (LVDCC) as well as CaN activation during the memory retention interval of object location and recognition tasks. Additionally, infusion of ifenprodil 30 min after LTP induction *in vivo* blocks the decay of CA1-evoked postsynaptic plasticity. These results provide support for a model that links Ca<sup>2+</sup> -dependent signaling to a reduction of synaptic potentiation, which will likely involve the synaptic removal of postsynaptic GluA2-

AMPA receptors. Subsequent evidence has shown that forgetting of these spatial, non-emotional memories, are regulated by the small G protein Rac1 (Liu et al., 2016). Inhibition of Rac1 activity prevents forgetting of object recognition memory and suppresses the interference-induced forgetting. An increase or decrease in Rac1 activity accelerates or prolongs LTP, respectively. Since emotional memories seem to be resistant to natural forgetting as displayed by neutral memories (LaBar and Cabeza, 2006); forgetting mechanisms related to aversive memories could modulate memory quality rather than permanent trace erasure. This suggestion is supported by a recent finding showing that blockade of GluA2/AMPA receptors synaptic removal in dorsal hippocampus maintains contextual fear discrimination 2 weeks after CFC (Migues et al., 2016). The same phenomenon was verified in infralimbic cortex where blockade of GluA2/AMPA receptors removal after extinction prevented spontaneous recovery of the conditioned response. Interestingly, intrahippocampal injection of the Rac1 inhibitor NSC23766 enhances contextual fear memories (Jiang et al., 2016). These results suggest that neutral and emotional memories are regulated by overlapping mechanism, however, the emotional content acts as a brake preventing erasure of long-term memories and promoting memory transformation over time (e.g., inducing fear generalization). Here, we showed a complementary view of these processes placing the LEC as an active controller of systems consolidation and the expression of detailed and generalized memories. Previous studies have shown that under retrieval, activity of NR2B-containing NMDA receptor induces a rapid decrease of Ca<sup>2+</sup>-impermeable AMPA receptors (CI-AMPA receptors) that is matched by an increase of CP-AMPA receptors (Clem and Hugarir, 2010; Hong et al., 2013; Rao-Ruiz et al., 2011). Importantly, because they are less stable at synapses, CP-AMPA receptors are involved in LTD induction, which indicates that the transient labile state of

memory following retrieval is a result of such AMPAR trafficking (Clem and Hugarir, 2010). In our interpretation, the early sensitivity of LEC and dorsal hippocampus to pharmacological treatments that impair AMPA trafficking, suggest that both structures undergo synaptic plasticity, probably, associated with LTD (Sanderson et al., 2011) or LTP depotentiation (Sachser et al., 2016) in order to decrease hippocampal recruitment during retrieval. Deficit in the natural course of these mechanisms is able to maintain hippocampal dependency and memory precision, this means, the rate of systems consolidation is delayed. The LEC as a potential regulator of balance between hippocampal and cortical recruitment during retrieval could be underpinning both, forgetting of stimulus attributes (Thomas and Riccio, 1979; Jasnow et al., 2016) and hippocampal trace decay (Rudy et al., 2005; Hardt et al., 2013).

In conclusion, we have shown, for the first time that, a) LEC inhibition after training in CFC is able to prevent fear generalization, b) this effect was promoted by early (day 3) but not late (day 6) LEC inhibition, c) since similar results were obtained after dorsal hippocampal but not ACC inhibition, we suggested that LEC-dorsal hippocampal mediates this phenomenon rather than LEC-ACC communication and d) the LEC seems to follow a synaptic weakening process after training matching with molecular mechanisms associated with LTD via AMPAR trafficking. Activity of LEC during pathological memories characterized by fear overgeneralization could be considered as a potential target to reduce maladaptive fear responses.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

**Acknowledgments:** This research was supported by fellowships and grants from the CNPq (MCT), CAPES (MEC), FAPERGS (Edital PROBIC and Edital 001/2013 PQG), and FINEP (“Rede Instituto Brasileiro de Neurociências” IBN-Net, No. 01.06.0842-00). We acknowledge Mrs. Zelma Regina V. de Almeida, Fernanda Nogueira Lotz Alves, Stephanie Stofel and Roberto Fonseca for their competent and kind assistance.

## References

- Agster KL, Burwell RD. 2009. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus*. 19(12):1159-86.
- Anderson MJ, Riccio DC. 2005. Ontogenetic forgetting of stimulus attributes. *Learn Behav*. 33(4):444-53.
- Anderson MC, Bunce JG, Barbas H. 2015. Prefrontal-Hippocampal Pathways Underlying Inhibitory Control Over Memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. PMID 26642918 DOI: 10.1016/j.nlm.2015.11.008
- Apergis-Schoute J, Pinto A, Paré D. 2006. Ultrastructural organization of medial prefrontal inputs to the rhinal cortices. *Eur J Neurosci*. 24(1):135-44.
- Barry DN, Coogan AN, Commins S. 2016. The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes *Zif268*, *c-Fos* and *Arc*. *Neurobiol Learn Mem*. 128:46-55.
- Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC. 2000. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci*. 3(12):1291-300.
- 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.
- Chao OY, Huston JP, Li JS, Wang AL, de Souza Silva MA. 2016. The medial prefrontal cortex-lateral entorhinal cortex circuit is essential for episodic-like memory and associative object-

- recognition. *Hippocampus* 26:633–645.
- Clem RL, Huganir RL. 2010. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science*. 330(6007):1108-12.
- CullenPK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC, Jasnow AM. 2015. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol Learn Mem*. 124:19-27.
- 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.
- Dolleman-van der WeelMJ, Lopes da Silva FH, Witter MP. 2016. Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat. *Brain Struct Funct*. doi: 10.1007/s00429-016-1350-6.
- EinarssonEÖ, Pors J, Nader K. 2015. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology*. 40(2):480-7.
- Frankland PW, Bontemp B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*. 6(2):119-30.
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 304(5672):881-3.
- FyhnM, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB. 2004. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*. 305(5688):1258-64.
- Hardt O, Nader K, Wang YT. 2013. GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis and the decay

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

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.*

Hong I, Kim J, Kim J, Lee S, Ko HG, Nader K, Kaang BK, Tsien RW, Choi S. 2013. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(20):8218-23.

Izquierdo I, Fin C, Schmitz PK, Da Silva RC, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Ferreira MB, Medina JH, Bazan NG. 1995. Memory enhancement by intrahippocampal, intraamygdala, or intraentorhinal infusion of platelet-activating factor measured in an inhibitory avoidance task. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(11):5047-51.

Jasnow AM, Cullen PK, Riccio DC. 2012. Remembering another aspect of forgetting. *Front Psychol.* 3:175.

Jasnow AM, Lynch JF 3rd, Gilman TL, Riccio DC. 2017. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *J Neurosci Res.* 95(3):821-835.

Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Bueno e Silva M, Bianchin M, Schmitz P, Zanatta MS, Ruschel AC, Paczko N, Medina JH, Izquierdo I. 1994. Effect of the infusion of the GABA-A receptor agonist, muscimol, on the role of the entorhinal cortex, amygdala, and hippocampus in memory processes. *Behav Neural Biol* 61:132–138.

Jiang L, Mao R, Zhou Q, Yang Y, Cao J, Ding Y, Yang Y, Zhang X, Li L, Xu L. 2016. Inhibition of Rac1 Activity in the Hippocampus Impairs the Forgetting of Contextual Fear Memory.

Mol Neurobiol. 53(2):1247-53.

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

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

Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*. 17(9):697-708.

KnierimJJ, Neunuebel JP, Deshmukh SS. 2013. Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local-global reference frames. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 369(1635):20130369.

LaBar KS, CabezaR. 2006. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat Rev Neurosci*. 7(1):54-64.

Lalanne T, Oyrer J<sup>3</sup>, Mancino A, Gregor E, Chung A, Huynh L, Burwell S, Maheux J, Farrant M, Sjöström PJ. 2016. Synapse-specific expression of calcium-permeable AMPA receptors in neocortical layer 5. *J Physiol*. 594(4):837-61.

LiuY, Du S, Lv L, Lei B, Shi W, Tang Y, Wang L, Zhong Y. 2016. Hippocampal Activation of Rac1 Regulates the Forgetting of Object Recognition Memory. *Curr Biol*. 26(17):2351-7.

Lynch JF, Winiecki P, Gilman TL, Adkins JM, Jasnow AM. 2017. Hippocampal GABAB(1a) Receptors Constrain Generalized Contextual Fear. *Neuropsychopharmacology*. 42(4):914-924.

- Lopresto D, Schipper P, Homberg JR. 2016. Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 60:31-42.
- Markowitsch HJ, Calabrese P, Haupts M, Durwen HF, Liess J, Gehlen W. 1993. Searching for the anatomical basis of retrograde amnesia. *J Clin Exp Neuropsychol.* 15(6):947-67.
- Mattison HA, Bagal AA, Mohammadi M, Pulimood NS, Reich CG, Alger BE, Kao JP, Thompson SM. 2014. Evidence of calcium-permeable AMPA receptors in dendritic spines of CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 112(2):263-75.
- McNaughton BL, Battaglia FP, Jensen O, Moser EI, Moser MB. Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat Rev Neurosci.* 7(8):663-78.
- Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT, Nader K. 2010. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 13(5):630-4.
- Migues PV, Hardt O, Finnie P, Wang YW, Nader K. 2014. The maintenance of long-term memory in the hippocampus depends on the interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluA2. *Hippocampus.* 24(9):1112-9.
- Migues PV, Liu L, Archbold GE, Einarsson EÖ, Wong J, Bonasia K, Ko SH, Wang YT, Hardt O. 2016. Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *J Neurosci.* 36(12):3481-94.
- Morrissey MD, Maal-Bared G, Brady S, Takehara-Nishiuchi K. 2012. Functional dissociation within the entorhinal cortex for memory retrieval of an association between temporally discontinuous stimuli. *J Neurosci.* 32(16):5356-61.

- Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. San Diego: Academic Press.
- Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, de Oliveira AL. 2016. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*. 26(3):362-71.
- Pedraza LK, Sierra RO, Crestani AP, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. 2017. Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: Implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus*. doi: 10.1002/hipo.22708.
- Plant K., Pelkey K. A., Bortolotto Z. A., Morita D., Terashima A., McBain C. J., Collingridge G. L., Isaac J. T. 2006. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* 9, 602–604.
- Quillfeldt JA, Zanatta MS, Schmitz PK, Quevedo J, Schaeffer E, Lima JB, Medina JH, Izquierdo I. 1996. Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiol Learn Mem.* 66(2):97-101.
- Rao-Ruiz P, Rotaru DC, van der Loo RJ, Mansvelder HD, Stiedl O, Smit AB, Spijker S. 2011. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci.* 14(10):1302-8.
- Remondes M, Schuman EM. 2002. Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. *Nature.* 416(6882):736-40.
- Riccio DC, Ackil J, Burch-Vernon A. 1992. Forgetting of stimulus attributes: methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychol Bull.* 112(3):433-45.

- Riccio, D. C., Richardson, R., and Ebner, D. L. (1984). Memory retrieval deficits based upon altered contextual cues: a paradox. *Psychol. Bull.* 96, 152–165.
- Riccio DC, Joynes RL. 2007. Forgetting of stimulus attributes: some implications for hippocampal models of memory. *Learn Mem.* 14(6):430-2.
- Ross RS, Eichenbaum H. 2006. Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *J Neurosci.* 26(18):4852-9.
- Rudy JR, Biedenkapp JC, O'Reilly RC. 2005. Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: an alternative view *Learn. Mem.*, 12, pp. 445–446.
- Sachser RM, Santana F, Crestani AP, Lunardi P, Pedraza LK, Quillfeldt JA, Hardt O, de Oliveira Alvares L. 2016. Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, and calcineurin. *Sci Rep.* 6:22771.
- Sanderson JL, Gorski JA, DellAcqua ML. 2016. NMDA Receptor-Dependent LTD Requires Transient Synaptic Incorporation of Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPARs Mediated by AKAP150-Anchored PKA and Calcineurin. *Neuron.* 89(5):1000-15.
- Sanderson JL, Gorski JA, Gibson ES, Lam P, Freund RK, Chick WS, DellAcqua ML. 2012. AKAP150-anchored calcineurin regulates synaptic plasticity by limiting synaptic incorporation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors. *J Neurosci.* 32(43):15036-52.
- Sanderson TM, Collingridge GL, Fitzjohn SM. 2011 .Differential trafficking of AMPA receptors following activation of NMDA receptors and mGluRs. *Mol Brain* 4:30
- Sierra RO, Pedraza LK, Zanona QK, Santana F, Boos FZ, Crestani AP, Haubrich J, de Oliveira Alvares L, Calcagnotto ME, Quillfeldt JA. 2017. Reconsolidation-induced Rescue of a

- Remote Fear Memory Blocked by an Early Cortical Inhibition: Involvement of the Anterior Cingulate Cortex and the Mediation by the Thalamic Nucleus Reuniens. *Hippocampus*. doi: 10.1002/hipo.22715.
- Squire, L. R. & Alvarez, P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 169–177
- Steffenach HA, Witter M, Moser MB, Moser EI. 2005. Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron*. 45(2):301-13.
- Takehara-Nishiuchi K, Maal-Bared G, Morrissey MD. 2012. Increased Entorhinal-Prefrontal Theta Synchronization Parallels Decreased Entorhinal-Hippocampal Theta Synchronization during Learning and Consolidation of Associative Memory. *Front Behav Neurosci.* 5;5:90.
- Teng E, Squire LR. 1999. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400:675-677.
- Thomas, D. A., and Riccio, D. C. (1979). Forgetting of a CS attribute in a conditioned suppression paradigm. *Animal Learn. Behav.* 7, 191–195.
- Tsao A, Moser MB, Moser EI. 2013. Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Curr Biol.* 23(5):399-405.
- Willner P, Bianchin M, Walz R, Bueno E Silva M, Zanatta MS, Izquierdo I. 1993. Muscimol infused into the entorhinal cortex prior to training blocks the involvement of this area in post-training memory processing. *Behav Pharmacol* 4(2):95-99.
- Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ. 2010. The

- hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol.* 20(15):1336-44.
- Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M. 2007. Memory consolidation or transformation: Context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci* 10:555–557.
- Wu Z, Desmond NL, Levy WB. 1998. Homosynaptic long-term depression of CA3-CA3 synapses in the in vivo hippocampus. *Brain Res.* 789(2):335-8.
- Xu W, Sudhof TC. 2013. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339:1290-1295.
- Yu YJ, Huang CH, Chang CH, Gean PW. 2016. Involvement of protein phosphatases in the destabilization of methamphetamine-associated contextual memory. *Learn Mem.* 23(9):486-93.
- Zanatta MS, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH, Quevedo J, Quillfeldt JA, Izquierdo I. 1996. Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behav Pharmacol.* 7(4):341-345.

## 10. DISCUSSÃO GERAL

Ao longo deste texto avaliamos duas vias pelas quais o hipocampo e o córtex pré-frontal podem interagir para estabelecer os caminhos que permitem a consolidação sistêmica: a) o núcleo talâmico Reuniens, que em nossos experimentos se mostrou importante na persistência de memórias aversivas e b) o córtex entorrinal lateral, que parece possuir processos de plasticidade ativos após o aprendizado e medeia a transformação de memórias precisas em generalizadas.

### **O papel central do córtex cingulado anterior na formação e persistência de memórias remotas**

A primeira parte dos nossos experimentos mostrou que a atividade do córtex cingulado anterior (CCA) durante o aprendizado é essencial para a adequada expressão da memória recente e remota, resultado que está de acordo com outros estudos mostrando que uma rede composta de várias estruturas participa da codificação inicial de novas informações além do hipocampo (Dash et al., 2004). De fato, múltiplos sistemas de memória (por exemplo, dependentes do estriado vs dependentes do hipocampo) podem agir sinergicamente, competir e até compensar a perda de outros (Packard and Goodman, 2013). Sobre esse último ponto, a compensação entre sistema ou estruturas, resulta de especial interesse em nossos experimentos. A dupla inibição do CCA (pré-teste e pré-reativação) gerou a perda parcial da memória remota e coloca em discussão se algumas estruturas podem ser

totalmente necessárias para a formação do engrama. Uma hipótese alternativa considerada no início desses experimentos foi que a inibição do CCA antes do treino poderia fazer com que outra estrutura cortical, como o córtex pré-límbico, (com reconhecido envolvimento na memória remota, por exemplo, ver Stern et al., 2014), compensaria a ausência do CCA, no entanto não conseguimos verificar esse fenômeno. A inibição com muscimol leva a uma diminuição da evocação da memória remota, que só pode ser recuperada quando os animais passam por um protocolo de reativação/reconsolidação. Da mesma forma, se o CCA é inibido antes da reativação não existe recuperação da memória remota. Em conjunto, temos que independente do momento, treino ou reativação, o CCA parece essencial ao engrama que permite a expressão da memória remota. Seria possível que o CCA seja somente necessário para estabelecer memórias remotas?

Sabemos por diferentes estudos que a resposta provável é “não”. Avaliação dos genes de expressão imediata Zif 268 e C-fos após a evocação de memórias recentes e remotas no condicionamento aversivo ao contexto (CAC) têm mostrado que não somente o CCA aumenta sua atividade durante a memória remota, mas também os córtices infralímbico, pré-límbico e temporal (Frankland et al., 2004). Experimentos com inativação farmacológica mostraram também que o córtex parietal é essencial para a evocação da memória remota na esQUIVA INIBITÓRIA (EI) (Izquierdo and Medina., 1997). Por outro lado, a inibição de algumas estruturas, tal como o próprio córtex entorrinal lateral, antes do treino pode excluí-lo do próprio processo de consolidação sináptica diminuindo a ação de agentes amnésicos quando infundidos na mesma estrutura (Willner et al., 1993). Dessa forma,

como explicar que o CCA se mostra tão necessário e que outras estruturas não consigam compensar sua função? Uma resposta única é difícil de oferecer, no entanto, experimentos em nosso laboratório e de outros grupos tem mostrado de forma consistente que a inibição do CCA prejudica a expressão da memória remota (Frankland et al., 2004; Einarsson et al., 2015; Haubrich et al., 2016), fato que leva a pensar que mesmo não sendo a única estrutura envolvida na recuperação do engrama, pode ser um mediador essencial para a função de conexões cortico-corticais à estimulação sensorial. Um dos modelos clássicos da consolidação da memória propõe que informações são armazenadas em um padrão de conexão horizontal no córtex (comunicação entre as próprias células do córtex cerebral) que são reativadas por meio da atividade hipocampal (Squire & Alvarez, 1995). Em uma visão mais detalhada do modelo, o hipocampo pode induzir a formação de conexões entre áreas uni e multimodais de córtex de associação que seriam guiadas pela atividade dessas estrutura. Por outro lado, o hipocampo poderia induzir a formação de conexões entre estruturas de alta hierarquia que reconstruiriam o traço de memória sem mediação, inclusive do próprio hipocampo. De fato, alguns autores sugerem que o CCA seria um ponto essencial nos processos de plasticidade decorrentes da consolidação da memória que permitiriam que essa estrutura fosse a responsável por reestabelecer o engrama durante a memória remota (Insel and Takehara-Nishiuchi., 2013). Se essa hipótese for verdadeira, poderia explicar porque a inibição do CCA parece interferir em todos os tempos onde foi inibida em nossos experimentos. Mesmo que altamente especulativo, poderia se dizer que o CCA seria um organizador da reconstrução do traço cortical, dessa forma, mesmo não sendo a única estrutura implicada no processo, seria essencial para a reativação desses circuitos corticais horizontais. Uma possível forma de avaliar essa hipótese em

experimentos futuros seria demonstrar que as outras estruturas responsáveis pela evocação da memória remota, como o córtex pré-límbico e infralímbico podem ser compensadas quando inibidas, processo que não ocorre no CCA como mostrado em nossos resultados.

### **A reativação/reconsolidação da memória como oportunidade de atualização estrutural do engrama**

Por outro lado, a recuperação da memória remota, produto da reativação mencionada anteriormente, abre uma nova discussão sobre o papel biológico da reconsolidação. Atualmente algumas funções têm sido propostas para explicar o valor adaptativo desse processo. Uma delas seria a hipótese do “fortalecimento” onde a reconsolidação permitiria que um traço reativado ficasse mais forte, provavelmente porque recuperações consecutivas de uma informação específica poderia indicar que esta é importante (Lee., 2008). A segunda seria a hipótese da “relevância” ou “precisão”, em que a reconsolidação permitiria que os detalhes da memórias dependentes do hipocampo não fossem perdidos, mantendo sua relevância e envolvimento dessa estrutura na evocação (Lee., 2009; de Oliveira Alvares et al., 2013). Finalmente tem sido proposta uma função de “atualização” onde o traço em reconsolidação poderia incorporar novas informações com o intuito de modificar uma informação já existente (Lee., 2010; Sierra et al., 2013; Haubrich et al., 2015). Nossos resultados indicam que a atualização poderia servir para manter a estrutura do engrama, especificamente, garantindo que todos seus componentes estejam ativos e assim favorecer a manutenção de memórias emocionais relevantes. Essa conclusão vem da facilitação que a reativação induz na expressão da memória remota após a inibição do CCA antes do treino,

o que em condições normais levaria ao déficit da memória remota. Na nossa interpretação, a atividade do CCA é recuperada durante a reconsolidação e, conseqüentemente, o próprio curso da consolidação sistêmica. Desta forma, é reestabelecido um processo que parece ser interrompido durante o aprendizado. Enquanto a memória é dependente do hipocampo, ela pode se expressar na ausência do CCA. No entanto, quando é remota, a ausência precoce dessa estrutura, que sustentaria sua expressão no futuro, impede que circuitos cortico-corticais sejam fortalecidos (Lesburgueres et al., 2011). Além do efeito verificado com o CCA, a supressão da atividade do NR antes da reativação foi suficiente para prejudicar a memória remota, fato que apoia a nossa hipótese da reconsolidação como um processo que permitira o remodelamento de circuitos associados com a persistência da memória. Resultados parecidos foram publicados por Lesburguères e colaboradores (2011) usando um modelo de transmissão social de preferência. Nesta tarefa, animais aprendem a melhor escolha de alimento baseados na interação com outro animal. Esse aprendizado depende inicialmente do hipocampo, no entanto, com o tempo é o córtex orbitofrontal que permite a evocação desta informação. A inibição precoce de receptores AMPA ou NMDA antes do treino no córtex orbitofrontal leva a um déficit específico da recuperação da memória remota, no entanto, a memória recente se mantém intacta. Esse resultado foi acompanhado de redução da expressão de c-fos no córtex orbitofrontal durante a evocação da memória remota e uma diminuição significativa de dendritos basais e apicais na mesma estrutura. Em conjunto, a partir desses resultados podemos concluir que: a) a inibição de estruturas corticais antes do treino podem interferir seletivamente no processamento de memórias remotas, b) enquanto a memória for recente, o hipocampo seria suficiente para promover uma adequada recuperação do traço e c) a reativação/reconsolidação da informação poderia

ser suficiente para reestabelecer atividades destas estruturas suprimidas antes do treino, promovendo a persistência da memória remota. É importante salientar que em nossos experimentos somente foi usado o fármaco nimodipina, previamente reportado como um inibidor dos mecanismos de desestabilização (Suzuki et al., 2008) necessários para a subsequente reconsolidação, dessa forma, evidências mais diretas, como a administração de inibidores da síntese de proteínas, poderiam ser necessário para melhores conclusões sobre esse fenômeno.

Os nossos experimentos eletrofisiológicos permitiram aprofundar na relação entre o hipocampo e córtex mediado pelo NR. De fato, o resultado em que a inibição do NR prejudica a expressão da memória remota poderia ser interpretado de duas formas: a) o CCA poderia ser reengatilhado durante a reativação promovendo a consolidação sistêmica e, conseqüentemente, a expressão da memória remota (nosso argumento ao longo do texto) ou b) independente do CCA ser reengatilhado ou não, a inibição do NR seria suficiente para prejudicar a memória remota e a própria consolidação sistêmica. Qualquer das duas hipóteses poderia ser válida, no entanto, o fato da indução de potenciação de longa duração (PLD) entre vias comunicando o hipocampo dorsal com o CCA ser suprimida pela administração de lidocaína no NR, permite concluir que, provavelmente durante a reativação, o CCA precisaria da atividade do NR para ser novamente parte do engrama, na ausência de tal estrutura poderia acontecer um tipo de desconexão funcional entre vias cortico-hipocámpais que não permitem a recuperação do curso natural da consolidação sistêmica.

## **O núcleo talâmico reuniens como uma ponte de comunicação entre hipocampo e córtex durante a consolidação sistêmica**

Aproximações anteriores usando o Labirinto Aquático do Morris (LAM) tinham mostrado que a lesão do NR poderia prejudicar especificamente a memória remota, enquanto a recente é conservada (Loureiro et al., 2012). Em nossos experimentos, o NR não parece essencial na recuperação da memória recente, fato que pode ser evidenciado pela ausência de efeito pré-reativação de lidocaína, quando esta foi injetada na estrutura. Os nossos resultados mostram duas funções do NR durante o processo da consolidação sistêmica: a) o NR parece facilitar a potenciação sináptica entre vias do hipocampo e córtex, isso significa que modelos baseados em processos de reativação *on* e *off-line*, classicamente associados com a transformação de memórias hipocampo dependentes em córtex dependentes, (Sara., 2010) poderiam se beneficiar destas vias talâmicas para dirigir tal processo, e b) o NR se mostra como uma estrutura com propriedades de plasticidade que lhe conferem a possibilidade de participar de processos como a reconsolidação. Isto pode ser concluído pelo efeito isolado da lidocaína pré-reativação, que foi suficiente para impedir a expressão da memória remota.

Experimentos ainda não publicados do nosso laboratório mostraram que de fato o NR é vulnerável a inibição de síntese de proteínas pós-reativação, evidenciando que o NR participa ativamente da estabilização do traço durante a reconsolidação da memória. Uma possibilidade para o efeito da lidocaína pré-reativação aqui verificado é que a supressão do NR não permite que o circuito como um todo seja estabilizado durante a reconsolidação,

consequentemente, as estruturas corticais envolvidas na expressão da memória remota não são fortalecidas.

O padrão de conectividade do NR gera dificuldade em concluir o que exatamente está sendo inibido por meio da infusão de lidocaína ou inibidores de síntese de proteínas. Até hoje, não existem experimentos mostrando como a atividade do NR muda entre a evocação de memórias recentes e remotas (como pode ser encontrado com o CCA e o Córtex Entorrinal, ver Barry et al., 2016), também não sabemos os mecanismos por trás do envolvimento do NR durante a reconsolidação. Por outro lado, como esses caminhos entre hipocampo e córtex são formados? Seria o NR igualmente importante alguns dias após o aprendizado comparado com períodos tardios da consolidação sistêmica? Insel e Takehara-Nishiuchi (2013) propõem que no caso do Córtex Entorrinal (CE), sua localização central entre hipocampo e córtex permitiria que ao longo da consolidação sistêmica essa estrutura passasse de um recrutamento de vias CE-hipocampo para CE-córtex mediando os circuitos responsivos durante a evocação da memória. Basicamente, se propõe que o CE seja como um filtro com capacidade de direcionar o processamento sensorial para circuitos específicos, função que estaria diretamente associada com o estado da consolidação sistêmica. Pensando nesse modelo, cabe a pergunta: poderiam mudar, tal e como se propõe como o CE, as conexões bidirecionais do NR com hipocampo e córtex ao longo do tempo?

O NR provavelmente modula a PLD por meio de vias polissinápticas entre CA1 e CCA. Se conhece que o córtex pré-frontal medial (CPFm) recebe projeções diretas somente do hipocampo ventral (Jay et al., 1989; Thierry et al., 2000) e que recentes vias monossinápticas, que surgem no CCA e terminam em CA1 e CA3, estão vinculadas à

evocação de memórias espaciais (Rajasethupathy et al., 2015). Sabendo da ausência de vias diretas entre ambas as estruturas, a potenciação sináptica verificada em nosso experimento pode ser atingida por estruturas de intermediária como a amígdala, o CE e o próprio NR (Sesack et al., 1989; Witter et al., 1989; Vertes et al., 2006, 2007; Chao et al., 2016).

Propomos que o NR faz parte de um circuito fechado em reverberação entre o hipocampo e córtex que provavelmente mantém a plasticidade necessária para o estabelecimento da consolidação sistêmica. A indução de PLD em CA1 pode induzir uma facilitação heterossináptica, em que a força sináptica em CA1 seria controlada por meio do NR e outras estruturas, como o CE (Xu and Sudhof, 2013). Essas estruturas com conexões recíprocas com o CPFm (NR e CE), e em particular com o ACC, poderiam facilitar o controle cortical de processos plásticos no hipocampo e seu envolvimento durante a evocação da memória (ver no final desta discussão um modelo proposto). Esse tipo de modelo de circuito fechado não são novos na literatura e tem sido sugeridos como base da consolidação da memória entre estruturas como hipocampo e o CE (Buzsaki and Gage, 1989; Zosimovskii and Korshunov, 2010).

### **Conclusões parciais a respeito do papel do núcleo Reuniens na consolidação sistêmica de memórias aversivas**

Nosso primeiro grupo de resultados mostrou o papel fundamental do CCA durante a expressão de memórias recentes e remotas. A reativação/reconsolidação promove a recuperação funcional do CCA e sua incorporação no engrama, facilitando a expressão da

memória remota e da própria consolidação sistêmica. Esse processo parece ser mediado pelo NR que durante a reativação permite o engatilhamento do CCA. No caso da dupla inibição do CCA ou do NR antes da reativação, novamente a expressão da memória remota fica comprometida. Os experimentos com eletrofisiologia revelaram que a potenciação de circuitos entre hipocampo e córtex precisa da integridade funcional do NR, sugerindo que seria a via pela qual o CCA conseguiria manter e reestabelecer a comunicação perdida com o hipocampo para garantir a estabilização e persistência do engrama ao longo do tempo.

### **O córtex entorrinal lateral (CEL) como mediador ativo da generalização da memória**

Além do NR, nossos resultados mostraram que o CE, e em particular o CEL, é essencial durante a consolidação sistêmica. Contrário ao papel do NR como mediador da persistência da memória remota (e conhecendo seu papel na expressão de memórias precisas ver Xu e Sudhof, 2013), o CEL se mostrou como um regulador ativo da generalização da memória.

Estudos recentes mostraram que a consolidação sistêmica e a generalização da memória são eventos fortemente relacionados (Pardraza et al., 2016; Pedraza et al., 2017). A hipótese levantada nesse segundo grupo de experimentos foi a de que as próprias estruturas associadas com a consolidação sistêmica seriam as mesmas implicadas na transformação de memórias precisas em generalizadas.

Estudos prévios do nosso laboratório e outros grupos mostraram que o CEL participa da evocação de memórias recentes e remotas (Quillfeldt et al., 1994; Morrissey et al., 2012), o que está de acordo com a proposta do CE ser um filtro capaz de direcionar seletivamente

informação sensorial para o hipocampo e o córtex (Takehara-Nishiuchi., 2014). Se esse modelo for verdadeiro, e pensando em conjunto com a associação entre consolidação sistêmica e generalização, é esperado que qualquer manipulação que afete um dos processos (dependência hipocampal ou generalização da memória) afete o outro também. De fato, esse foi o caso dos resultados aqui apresentados. A inibição durante 7 dias do CEL, começando 24h após o treino, levou a memória a se manter precisa em um momento em que geralmente se expressaria como generalizada. Mais interessante ainda, essa inibição parece ser essencial para os primeiros dias após o treino (dia 3) mas não tardiamente (dia 6), sugerindo que processos de plasticidade que ocorrem nessa janela de tempo podem definir a qualidade futura da memória. Mesmo que não significativos (o aumento do número de animais por grupo é necessário; ver em anexos Figura Suplementar 1 ), nossos resultados se mostram promissores sobre o efeito da mesma manipulação na dependência hipocampal. A inibição no dia 3 após o treino parece manter a memória sensível ao muscimol durante o teste, quando os controles não apresentam tal sensibilidade, mostrando que o hipocampo ainda é a estrutura chave recrutada para a evocação da memória.

A partir desses resultados, e baseando-nos no modelo proposto por Takehara-Nishiuchi (2014), é possível concluir que o CEL induz uma mudança no recrutamento hipocampal e cortical conforme o momento da evocação da memória e que, provavelmente, muda a direção de entrada de informação sensorial nessas estruturas. Essa mudança, aqui interpretada como inerente à consolidação sistêmica, levaria a utilização de conexões corticais para recuperar o engrama durante a evocação e não o hipocampo, fenômeno este que por sua vez promoveria que a memória fosse expressa de forma precisa ou generalizada.

Essa interpretação apoiaria a visão de Pedraza e colaboradores (2016) de que os dois fenômenos, dependência hipocampal e generalização, poderiam ser interdependentes. Contudo, e como analisado durante a introdução, nem todas as formas de generalização podem ser atribuídas ao processo de consolidação sistêmica. Por exemplo, Lynch e colaboradores (2017), usando administração sistêmica, intracerebroventricular ou intrahipocampal do antagonista seletivo para receptores GABA<sub>B(1a)</sub>, CGP 36216, antes ou depois do CAC, mostraram que memórias podem ser generalizadas 24h depois do treino. Mesmo sem uma verificação da dependência hipocampal, é difícil hipotetizar que esse tipo de memória não envolva o processamento hipocampal ou que seja consolidada sistemicamente tão rápido (como pode ser o caso de modelos usando “esquemas”, em que o hipocampo é necessário só durante 3h após o treino; ver Tse e colaboradores (2007)), o que permitiria uma hipótese mais razoável de que o hipocampo pode armazenar informações não detalhadas. Novamente, essa possibilidade não foi avaliada e outras alternativas como um precoce envolvimento de estruturas corticais concomitante com o hipocampo (como acontece por exemplo em aprendizados subsequentes, ver Wartman e colaboradores (2014)) não podem ser descartada. Uma forma de conciliar esses resultados é pensando que, em condições normais, a consolidação sistêmica, e conseqüentemente a dependência hipocampal, controlam a forma precisa ou generalizada que a memória será expressa. No entanto, generalizações transitórias (Lynch et al., 2016) ou produto de uma consolidação com interferências seriam a exceção da regra.

### **Inibição do CEL parece afetar seletivamente vias CE-hipocampo e não CE-CCA**

O fato de conseguirmos reproduzir os efeitos da inibição no dia 3 do CEL também no hipocampo dorsal leva a considerar que a comunicação entre ambas as estruturas medeia o resultado observado. A conclusão é apoiada pela ausência de efeito após a inibição do CCA. Em nossa interpretação, as vias entre CEL e hipocampo seriam principalmente recrutadas enquanto a consolidação sistêmica não é completada (fortalecimento das conexões horizontais corticais). A inibição do CEL poderia atrasar processos plásticos associados com o desencatilhamento do hipocampo durante a evocação ao longo do tempo (ver a continuação). No entanto algumas perguntas ficam abertas: a) porque a inibição afeta seletivamente as conexões entre o CEL e hipocampo dorsal e não CEL-CCA?, b) qual seria o papel do CEL neste processo? E, finalmente, c) porque os primeiros dias após o treino (dia 3) seriam tão importantes para a futura expressão da memória?

Para a primeira pergunta uma aproximação oferecida por Lesburguères e Bontempi (2011) poderia ajudar na resposta. Os autores, usando um modelo de transmissão social de preferencia, uma tarefa dependente do hipocampo quando recente e do córtex orbitofrontal quando remota, conseguem dissociar o papel de cada uma dessas estruturas ao longo do tempo. Infundindo o antagonista de receptores AMPA, CNQX, entre os dias 0 e 12 pós-treino (envolvimento recente) ou 15 e 27 (envolvimento tardio), foi mostrado que a inibição recente do hipocampo dorsal afeta a evocação da memória recente, o mesmo procedimento em períodos tardios não tem efeito da memória remota. Por outro lado, as infusões em ambos os tempos, durante o envolvimento recente e tardio no córtex orbitofrontal, prejudica a expressão da memória recente e remota. Esses resultados evidenciam que o hipocampo seria essencial nos primeiros dias após o treino enquanto perde relevância ao longo do tempo, mas o córtex orbitofrontal continua essencial em todo o processo. Uma

possibilidade seria realizar o procedimento de inibição do CEL de forma tardia (por exemplo entre os dias 7 e 15), essa metodologia poderia revelar se ao longo da consolidação sistêmica as conexões entre CE-hipocampo e CE-CCA poderiam ser afetados diferencialmente. Essa possibilidade está de acordo com a hipótese levantada ao longo desse texto que no decorrer da consolidação sistêmica as vias entre CE-CCA seriam preferencialmente recrutadas para evocar a memória na sua forma generalizada.

No caso do papel do Córtex Entorrinal Medial (CEM), poderia ser mais difícil de prever. Nakazaw e colaboradores (2016) mostraram que neurônios da região proximal de CA1 se encontram reciprocamente conectados com o CEM, enquanto os neurônios da região distal, com o CEL. Funcionalmente, a lesão específica dos axônios proximais interfere com a evocação do CAC enquanto a lesão dos distais não. Kitamura e colaboradores (2013) demonstraram que as projeções da camada III do CEM e CA1 controlam a associação entre estímulos no condicionamento aversivo, que por sua vez são reguladas pelas células em forma de ilha (island cells), que por sua vez projetam-se aos dendritos distais de CA1. Esses resultados sugerem que cada uma das subdivisões do CE medeia componentes diferentes da formação e manutenção de memórias aversivas contextuais. Levando em consideração que, igual ao CEL, o CEM possui conexões recíprocas com o hipocampo e o CPFm (Kerr et al., 2007), assim, poderia ser investigado se essa região estaria também associada com a consolidação sistêmica e a generalização da memória.

Finalmente, porque o CEL e o hipocampo dorsal seriam tão importantes de forma recente após o aprendizado (dia 3), poderia estar diretamente associado com processos de plasticidades que ocorrem nos primeiros dias após o treino em ambas as estruturas e se

estabilizam ao longo do tempo, fenômeno que já tem sido reportado no condicionamento aversivo ao som em que uma rápida mudança na expressão de receptores AMPA acontece só nos primeiros dias após o treino, processo que coincide com janelas de plasticidade aumentada (Clem and Huganir., 2010). A seguir, essa possibilidade será explorada.

### **Um possível mecanismo de enfraquecimento sináptico poderia explicar a independência hipocampal e generalização da memória decorrente da consolidação sistêmica**

Nossos resultados mostraram que, subsequente a inibição do CEL, um mecanismo associado com a expressão de receptores AMPA permeáveis ao cálcio (CP-AMPA) parece controlar a progressiva generalização da memória. A infusão do inibidor NASPM, que bloqueia os CP-AMPA, conseguiu manter a precisão da memória. Esse efeito por sua vez parece depender da sinalização pelos receptores NMDA contendo a subunidade NR2B e a calcineurina.

Após o condicionamento aversivo ao som, um incremento na membrana dos CP-AMPA foi verificado 48h após o treino, que desaparece depois de 7 dias (Clem and Huganir., 2010). Durante essa janela, a maior expressão desses receptores se mostrou facilitar a extinção da memória e por sua vez a possibilidade de indução de depressão de longa duração (DLD) nas aferências do tálamo à amígdala, resultado que parece indicar que um processo de enfraquecimento sináptico é disparado pela extinção. Adicionalmente, o papel da calcineurina na endocitose de receptores AMPA tem sido mostrado durante a DLD em sinapses de CA1 (Sanderson et al., 2016). Se a troca de receptores AMPA no CEL está de

fato controlando um processo de DLD nas vias CEL-CA1 é meramente especulativo, no entanto, o fato do tratamento com NASPM manter a precisão da memória indica que provavelmente o CEL continua recrutando o hipocampo para evocar a informação. Nossa proposta, que deve ser avaliada em futuros experimentos, é que o CEL gradativamente pode enfraquecer as conexões entre CEL-CA1 por meio de processos de depotenciação ou DLD, enquanto ao mesmo tempo as vias CEL-CCA são fortalecidas, processo que poderia ser a base do recrutamento seletivo do hipocampo ou do córtex durante a evocação, dependendo do estado da própria consolidação sistêmica. É importante salientar que um processo de depotenciação em CA1 se mostrou associado com o decaimento da PLD, fenômeno que pode ser retardado com a infusão de ifenprodil (Sachser et al., 2016), o mesmo fármaco que em nossos experimentos mantém a precisão da memória. A administração de antagonistas NMDA como a memantina ou de canais de cálcio do tipo L como a nimodipina durante o período de retenção no modelo de reconhecimento espacial de objetos, consegue inibir o esquecimento da tarefa. Recentemente, foi proposto que no CAC a inibição da endocitose dos receptores AMPA contendo a subunidade GluR2 promove a precisão da memória durante 2 semanas após o treino (Migues et al., 2016), o mesmo tratamento consegue manter mais tempo a memória de tarefas menos emocionais como o reconhecimento de objetos.

De forma geral e como verificado em estruturas como o hipocampo (Migues et al., 2016) e a amígdala (Clem and Haganir., 2010), o CEL parece possuir uma dinâmica na expressão de receptores AMPA que pode mudar a qualidade da memória ao longo do tempo. Acreditamos que esse processo ocorre principalmente durante os primeiros dias após o treino (quando o CEL se mostra sensível aos efeitos do muscimol), onde esses mecanismos

são fundamentais para determinar a taxa da consolidação sistêmica e generalização da memória. Um questionamento final apropriado para essa interpretação é se o CE recrutaria o hipocampo e o córtex balanceando processos de PLD e DLD durante a evocação da memória.

### **O envolvimento do CE na evocação da memória poderia ser transitório**

Em nossos experimentos, assim como em outros trabalhos avaliando o papel do CE na evocação da memória (Cho and Kesner, 1996), sugere-se que o CE poderia ser um regulador constante da recuperação do traço, e como sugerido acima, mediando a forma em que é recrutado o hipocampo ou o córtex para tal finalidade. Contudo, experimentos realizados 2 décadas atrás em nosso laboratório questionam essa possibilidade. A administração de CNQX pré-teste 60 dias após o treino não prejudica a evocação da esQUIVA inibitória. Contrário ao efeito verificado quando o mesmo fármaco foi infundido no córtex parietal (Quillfeldt et al., 1994). Experimentos avaliando consolidação sistêmica com intervalos entre treino e teste menores do que 4 semanas, parecem verificar sistematicamente o envolvimento do CE na evocação da memória (Cho and Kesner, 1996; Morrissey et al., 2012) . No entanto, existe a possibilidade de que o CE não seja mais recrutado quando as conexões cortico-corticais cheguem num estado de maturação que consigam disparar a reconstrução do traço independente da atividade do CE. Isso poderia explicar a ausência de efeito verificada por Quillfeldt e colaboradores., (1994) 60 dias após o treino. Seria o fim do envolvimento do CE na evocação da memória um marcador do fim da própria consolidação sistêmica?

### **Existe esquecimento na hipótese de “esquecimento dos atributos do estímulo”?**

Um das principais hipóteses para explicar a generalização contextual afirma que o aumento do tempo entre treino e teste faz com que os detalhes dos estímulos condicionados sejam esquecidos enquanto a resposta condicionada é preservada (Thomas and Riccio, 1979; Riccio et al., 1984, 1992), isso tem por consequência que estímulos neutros parecidos com o estímulo condicionado consigam disparar a resposta condicionada. Mas qual é a evidência que de fato existe esquecimento nesse processo? Um esforço recente por mostrar possíveis mecanismos de esquecimento ativo poderia revelar se de fato existe um esquecimento por trás dessa teoria. Hardt e colaboradores (2013) propõem a existência de um índice hipocampal (ver item 5 na introdução) que permite o acesso a informações detalhadas, este seria degradado ao longo do tempo. Molecularmente, os mesmos autores sugerem que receptores AMPA contendo a subunidade GluA2, responsáveis pela manutenção da PLD, poderiam ser a base desse processo. De fato, o bloqueio da internalização desses receptores por meio do peptídeo GluA23Y consegue evitar o esquecimento de memórias provenientes de uma tarefa de reconhecimento de objetos e ao mesmo tempo consegue manter a precisão de memórias no CAC (Migues et al., 2017).

Essas evidências preliminares sugerem que de fato o esquecimento ativo poderia tornar memórias precisas em generalizadas, no entanto, acreditamos que é necessário redefinir a palavra “esquecimento” neste modelo. Primeiro, mesmo que os detalhes sejam perdidos, a memória existe e pode ser evocada, isso poderia indicar que na verdade mais do que ser esquecida propriamente ela é transformada, como propõem outras interpretações (Winocur

et al., 2007). Por outro lado, contrário ao que acontece em modelos como o reconhecimento ou localização de objetos, em que após algum tempo não pode ser identificada uma memória (ao menos não através do comportamento), memórias emocionais mostram-se mais persistentes e resistentes à inibição e esquecimento (LaBar and Cabeza., 2006). Dessa forma, propomos que de ser melhor demonstrado um processo de esquecimento ativo poderia agir em duas direções diferentes utilizando os mesmos mecanismos moleculares: a) apagando o registro de informações pouco relevantes e que não precisariam de consolidação sistêmica e b) transformando a qualidade da memória ao longo do tempo, nesse caso a perda da precisão poderia ser interpretada como o “preço a pagar” pela persistência de informações relevantes.

**Poderia a atividade hipocampal ser controlada pelo córtex pré-frontal? Proposta de um modelo da atividade conjunta entre NR e CE regulando CA1 durante a evocação da memória**

Frankland e Bontempi (2005) propõem que o CPFm poderia inibir ativamente a formação hipocampal durante a evocação da memória remota. Essa conclusão está influenciada por resultados mostrando que níveis de c-fos e Zif 268 se encontram abaixo dos níveis basais em CA1 durante a evocação de memórias remotas (Frankland et al., 2004; no entanto veja Barry et al., 2016). Tal processo de inibição poderia controlar a codificação redundante no hipocampo, isto é, a entrada de informações sensoriais caso consiga reativar uma memória já consolidada, dispararia a inibição do hipocampo para evitar a consolidação de informações repetidas. No caso da informação ser totalmente nova, o CPFm liberaria o

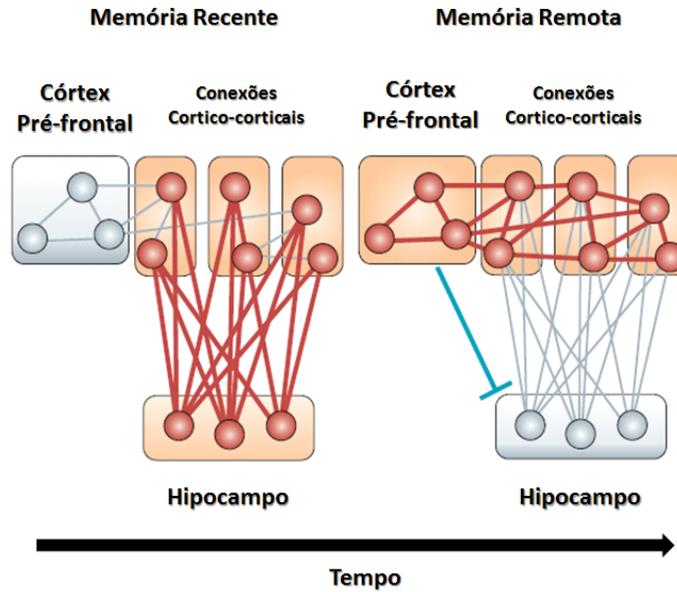
hipocampo da inibição facilitando a codificação de novas experiências. Estudos mostrando vias monossinápticas que saem do CCA a CA3 e CA1 controlando a evocação de memórias espaciais parecem apoiar essa ideia (Rajasethupathy et al., 2015).

Um fenômeno diferente, a supressão voluntária de memórias em humanos, possui um modelo explicativo similar. Nesses estudos, os participantes são instruídos a suprimir a evocação de algumas informações de forma consciente. Aqueles que conseguem efetivamente suprimir informações voluntariamente apresentam uma diminuição da atividade hipocampal concomitante com um aumento da atividade do córtex pré-frontal dorsolateral durante a tarefa (Anderson et al., 2004). Estudos subsequentes do mesmo grupo mostraram que essa tentativa voluntária de suprimir informações poderia conduzir ao esquecimento desses itens (Wimber et al., 2015). Recentemente, foi proposto que essa capacidade de supressão poderia ser controlada por vias CE-hipocampo. Ao ser uma porta de entrada sensorial ao sistema hipocampal, a deprivação dessas vias prejudicaria a evocação de informações suficiente para reconstruir o traço. Por outro lado, mesmo com funcionamento normal das vias CE-hipocampo, projeções provenientes do NR poderiam modular a atividade diretamente do hipocampo ou do próprio CE (vias NR-CE) que também interfeririam na recuperação do traço (Anderson et al., 2016). Em síntese, os autores propõem que a forma do córtex pré-frontal controlar a atividade hipocampal poderia ser por meio do CE ou NR.

Nossos resultados e a capacidade do NR e CE de controlar o curso da consolidação sistêmica e a qualidade da memória (precisão x generalização) sugere que de fato o CPFm poderia usar essas vias para controlar a transformação e evocação da memória. Mais do que

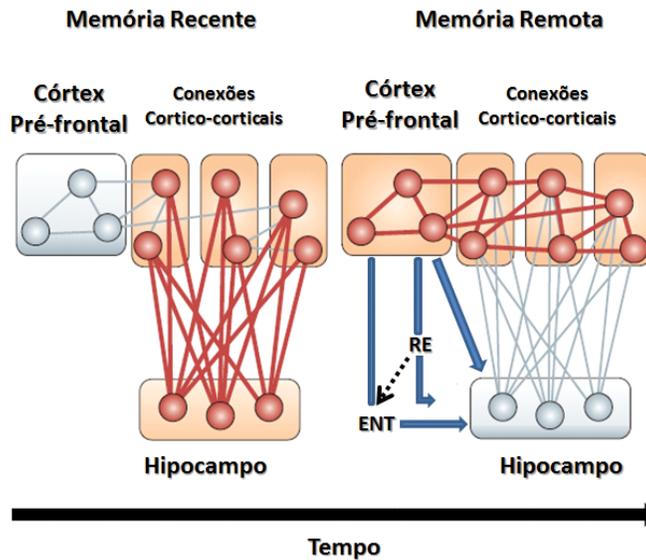
uma simples especulação, nos apoiamos em três fatos concretos para sustentar essa hipótese: a) a inibição da atividade do NR se mostrou a impedir a indução de PLD nas vias entre hipocampo dorsal e CCA ao mesmo tempo em que foi suficiente para prejudicar a memória remota e possivelmente a recuperação do ACC quando inibido antes do treino, b) estudos recentes mostraram que axônios provenientes do NR e CE convergem aos mesmos dendritos apicais de neurônios piramidais em CA1 (Dolleman-van der Weel et al., 2016) e c) e tem sido proposto que as conexões NR-CA1 e CE-CA1 conjuntamente podem reduzir o limiar de plasticidade sináptica em CA1, facilitando processos de consolidação da memória (Xu e Sudhof., 2013).

Em nossa interpretação, o modelo de Frankland e Bontempi (2005) poderia ser atualizado (ver Figuras 9.1 e 9.2) colocando o NR e CE como mediadores da inibição hipocampal, que seria desencadeada pelo CPFm. Esse circuito seria o responsável por a) evitar a codificação redundante no hipocampo, b) diminuir o envolvimento hipocampal durante a recuperação da memória remota e c) controlar a progressiva consolidação sistêmica e generalização da memória.



**Figura 9.1**

Modelo de Consolidação Sistêmica proposto por Frankland e Bontempi em 2005 (Adaptado de Frankland and Bontempi, 2005. *The organization of recent and remote memories*).



**Figura 9.2**

## **Conclusões Finais**

Os resultados aqui mostrados oferecem uma visão da consolidação sistêmica que vai além das atividades do córtex pré-frontal e do hipocampo durante esse fenômeno. As duas estruturas avaliadas, o NR e CEL, são somente uma parte de um amplo circuito que ainda deve ser investigado. Contudo, consideramos que as evidências aqui mostradas facilitam a compreensão dos mecanismos que permitem a interação entre estruturas hipocampais e corticais que favorecem a persistência de engramas emocionais e a transformação da memória de precisa em generalizada. Transtornos psicopatológicos como o Transtorno de Estresse Pós-traumático (TEPT) em que a hipergeneralização de respostas aversivas é um dos grandes alvos terapêuticos pode se beneficiar do conhecimento básico sobre como e em que condições a memória se generaliza e isso possa subsidiar possíveis estratégias para retardar ou inibir esse processo. Como parcialmente explorado aqui, falar de esquecimento em memórias emocionais aversivas pode ser contra intuitivo, no entanto, se esse mecanismo é melhorado ou promovido muito além de níveis fisiológicos, não podemos descartar que seja possível uma atenuação significativa, por exemplo, de memórias traumáticas. A dúvida é se realmente elas poderiam ser “apagadas” como alguns gostariam acreditar.

## 11. DIREÇÕES FUTURAS

Após as hipóteses e conclusões aqui levantadas, acreditamos que alguns tópicos são de especial interesse para subseqüentes estudos avaliando o processo da consolidação sistêmica: a) retomar o possível papel do CPFm na inibição ativa do hipocampo durante a evocação de memórias remotas, b) avaliar se estruturas intermediárias como o NR e CEL seriam indispensáveis ao longo da consolidação sistêmica ou poderiam eventualmente não ser necessárias para a recuperação de memórias remotas, c) investigar a regulação do NR na atividade do CEL (como proposto recentemente) e as suas implicações na consolidação sináptica e sistêmica da memória, d) estudar as diferenças funcionais entre estruturas corticais que tem se mostrado associadas com o armazenamento de memórias remotas, e) estabelecer se evitando a generalização da memória também se evita a consolidação sistêmica ou vice-versa e f) buscar novas aproximações para inibir a generalização de memórias aversivas como possível estratégia para induzir a sua atenuação.

## 12. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO GERAL

- Agster KL, Burwell RD. 2013. Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behav Brain Res.* 254:50-64.
- Agster KL, Burwell RD. 2009. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus.* 19(12):1159-86.
- Albensi BC 2007. The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Curr Pharm Des* 13:3185-3194.
- Anderson MJ, Riccio DC. 2005. Ontogenetic forgetting of stimulus attributes. *Learn Behav* 33:444–453.
- 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.
- Anderson MC, Bunce JG, Barbas H. 2015. Prefrontal-Hippocampal Pathways Underlying Inhibitory Control Over Memory. *Neurobiology of Learning and Memory.* PMID 26642918 DOI: 10.1016/j.nlm.2015.11.008.
- Bannerman, D.M., Yee, B.K., Lemaire, M., Wilbrecht, L., Jarrard, L., Iversen, S.D., Rawlins, J.N., and Good, M.A. 2001. The role of the entorhinal cortex in two forms of spatial learning and memory. *Exp. Brain Res.* 141: 281–303.
- Bartlett FC (1932) *Remembering.* In: Cambridge University Press, Cambridge.
- Barros DM, Izquierdo LA, Mello e Souza T, Ardenghi PG, Pereira P, Medina JH, Izquierdo

- I. 2000. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 114: 183–192.
- Barry DN, Coogan AN, Commins S. 2016. The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes *Zif268*, *c-Fos* and *Arc*. *Neurobiol Learn Mem* 128: 46–55.
- Bellesi M., Riedner B.A., Garcia-Molina G.N., Cirelli C., Tononi G. 2014. Enhancement of sleep slow waves: underlying mechanisms and practical consequences. *Front. Syst. Neurosci.*, 8: 208.
- Bero AW, Meng J, Cho S, Shen AH, Canter RG, Ericsson M, Tsai LH. 2014. Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:11852–11857.
- Bergstrom HC. 2016. The neurocircuitry of remote cued fear memory. *Neurosci Biobehav Rev* 71:409–417.
- Besnard A, Sahay A. 2016. Adult hippocampal neurogenesis, fear generalization, and stress. *Neuropsychopharmacology* 41:24–44.
- Bevilaqua LRM, da Silva WN, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2005. Extinction and reacquisition of a fear-motivated memory require activity of the Src family of tyrosine kinases in the CA1 region of the hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 139–145.
- 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.
- Biennvenu TCM, Busti D, Micklem BR, Mansouri M, Magill PJ, Ferraguti F, Capogna M.

2015. Large intercalated neurons of amygdala relay noxious sensory information. *J Neurosci* 35: 2044–2057.
- Bisaz R., Travaglia A., Alberini C.M. (2014) The neurobiological bases of memory formation: from physiological conditions to psychopathology. *Psychopathology*. 47, 347-56. Review.
- Bobal MG, Savage LM. 2015. The role of ventral midline thalamus in cholinergic-based recovery in the amnesic rat. *Neuroscience*. Jan 29;285:260-8.
- Bokor H, Csaki A, Kocsis K, Kiss J. 2002. Cellular architecture of the reuniens nucleus thalami and its putative aspartergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur. J. Neurosci*;16:1227–1239.
- Bonnici HM, Chadwick MJ, Lutti A, Hassabis D, Weiskopf N & Maguire EA. 2012. Detecting representations of recent and remote autobiographical memories in vmPFC and hippocampus. *J Neurosci* 32, 16982–16991.
- 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.
- Born, J., Rasch, B., & Gais, S. (2006). Sleep to remember. *Neuroscientist*, 12, 410–424.
- Born J. 2010. Slow-wave sleep and the consolidation of long-term memory. *World J Biol Psychiatry*. 11:16–21.
- Breslau, N., Chilcoat, H. D., Kessler, R. C., Peterson, E. L., & Lucia, V. C. 1999. Vulnerability to assaultive violence: Further specification of the sex difference in post-traumatic stress disorder. *Psychological Medicine*, 29, 813–821.
- Bruce SE, Buchholz KR, Brown WJ, Yan L, Durbin A, Sheline YI. 2012. Altered

- emotional interference processing in the amygdala and insula in women with Post-Traumatic Stress Disorder. *Neuroimage. Clinical.* 2: 43-9.
- Burwell RD. 2000. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci.* 911:25-42.
- Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ, Wiig KA .2004a. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci* 24: 3826-3836.
- Burwell RD, Bucci DJ, Sanborn MR. 2004b. Perirhinal and postrhinal contributions to remote memory for context. *Journal of Neuroscience* 24(49): 11023–11028.
- Burwell, R. D., Saddoris, M. P., Bucci, D. J., and Wiig, K. A. (2004). Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J. Neurosci.* 24, 3826–3836.
- Buzsaki G, Gage FH. 1989. Absence of long-term potentiation in the subcortically deafferented dentate gyrus. *Brain Res* 484:94–101.
- Carvalho-Netto EF, Martinez RC, Baldo MV, Canteras NS. 2010. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 479–486.
- Chao OY, Huston JP, Li JS, Wang AL, de Souza Silva MA. 2016. The medial prefrontal cortex-lateral entorhinal cortex circuit is essential for episodic-like memory and associative object-recognition. *Hippocampus* 26:633–645.
- Cho YH, Kesner BP, Brodale S. 1995. Retrograde and anterograde amnesia for spatial discrimination in rats: role of hippocampus, entorhinal cortex, and parietal cortex. *Psychobiology* 23:185–194.
- Clem RL, Huganir RL. 2010. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science.* 330(6007):1108-12.

- Collingridge GL, Randall AD, Davies CH, Alford S. 1992. The synaptic activation of NMDA receptors and Ca<sup>2+</sup> signalling in neurons. *Ciba Found Symp* 164:162-171.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH. 1998. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 11:61-80.
- Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SB, Letzkus JJ, Vlachos I, Ehrlich I, Sprengel R, Deisseroth K, Stadler MB, Muller C, Luthi A. 2010. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature* 468: 277–282.
- Craig AD. 2009. How do you feel—now? The anterior insula and human awareness. *Nat Rev Neurosci.* 10:59—70.
- Cullen PK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC, Jasnow AM. 2015. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol Learn Mem.* 124:19-27.
- Dash PK, Hebert AE, Runyan JD. 2004. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Brain Res Rev* 45: 30–37.
- Davoodi FG, Motamedi F, Akbari E, Ghanbarian E, Jila B. 2011. Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on memory processing in passive avoidance task. *Behav. Brain Res;*221:1–6.
- Diering, G. H., et al. 2017. Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. *Science*, 355: 511-15.
- Dolorfo CL, Amaral DG. 1998. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol.* 398(1):49-82.
- Dolleman-Van der Weel MJ, Wouterlood FG, Witter MP. 1995. Multiple anterograde

- tracing, combining Phaseolus vulgaris leucoagglutinin with rhodamine- and biotin-conjugated dextran amine. *J Neurosci Methods* 51:9–21.
- Dolleman-van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP. 1997. Reuniens nucleus thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J. Neurosci*;17:5640–5650.
- Dolleman-van der Weel, M. J., Morris, R. G. M., and Witter, M. P. 2009. Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct. Funct.* 213, 329–342. doi: 10.1007/s00429-008-0200-6.
- Dolleman-van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP. 2016. Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat. *Brain Struct Funct* doi: 10.1007/s00429-016-1350-6.
- 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, Karni A, Born J. 2015. The consolidation and transformation of memory. *Neuron* 88, 20-32.
- Duncan CP. 1949. The retroactive effect of electroshock on learning. pp 32-44.
- Duvarci, S., Bauer, E. P. & Pare, D. 2009. The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear. *J. Neurosci.* 29, 10357–10361.
- Duzel, E., Penny, W. D., & Burgess, N. 2010. Brain oscillations and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 20, 143–149.

- 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, 42–8.
- de Vivo, L., et al. 2017. Ultrastructural evidence for synaptic scaling across the wake/sleep cycle. *Science*, 355: 507-10
- Einarsson EÖ, Pors J, Nader K. 2015. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology*. 40(2):480-7.
- Einarsson EO, Nader K. 2012. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 19:449–452.
- Ferreira MB, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. 1992. Late posttraining memory processing by entorhinal cortex: involvement of NMDA and GABAergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 41: 767–771.
- Frank, L. M., Brown, E. N. & Wilson, M. 2000. Trajectory encoding in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuron* 27, 169–178.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L. and Silva, A.J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, 304 (5671), 881-883.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat*

- Rev Neurosci. 6(2):119-30.
- Good, M. and Honey, R.C. 1997. Dissociable effects of selective lesions to the hippocampal subsystems on exploratory behavior, contextual learning, and spatial learning Behav. Neurosci. 111, 487–493.
- 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.
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener S, Buzsáki G, Zugaro MB. 2009. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. Nat Neurosci, 12, pp. 1222–1223.
- Greenberg T, Carlson JM, Cha J, Hajcak G, Mujica-Parodi LR. 2013. Neural reactivity tracks fear generalization gradients Biological Psychology, 92 (2013), pp. 2–8 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2011.12.007>.
- Grossberg JM. 1973. Generalization of extinction effects in fear scene hierarchies. Behav Res Ther. 11(3):343-5.
- Grupe DW, Nitschke JB .2013. Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. Nature Reviews of Neuroscience 14, 488–501.
- Hallock, H. L., Wang, A., Shaw, C. L., and Griffin, A. L. 2013. Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. Behav. Neurosci. 127, 860–866. doi: 10.1037/a0034653.
- 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*.
- Hardt O, Nader K, Wang YT. 2013. GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis and the decay of early and late long-term potentiation: possible mechanisms for forgetting of short- and long-term memories. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 369(1633):20130141.
- Hembrook JR, Mair RG. 2011. Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus*;21:815–826.
- Herkenham M. 1978. The connections of the reuniens nucleus thalamus: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J. Comp. Neurol*;177:589–610.
- Hoover WB, Vertes RP. 2012. Collateral projections from reuniens nucleus of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct. Funct*;217:191–209.
- Insausti R, Herrero MT, Witter MP. 1997. Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus*;7(2):146-83.
- Insel N, and Takehara-Nishiuchi K. 2013. “The cortical structure of consolidated memory: A hypothesis on the role of the cingulate-entorhinal cortical connection,” *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 106, pp. 343–350.
- Inostroza, M., and Born, J. (2013). Sleep for preserving and transforming episodic memory.

- Annu. Rev. Neurosci. 36, 79–102.
- Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC. 1999. Silent glutamatergic synapses in the mammalian brain. *Can J Physiol Pharmacol.* 77(9):735-7.
- Izquierdo I. 2011. *Memória*. Artmed Porto Alegre.
- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection with activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68:285-316.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29:496-505.
- Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. 2016. Fear memory. *Physiol. Rev.*, 96 (2016), pp. 695–750.
- Jasnow, A. M., Lynch, J. F., Gilman, T. L. and Riccio, D. C. 2017. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 95: 821–835. doi:10.1002/jnr.23837.
- Jay TM, Witter MP. 1991. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574–586.
- Jerusalinsky D, Ferreira MB, Walz R, Da Silva RC, Bianchin M, Ruschel AC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I. 1992. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol* 58: 76–80.
- Jeye, B.M.; Karanian, J.M.; Slotnick, S.D. 2017. The Anterior Prefrontal Cortex and the

- Hippocampus Are Negatively Correlated during False Memories. *Brain Sci*, 7, 13.
- Jones BF, and Witter MP. 2007. Cingulate cortex projections to the parahippocampal region and hippocampal formation in the rat. *Hippocampus* 17, 957–976.
- Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*. 17(9):697-708.
- Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. 2012. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders *Nature Neuroscience*, 15 (2012), pp. 1613–1620.
- 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 J, Lee S, Park Ketal .2007. Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20955–20960.
- Kitamura T, Pignatelli M, Suh J, Kohara K, Yoshiki A, Tonegawa S. 2014. Island cells control temporal association memory *Science*, 343, pp. 896–901.
- LaBar KS, Cabeza R. 2006. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat Rev Neurosci*. 7(1):54-64.
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira d, V. 2012. The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J Neurosci* 32:9947– 9959.
- Lesburgueres E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifilieff P, Bontempi B.

2011. Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science* 331: 924–928.
- Lee JL. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neurosci* . 11:1264–1266.
- Lee, J.L.C. 2009. Reconsolidation: Maintaining memory relevance. *Trends Neurosci.*;32:413–420.
- Lee JL. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4:168.
- Levine, B., Black, S. E., Cabeza, R., Sinden, M., Mcintosh, A. R., Toth, J. P., et al. 1998. Episodic memory and the self in a case of isolated retrograde amnesia. *Brain*, 121, 1951–1973.
- Levy-Gigi, E., Kéri, S., Myers, C. E., Lencovsky, Z., Sharvit-Benbaji, H., Orr, S. P., et al. 2012. Individuals with post-traumatic stress disorder show a selective deficit in generalization of associative learning. *Neuropsychology* 26, 758–767. doi: 10.1037/a0029361.
- Levy-Gigi, E., Szabo, C., Richter-Levin, G., and Kéri, S. 2014. Reduced hippocampal volume is associated with overgeneralization of negative context in individuals with PTSD. *Neuropsychology*. doi: 10.1037/neu0000131.
- Lima RH, Rossato JI, Furini CR, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M. 2009. Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*;91: 466–472.
- Lissek S, Powers AS, McClure EB, Phelps EA, Woldehawariat G, Grillon C, Pine DS. 2005. Classical fear conditioning in the anxiety disorders: A meta-analysis

- Behaviour Research and Therapy, 43, pp. 1391–1424.
- Lissek S, Rabin S, Heller RE, Lukenbaugh D, Geraci M, Pine DS, Grillon C. 2010. Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder American Journal of Psychiatry, 167 (2010), pp. 47–55.
- Lissek S, Bradford DE, Alvarez RP, Burton P, Espensen-Sturges T, Reynolds RC, Grillon C. 2014. Neural substrates of classically conditioned fear-generalization in humans: A parametric fMRI study Social, Cognitive and Affective Neuroscience, 9, pp. 1134–1142.
- Liu Y, Zhang J. 2000. Recent development in NMDA receptors. Chin Med J (Engl ) 113:948-956.
- Luine V, Frankfurt M. 2013. Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. Neuroscience 239:34–45, doi:10.1016/j.neuroscience.2012.10.019, pmid:23079626.
- Lynch IJ, Cullen PK, Jasnow AM, Riccio DC. 2013. Sex differences in the generalization of fear as a function of retention intervals. Learn Memory 20(11): 628-632.
- Lynch JF 3rd, Winiecki P, Vanderhoof T, Riccio DC, Jasnow AM. 2016. Hippocampal cytosolic estrogen receptors regulate fear generalization in females. Neurobiol Learn Mem 130:83–92.
- Lynch JF, Winiecki P, Gilman TL, Adkins JM, Jasnow AM. 2017. Hippocampal GABAB(1a) Receptors Constrain Generalized Contextual Fear. Neuropsychopharmacology. 42(4):914-924.
- Marr D. 1970. A theory for cerebral neocortex. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 176(1043):161-234.

- Maren S, Fanselow MS. 1997. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 67: 142–149.
- Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW. 2004. The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci* 24:2431–2439.
- Majchrzak, M., Ferry, B., Marchand, A.R., Herbeaux, K., Seillier, A., and Barbelivien, A. 2006. Entorhinal cortex lesions disrupt fear conditioning to background context but spare fear conditioning to a tone in the rat. *Hippocampus* 16: 114–124.
- McGaugh JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- McGaugh, J.L. and Roozendaal, B. 2009. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology* 202, 3–14.
- 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.
- Migues PV, Liu L, Archbold GE, Einarsson EÖ, Wong J, Bonasia K, Ko SH, Wang YT, Hardt O. 2016. Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *J Neurosci.* 36(12):3481-94.
- Milad MR, Quinn BT, Pitman RK, Orr SP, Fischl B, Rauch SL 2005. Thickness of ventromedial prefrontal cortex in humans is correlated with extinction memory.

Proc Natl Acad Sci USA;102:10706–10711.

Morrissey, M. D., Maal-Bared, G., Brady, S., and Takehara-Nishiuchi, K.. 2012. Functional dissociation within the entorhinal cortex for memory retrieval of an association between temporally discontinuous stimuli. *J. Neurosci.* 32, 5356–5361.

Morrissey MD, Takehara-Nishiuchi K. 2014. Diversity of mnemonic function within the entorhinal cortex: a meta-analysis of rodent behavioral studies. *Neurobiol Learn Mem* 115:95–107, doi:10.1016/j.nlm.2014.08.006, pmid:25151400.

Moser, E. I., Roudi, Y., Witter, M. P., Kentros, C., Bonhoeffer, T., and Moser, M. B. 2014. Grid cells and cortical representation. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 466–481.

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.

Nakazawa Y, Pevzner A, Tanaka K, Wiltgen B. 2016. Memory retrieval along the proximodistal axis of CA. In: *Hippocampus*, In Press.

Oswald, C. J. P., & Good, M. 2000. The effects of combined lesions of the subicular complex and the entorhinal cortex on two forms of spatial navigation in the water maze. *Behavioral Neuroscience*, 114, 211–217.

Packard, M.G., and Goodman, J. (2013). Factors that influence the relative use of multiple memory systems. *Hippocampus*, 23, 1044-1052.

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.
- Pedraza LK, Sierra RO, Crestani AP, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. 2017. Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: Implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus*. doi: 10.1002/hipo.22708.
- Pereira P, Ardenghi P, Mello e Souza T, Medina JH, Izquierdo I. 2001. Training in the step-down inhibitory avoidance task time-dependently increases cAMP-dependent protein kinase activity in the entorhinal cortex. *Behav. Pharmacol.* 12, 217–220.
- Perkonig, A., Kessler, R.C., Storz, S., & Wittchen, H.U. 2000. Traumatic events and post-traumatic stress disorder in the community: Prevalence, risk factors and comorbidity . *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 101, 46-59.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. 1995. Lesions of the fornix, but not the entorhinal or perirhinal cortex interfere with contextual fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 15, 5308-5315.
- Piolino P, Desgranges B, Belliard S. 2003. Autobiographical memory and auto-noetic consciousness: triple dissociation in neurodegenerative diseases, *Brain*, vol. 126, no. 10, pp. 2203–2219.
- Quillfeldt JA, Zanatta MS, Schmitz PK, Quevedo J, Schaeffer E, Lima JB, Medina JH, Izquierdo I. 1997. Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiol Learn Mem.* 66(2):97-101.
- Quillfeldt JA, Schmitz PK, Walz R, Bianchin M, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I. CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA

- reverses the effect. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994 Jun;48(2):437-40.
- Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, Lo M, Liston C, Deisseroth K. 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* 526:653–659.
- Remondes M, Schuman EM. 2004. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature* 431: 699–703.
- Riccio, D. C., Richardson, R., and Ebner, D. L. (1984). Memory retrieval deficits based upon altered contextual cues: a paradox. *Psychol. Bull.* 96, 152–165.
- Riccio DC, Ackil J, Burch-Vernon A. 1992. Forgetting of stimulus attributes: methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychol Bull* 112:433–445.
- Riccio DC, Ackil J, Burch-Vernon A. 1992. Forgetting of stimulus attributes: methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychol Bull.* 112(3):433-45.
- Riccio DC, Joynes RL. 2007. Forgetting of stimulus attributes: some implications for hippocampal models of memory. *Learn Mem* 14:430–432.
- Rolls, Edmund T. 2016. Pattern completion and pattern separation mechanisms in the hippocampus. In: Jackson, Pamela A. and Chiba, Andrea A. and Berman, Robert F. and Ragozzino, Michael E., (eds.) *The neurobiological basis of memory : a system, attribute, and process analysis.* Cham, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 77-113.
- 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.

- 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, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. 2009. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325:1017-1020.
- Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, Caroni P. 2011. Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature* 473:514–518.
- Rudy JW. 2005. Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: an alternative view. *Learn Mem* 12:445–446.
- Rauch, S. L., Shin, L. M., & Phelps, E. A. 2006. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present, and future. *Biol.Psychiatry*, 60, 376-382.
- Sachser RM, Santana F, Crestani AP, Lunardi P, Pedraza LK, Quillfeldt JA, Hardt O, de Oliveira Alvares L. 2016. Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, and calcineurin. *Sci Rep.* 6:22771.
- Sanderson JL, Gorski JA, Dell'Acqua ML. 2016. NMDA Receptor-Dependent LTD Requires Transient Synaptic Incorporation of Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPARs Mediated by AKAP150-Anchored PKA and Calcineurin. *Neuron*. 89(5):1000-15.
- Sara SJ. 2010. Reactivation, retrieval, replay and reconsolidation in and out of sleep: Connecting the dots. *Front Behav Neurosci* 4:185.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. 1989. Topographical organization of the

- efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213–242.
- Shaban, H., Humeau, Y., Herry, C., Cassasus, G., Shigemoto, R., Ciocchi, S., Barbieri, S., van der Putten, H., Kaupmann, K., Bettler, B., and Luthi, A. 2006. Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nat. Neurosci.* 9, 1028–1035.
- Shin LM, Liberzon I. 2009. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*.
- Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J, de Oliveira AL, Quillfeldt JA. 2013. Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem* 20:379–387.
- Sørensen KE. 1985. Projections of the entorhinal area to the striatum, nucleus accumbens, and cerebral cortex in the guinea pig. *J Comp Neurol.* 238(3):308-22.
- Spalding KN, Jones SH, Duff MC, Tranel D, Warren DE. 2015. Investigating the Neural Correlates of Schemas: Ventromedial Prefrontal Cortex Is Necessary for Normal Schematic Influence on Memory. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience.* 35: 15746-51.
- Squire, L. R. & Alvarez, P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 169–177
- Squire LR, Zola-Morgan JT. 2011. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* 34:259-288.
- Steffenach HA, Witter M, Moser MB, and Moser EI. 2005. Spatial memory in the rat

- requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex, *Neuron*, vol. 45, no. 2, pp. 301–313.
- Stern CA, Gazarini L, Vanvossen AC, Hames MS, Bertoglio LJ. 2014. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learn Mem.* 21:14–20.
- Steward O. 1976. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 167(3):285-314.
- Suzuki WA. and Amaral DG. 1990. Cortical inputs to the CA1 field of the monkey hippocampus originate from the perirhinal and parahippocampal cortices but not from area TE. *Neurosci. Lett.* 115: 43-48.
- Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem* 15:426–433.
- Swanson LW. 1981. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*;217:150–154.
- Takehara-Nishiuchi K (2014) Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neurosci Res* 84:27- 33.
- Takehara-Nishiuchi K, Maal-Bared G, Morrissey MD. 2012. Increased Entorhinal-Prefrontal Theta Synchronization Parallels Decreased Entorhinal-Hippocampal Theta Synchronization during Learning and Consolidation of Associative Memory. *Front Behav Neurosci.* 5;5:90.
- Thierry AM, Giovanni Y, Dégénétais E, Glowinski J. 2000. Hippocampo- prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*

10:411–419.

- Thomas, D. A., and Riccio, D. C. (1979). Forgetting of a CS attribute in a conditioned suppression paradigm. *Animal Learn. Behav.* 7, 191–195.
- Tsé D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG. 2007. Schemas and memory consolidation. *Science* 316:76-82.
- Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA. 2013. Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Struct Funct.* in press.
- Vertes RP. 2002. Analysis of the projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on reuniens nucleus. *J. Comp. Neurol.* 442:163–187.
- Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ. 2006. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 499:768–796.
- Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C. 2007. Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 71:601–609.
- Villar ME, Martinez MC, da Cunha PL, Ballarini F, Viola H. 2017. Memory consolidation and expression of object recognition are susceptible to retroactive interference, *Neurobiology of Learning and Memory*, Volume 138, Pages 198-205.
- 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.

- Watson J B., and Rayner, R. 1920. Conditioned emotional responses. *Journal of Experimental Psychology*, 3, 1-14.
- Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. 2011. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 50:1-8.
- 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.
- Willshaw DJ, Buneman OP, Longuet-Higgins HC. 1969. Non-holographic associative memory. *Nature*. 222(5197):960-2.
- Willshaw DJ, Buckingham JT. 1990. An assessment of Marr's theory of the hippocampus as a temporary memory store. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 329(1253):205-15.
- 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(1666). pii: 20140383. doi: 10.1098/rstb.2014.0383.
- Willner P, Bianchin M, Walz R, Bueno E Silva M, Zanatta MS, Izquierdo I. 1993. Muscimol infused into the entorhinal cortex prior to training blocks the involvement of this area in post-training memory processing. *Behav Pharmacol* 4(2):95-99.
- Wimber, M.; Alink, A.; Charest, I.; Kriegeskorte, N.; Anderson, M.C. Retrieval induces adaptive forgetting of competing memories via cortical pattern suppression. *Nat.*

- Neurosci. 2015, 18, 582–589.
- 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, Frankland PW, Sekeres M, Fogel S, Moscovitch M. 2009. Changes in context-specificity during memory reconsolidation: selective effects of hippocampal lesions. *Learn Mem* 16:722–729.
- Winocur G, Moscovitch M. 2011. Memory transformation and systems consolidation J. *Int. Neuropsychol. Soc.*, 17, pp. 766–780.
- Witter MP. 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*;163C:43–61.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, and van Haften T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 911, no. 1, pp. 1–24.
- Witter MP, Amaral DG. 1991. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol.* 307(3):437-59.
- Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. 1989. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* 9:216–228.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP. 1990. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol*;296:179–203.

- Xu W, Seudhof TC. 2013. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339:1290–1295.
- Zanatta MS, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH, Quevedo J, Quillfeldt JA, Izquierdo I. 1996. Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behav Pharmacol* 7: 341–345.
- Zhou Y, Riccio D. 1996. Manipulation of components of context: the context shift effect and forgetting of stimulus attributes. *Learn Motiv* 27:400–407.
- Zosimovskii VA, Korshunov VA. 2010. Return of excitatory waves from field CA1 to the hippocampal formation is facilitated after tetanization of Schaeffer collaterals during sleep. *Neurosci Behav Physiol* 40:315–323.

### 13. ANEXOS

Neste experimento foi avaliada a possibilidade que a inibição do CEL no dia 3 após o treino mantivesse a dependência hipocampal. Para isso, animais passaram pelo protocolo de treino explicado ao longo do texto e no dia 3 receberam veículo ou muscimol intra-CEL. No dia 15, 10 min antes do teste os animais foram infundidos novamente com muscimol no hipocampo dorsal. Um reteste foi realizado depois de 4 horas do primeiro com o intuito de avaliar novamente o comportamento do animal em ausência da droga. Essa hipótese e desenho metodológico se baseiam em experimentos do nosso laboratório mostrando uma forte relação entre dependência hipocampal e precisão da memória (de Oliveira Alvares et al., 2012; Pedraza et al., 2016).

Como pode ser observado, não existem diferenças significativas entre os grupos, no entanto acreditamos que a falta de efeito pode estar associada um n baixo para cada grupo (Veículo n=6, Muscimol n=7). No futuro aumentaremos o número de animais para conseguir uma conclusão satisfatória.

**Figura Suplementar 1**

