

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EXPLORANDO A NATUREZA LÁBIL DA MEMÓRIA:
MODULAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTINÇÃO
E RECONSOLIDAÇÃO PARA ATENUAR
PERSISTENTEMENTE RESPOSTAS DE MEDO**

JOSUÉ HAUBRICH

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Neurociências da UFRGS como pré-requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor.*

Porto Alegre, Setembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial ao meus pais, meu irmão e à Ina, pelo incondicional apoio, amor, incentivo, paciência e confiança e pela sabedoria com que sempre me aconselharam.

Ao professor Jorge, pela orientação e exemplo de pessoa e cientista que é, pela amizade, por sempre ter acreditado no meu trabalho e me apoiado. Os 10 anos sob sua orientação influenciaram profundamente minha formação acadêmica e extra-acadêmica.

Ao Lucas, pela amizade desde os meus tempos de aluno de iniciação científica, pelas inúmeras e inspiradoras contribuições acadêmicas e ensinamentos que ajudaram no meu amadurecimento como pesquisador.

A todos os colegas do laboratório que tive o privilégio de conviver durante o doutorado, pela amizade, apoio, inspiração, e por tornarem o ambiente do nosso grupo um lugar cientificamente estimulante e repleto de companheirismo: Ana, Flávia, Rodrigo, Mirelle, Krislei, Rossana, Paula, Fabiana, Kamilla, Bruno, Adriano, Ricardo, Lizeth, Dona Zelma.

Ao PPG de Neurociências e seus professores, pela ótima formação acadêmica que oferecem aos seus alunos.

À UFRGS, por todas as oportunidades e experiências que me propiciou.

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas de doutorado e sanduíche.

RESUMO

Eventos aversivos levam à formação de memórias de medo que em alguns casos podem levar a consequências patológicas, como no transtorno do estresse pós-traumático. A extinção é um procedimento que envolve a formação de uma nova memória que inibe o traço de aversivo precedente, diminuindo as respostas de medo. Porém, sua capacidade de suprimir o medo é limitada visto que a memória de extinção tende a decair, levando à recuperação das respostas aversivas. Já a reconsolidação é o processo pelo qual uma memória previamente armazenada se torna lábil ao ser evocada, permitindo a sua modificação. Dentre as modificações já relatadas decorrentes da reconsolidação está a do fortalecimento do traço da memória. Aqui, tivemos como hipótese a possibilidade de induzir a reconsolidação do traço de extinção de forma a promover o seu fortalecimento. No modelo experimental de condicionamento aversivo ao contexto em ratos, verificamos que a extinção é inicialmente efetiva em inibir a memória aversiva, mas as respostas de medo ressurgem integralmente em testes de recuperação espontânea e reaquisição rápida. Porém, observamos que breves reexposições ao contexto condicionado são capazes de induzir a reconsolidação da memória de extinção, e que tal procedimento fortalece o traço de extinção a ponto de prevenir o seu decaimento. Com isso, a recuperação espontânea do medo, uma característica clássica nos procedimentos de extinção, é prevenida persistentemente. Além disso, vimos que a reconsolidação da memória de extinção permite a sua modulação farmacológica com agentes promnésticos. Este procedimento resulta também no fortalecimento do traço de extinção, tornando-o resistente à reaquisição rápida do medo. Portanto, aqui demonstramos uma relação dinâmica entre os processos de extinção e reconsolidação até então desconhecida, tendo esta uma profunda relevância para o entendimento de ambos os processos e para a prática clínica.

ABSTRACT

Aversive experiences can lead to maladaptive memories, as in Post-Traumatic Stress Disorder. A major component of exposure therapy in the treatment of anxiety and fear-related disorders, extinction is a process involving new learning that inhibits the expression of a previously acquired memory. Although effective in transiently suppressing fear responses, extinction does not erase the original fear association, allowing for its resurgence. Its poor persistence contrasts with the endurance of aversive memories, and the extinction trace tends to fade. On the other hand, several studies in the reconsolidation field have shown that memory can be strengthened by a simple reactivation session or by post-reactivation administration of memory enhancing compounds. Using the contextual fear conditioning paradigm, we here ask whether an extinct memory is amenable to undergo reconsolidation to be strengthened. First, we replicated classical findings showing that extinction trace decays over time (spontaneous recovery). Employing post-reactivation inhibition of protein synthesis, we found that an extinct trace undergoes a reconsolidation process after a brief reactivation session. Reactivation of the extinction trace prevented the time-dependent decay that results in fear spontaneous recovery, an effect that relied on the recruitment of memory reconsolidation mechanisms. Finally, extinction trace reconsolidation was susceptible to pharmacological enhancement, resulting in a robust resistance to rapid reacquisition. These results show that reconsolidation of extinct traces enables the enhancement of its strength and, thus, its persistence. This finding brings new insights into the interactions between extinction and reconsolidation, and may represent a promising novel approach to the realm of treatments of fear-related disorders.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	6
1.2. TIPOS DE MEMÓRIAS.....	7
1.3. CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA	9
1.4. MEMÓRIA DE EXTINÇÃO	12
1.5. RECONSOLIDAÇÃO E A MALEABILIDADE DA MEMÓRIA.....	19
1.6. FATORES LIMITANTES DA RECONSOLIDAÇÃO	23
1.7. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA RECONSOLIDAÇÃO	25
1.8. APLICAÇÕES TERAPEUTICAS DA RECONSOLIDAÇÃO.....	29
1.9. RECONSOLIDAÇÃO DO TRAÇO DE EXTINÇÃO.....	32
2. OBJETIVOS	35
3. CAPÍTULO I	38
4. CAPÍTULO II	61
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	90
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

No decorrer de suas vidas, os animais são expostos aos mais diversos desafios, sendo inúmeras as informações a eles relacionadas. O encéfalo realiza a importante missão de processar todas estas informações, interpretá-las coerentemente e responder de maneira adequada. Estes processos ocorrem em diversos níveis, cada qual visando responder a uma demanda cognitiva específica. Dentre eles, a memória desempenha papel central em permitir ao animal interagir com o mundo de maneira eficiente de acordo com aprendizados prévios (Kandel *et al*, 2014). A memória é uma representação cerebral de informações adquiridas em eventos passados, mas sua razão de existir está no futuro. Isso por que, ao preservar informações relacionadas a experiências anteriores, a memória permite ao indivíduo predizer prováveis desfechos futuros, possibilitando-o melhor guiar suas escolhas e ações. Sem a memória, não haveria qualquer tipo de aprendizado, linguagem, ciência, sociedade organizada, etc. Ela é uma capacidade crítica para a sobrevivência de todos os animais, sendo também a base biológica da individualidade. Como abordado nesta tese, porém, em certas circunstâncias a memória também pode atuar negativamente ao guiar comportamentos indesejáveis.

A todo momento novas memórias são formadas e memórias antigas são acessadas, mas apesar de presente em praticamente todos os momentos de nossa vida, a memória tem uma natureza pouco palpável. Por mais vívida que seja, sua ocorrência se dá na nossa mente, por vezes parecendo que acontece como que por mágica. Compreensivelmente, a faculdade da memória muito foi

discutida no decorrer da história no campo das ciências humanas e das artes. De maneira geral, isso ocorreu na sombra da memória coletiva (a história) sendo a memória individual vista como algo enigmático. Até o final do século XIX, sua natureza era debatida basicamente no esfera filosófica metafísica sob a perspectiva dualista de separação corpo-mente (Danziger, 2008). Apenas com o surgimento da psicologia experimental e de trabalhos de pesquisadores pioneiros como Herman Ebbinghaus (1859 - 1909), Wilhelm Wundt (1832 – 1920), Gustav Fechner (1801 – 1887) e posteriormente Georg Elias Müller (1850 – 1934) a memória passou a ser vista como uma faculdade resultante da ação da matéria (i.e. funções encefálicas), devendo assim exibir propriedades passíveis de experimentação (Lechner *et al*, 1999). Posteriormente, com o desenvolvimento das neurociências, seus mecanismos neurobiológicos começaram a ser investigados causalmente via experimentação animal, revelando como e onde estes processos ocorrem no encéfalo.

1.2. TIPOS DE MEMÓRIAS

Importante para o estudo da memória é o entendimento de que ela não é uma entidade unitária. A memória é classificada em diferentes classes, relacionadas ao tempo que perduram e a natureza das informações por elas codificadas, sendo estas distintas não só no âmbito comportamental mas também no neurobiológico (Kandel *et al*, 2000).

Memórias podem perdurar por uma vida inteira, ou serem extremamente efêmeras. O seu tipo menos durável é a chamado de memória de trabalho, persistindo por alguns segundos a poucos minutos. As que persistem de alguns minutos até no máximo algumas poucas horas são chamadas de memórias de

curta duração. Já as que perduram por várias horas, dias, ou anos, são chamadas de memórias de longa duração (Kandel *et al*, 2000). O que faz certas memórias serem armazenadas apenas brevemente, e outras perdurarem por anos? Os mecanismos subjacentes ao armazenamento de memórias de longa duração serão discutidos adiante, mas a decisão de se engajar ou não estes mecanismos parte de uma “decisão” do encéfalo de se uma informação específica é ou não importante. O principal fator modulando esta “decisão” é a emoção envolvida. Eventos emocionalmente salientes, tanto positiva como negativamente, tendem a levar à formação de memórias muito fortes e mais duradouras do que eventos neutros (Ploski and McIntyre, 2015a).

Relevante também é a classificação das memórias quanto a natureza das informações por elas codificadas (Kandel *et al*, 2000). Memórias de fatos e eventos são chamadas de explícitas, ou declarativas. São facilmente formadas, mas também facilmente esquecidas. Elas podem ser conscientemente relembradas e, em humanos, declaradas verbalmente. Memórias como as de habilidades motoras e de hábitos são chamadas de implícitas. Atualmente, sabe-se que memórias de modalidades distintas são processadas por áreas encefálicas especializadas. Por exemplo, memórias da categoria explícita são dependentes de estruturas como o hipocampo e o neocórtex. Já memórias implícitas motoras requerem a atividade de estruturas como o cerebelo e núcleos da base. Memórias implícitas emocionais são muito relacionadas com a atividade da amígdala, mas esta também participa no circuito de memórias explícitas, dando-lhes o colorido emocional (Ledoux, 2000). Importante salientar, apesar de o encéfalo possuir estruturas especializadas em processar memórias codificando diferentes tipos de informação, estas áreas muitas vezes

agem em conjunto. Isso se explica pelo fato de que a maioria das nossas memórias possuem diferentes componentes, tanto implícitos como explícitos, que interagem dinamicamente.

1.3. CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Memórias são frutos de aprendizados, e tem como principal função permitir a expressão posterior do conhecimento aprendido. Durante o aprendizado, se dá a chamada fase de aquisição da memória, onde as informações captadas pelos sentidos são processadas e interpretadas. Já a evocação é o nome dado à fase da memória onde ela é expressa. Mas como que as informações adquiridas são armazenadas, possibilitando sua posterior evocação? Esta pergunta simples, mas fundamental, só começou a ser cientificamente debatida e investigada após o surgimento da psicologia experimental no final do século XIX e início do século XX (Lechner *et al*, 1999).

Um dos princípios fundamentais que norteiam o conhecimento neurobiológico da memória é de que ela não é formada instantaneamente, sendo necessária uma complexa sequência de eventos neurobiológicos para que a informação seja armazenada (Alberini *et al*, 2006). Após um aprendizado, o traço de memória gradualmente progride de um estado inicial lábil e instável, onde tais processos ainda estão em andamento, para um estado fixo e estabilizado que permite seu armazenamento. Esta ideia foi inicialmente proposta por Müller & Pilzecker (1900) onde o termo consolidação foi utilizado pela primeira vez para se referir a este fenômeno.

Em seu estudo com voluntários humanos, os autores utilizaram uma tarefa de memorização de sílabas sem sentido de forma a estudar o efeito de

interferências sobre sua retenção. Eles observaram que quando uma interferência era aplicada nos primeiros momentos após o aprendizado, os participantes não conseguiam evocar a lista de sílabas posteriormente, indicando que a formação da memória havia sido prejudicada. Porém, a mesma interferência não tinha qualquer efeito se aplicada após um intervalo de tempo maior. A partir desta observação, eles propuseram que o aprendizado não induz instantaneamente a formação de memórias de longa duração, mas sim que a memória leva um tempo para se fixar. Portanto, existe uma janela de tempo após a aquisição onde a memória é vulnerável. Ao processo tempo-dependente em que a memória progride de uma forma inicial, que é sensível a interferências, para um estado resistente, eles deram o nome de consolidação (Lechner *et al*, 1999). Esta demonstração de interferência retroativa graduada no tempo revelou a existência de um processo de estabilização do traço que é essencial para seu armazenamento e persistência.

A identificação do processo de consolidação da memória inspirou as próximas gerações de pesquisadores a investigar o fenômeno de interferências retroativas após um aprendizado (i.e. agente amnésico afetando a retenção de uma informação adquirida previamente), com o intuito de entender como as memórias são formadas. A existência da consolidação como processo central da memória foi confirmada por diversas linhas de evidência. Quando tratamentos amnésicos como choque eletroconvulsivo (Duncan, 1949), inibição da síntese proteica (Flexner *et al*, 1965) e interferências comportamentais (Gordon and Spear, 1973) são aplicados após um aprendizado, a memória de longa duração é prejudicada. Quando tratamentos pró-mnésicos são administrados após um aprendizado, a memória de longa

duração é fortalecida (McGaugh and Krivanek, 1970). Importante, todas estas intervenções são ineficazes se feitas após um intervalo longo de tempo. Isso demonstrou que o processo de consolidação ocorre nas primeiras horas após o período de aquisição. Durante este período, a memória pode ser modulada e, por definição, é considerada em um estado lábil, instável. Uma vez consolidado, o traço de memória se torna imune a interferências e, por definição, é considerado em um estado fixo, estável.

A teoria da consolidação norteou a pesquisa da neurobiologia da memória por quase 100 anos e foi responsável por grandes avanços neurocientíficos. A identificação da existência de um processo essencial para a formação da memória - sendo este limitado no tempo e passível de modulações - permitiu o estudo sistemático das alterações neurobiológicas subjacentes. Donald Hebb (Hebb, 1949) fez importante contribuição teórica para o entendimento da formação das memórias ao levantar hipóteses acerca dos mecanismos neurais envolvidos. Ele propôs que após um aprendizado, a informação é inicialmente sustentada pela atividade reverbatória de circuitos neuronais específicos. Esta atividade, porém, seria capaz apenas de sustentar uma memória de curta duração. Para se tornar uma memória de longa duração, estes circuitos deveriam ser fortalecidos por alterações na eficiência das sinapses envolvidas, sendo este o fenômeno neurobiológico mediado pela consolidação. As ideias de Hebb influenciaram profundamente a área, tendo inspirado cientistas a, ao invés de realizar estudos com animais intactos visando a análise no nível puramente comportamental, a estudar quais seriam os eventos biológicos específicos relacionados com a consolidação via manipulações no tecido nervoso. Com isso, foram descobertos diversos

mecanismos celulares, moleculares, genéticos e eletrofisiológicos relacionados com a consolidação da memória (Bailey and Kandel, 2008) e as principais regiões e circuitos encefálicos onde estes processos ocorrem (Frankland and Bontempi, 2005; Haubrich *et al*, 2016).

1.4. MEMÓRIA DE EXTINÇÃO

Raramente novas memórias são formadas como que escritas em um quadro em branco. Assim como constantemente formamos novas memórias, também a todo momento evocamos memórias passadas que podem servir de base para tais novos aprendizados (Bridge and Voss, 2014). Informações prévias sendo evocadas muitas vezes influenciam na forma com que interpretamos novos eventos, e por consequência como consolidamos novas memórias. Visto que a memória prévia é evocada na mesma circunstância onde a nova está sendo formada, geralmente ambas são relacionadas, mas codificam predições diferentes – caso contrário, nem haveria a necessidade de consolidar a nova memória (Besnard, 2012).

Este fenômeno é bastante estudado no campo da extinção da memória, primeiramente descrito por Pavlov (Pavlov, 1927). Neste paradigma, um estímulo condicionado neutro (e.g. um contexto, que por si só não dispara uma resposta emocional) é pareado com um estímulo incondicionado (EI) de valor psicológico saliente (e.g. um choque) que sozinho gera uma resposta incondicionada de medo (RI). Este pareamento leva a formação de uma memória associando ambos os estímulos. Desta forma, o estímulo neutro se torna agora um estímulo condicionado (EC) que é capaz de disparar por si só uma resposta condicionada (RC) de medo. Porém, Pavlov observou que

quando o animal é reexposto de maneira prolongada ao EC na ausência do EI, ele aprende que ambos não estão mais associados e a RC decai. Ou seja, ao evocar uma memória prévia (i.e. EC = EI) e perceber que ela não mais é uma boa preditora, uma nova memória é formada com um significado oposto (i.e. EC ≠ EI; Figura 1).

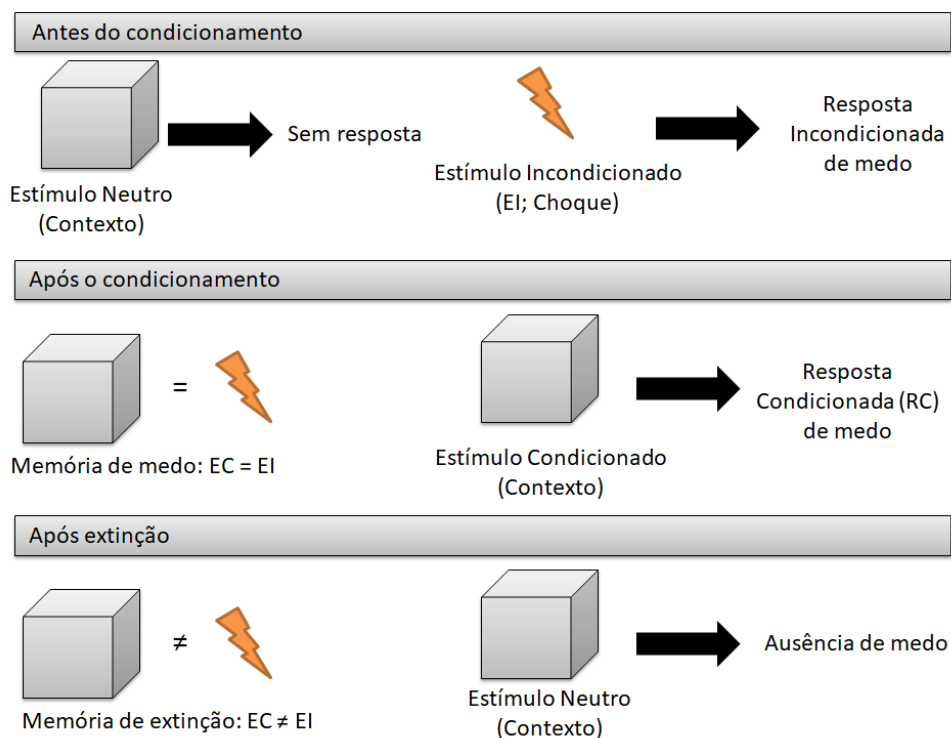


Figura 1. Medo condicionado e extinção. O medo condicionado é adquirido quando um estímulo neutro é pareado com um estímulo aversivo. Após o condicionamento, a reexposição ao estímulo neutro agora gera uma resposta condicionada de medo. Após o procedimento de extinção, ocorre diminuição da resposta condicionada.

Visto que a memória de extinção codifica predições opostas às da memória aversiva, ambas são por natureza conflitantes e não podem ser expressas concomitantemente. Isto é, o animal não pode expressar e não expressar medo ao mesmo tempo. Desta forma, a diminuição das respostas condicionadas resulta da inibição da memória de medo inicial pela memória de extinção. A relação entre memórias conflitantes é explicada pelo modelo de

dominância de traço (Devenport, 1998; Eisenberg *et al*, 2003). Neste modelo, em um cenário onde diferentes memórias fazem previsões antagônicas referentes a um mesmo estímulo, haveria uma competição entre elas pela expressão e apenas a dominante seria evocada. Diversos fatores podem determinar qual memória será dominante, como a sua idade, força e presença de dicas que favoreçam a evocação de um traço em virtude do outro.

Por um tempo alvo de debate, hoje é consenso que a diminuição de performance após o aprendizado de extinção não envolve a destruição ou modificação da memória do primeiro aprendizado, mas sim a formação de um novo traço de memória inibitório. Por envolver a formação de um novo traço, a memória de extinção passa pelas fases usuais de aquisição, consolidação e evocação (Quirk *et al*, 2006). Já observado por Pavlov, uma evidência simples mas direta de que a extinção não envolve desaprendizado é que a resposta condicionada da memória inicial é capaz de ressurgir integralmente após diversas manipulações comportamentais (Bouton, 2002; Bouton *et al*, 2006, 2012). Dentre estas, o fenômeno mais básico é o da recuperação espontânea, onde a resposta condicionada inibida pela memória de extinção volta a se expressar com o passar do tempo (Rescorla, 2004). Caso a memória inicial tivesse sido removida pela extinção, não haveria a possibilidade de tal recuperação. Outra forma de ressurgência é observada no paradigma de reaquisição rápida. Animais que foram previamente condicionados e passaram pela extinção, ao serem submetidos a um protocolo de retreinamento fraco que *per se* não induz resposta condicionada, rapidamente voltam a expressar integralmente as respostas condicionadas. Na reinstalação, o mesmo desfecho ocorre após a simples reapresentação isolada do EI. Por fim, na renovação, a

exposição a um contexto distinto ao qual a extinção ocorreu permite que a resposta condicionada retorne, demonstrando novamente que a memória inicial não foi apagada e, neste caso, dicas específicas podem favorecer sua evocação.

Os fenômenos de recuperação das respostas condicionadas são especialmente propensos a ocorrer em paradigmas de condicionamento aversivo. Diferentemente das robustas e persistentes memórias de medo, a memória de extinção é frágil e tende a se enfraquecer. Isto pode ser explicado pela natureza de ambas – enquanto a memória de extinção codifica informações de valência emocional neutra (i.e. o contexto *não prediz* um desfecho negativo), as memórias de medo possuem acentuada valência emocional negativa. Visto que a emoção associada a uma determinada memória é diretamente relacionado com a sua persistência (McGaugh, 2000; Ploski and McIntyre, 2015b), o decaimento relativo da memória de extinção frente à memória de medo é uma consequência de tal natureza distinta de ambas. Desta forma, a memória de extinção que é inicialmente dominante perde esta posição facilmente, e o traço aversivo volta a se expressar (Figura 2).

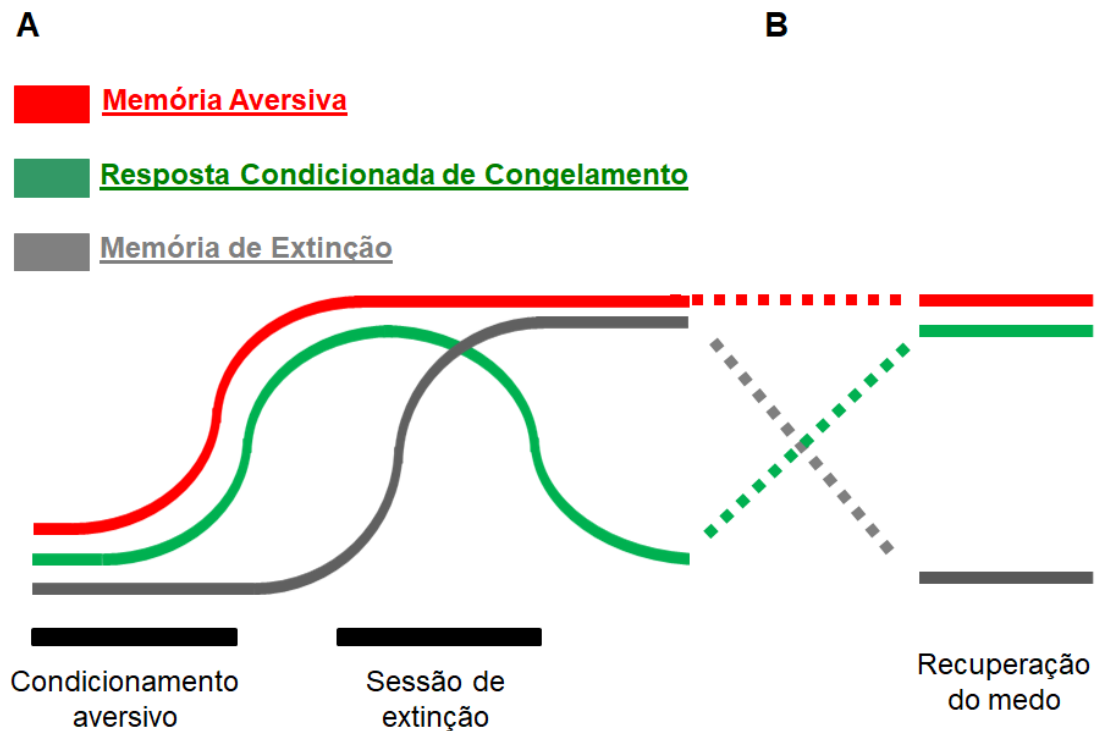


Figura 2. Relação esquemática entre a supressão inicial das respostas condicionadas pela extinção e a sua posterior recuperação. A. A memória de extinção não apaga o traço de medo, mas o inibe, diminuindo as respostas condicionadas. **B.** Diversos fatores, entre eles a passagem do tempo, fazem a memória de extinção decair, permitindo o retorno das respostas condicionadas.

Pesquisas recentes identificaram os circuitos neurais responsáveis pela memória de extinção e muitos de seus mecanismos celulares (Herry and Johansen, 2014; Maren *et al*, 2013; Quirk and Mueller, 2008). Após um condicionamento aversivo contextual, a informação do contexto é codificada pelo hipocampo que projeta informações para a amígdala basolateral (BLA), associando a informação contextual com a do estímulo aversivo. Quando reexposto ao contexto condicionado, o traço hipocampal é ativado, levando também à ativação na BLA dos neurônios envolvidos. Por sua vez, a BLA emite projeções para a amígdala central, e esta desencadeia respostas de medo como as de congelamento. Na extinção, a memória é formada em um circuito paralelo, envolvendo o fortalecimento de projeções do hipocampo para o córtex

infralímbico. Quando este circuito é ativado, neurônios infralímbicos ativam projeções excitatórias para uma região contendo as chamadas células intercalares da amígdala, que por sua vez inibem a amígdala central e basolateral, bloqueando a expressão do medo (Figura 3). A análise no nível de circuitos envolvidos mostra claramente como as memórias de medo e de extinção são codificadas por circuitos paralelos, mas que coincidem na amígdala. Como a evocação de ambas as memórias, de medo e de extinção, tem desfechos opostos – a ativação ou inibição da amígdala – o fenômeno de dominância de traço ocorre, determinando qual dos desfechos ocorrerá. Corroborando esta visão, foi demonstrado que, após o procedimento de extinção, as modificações neuronais decorrentes da consolidação da memória inicial persistem (Vetere *et al*, 2011) e que dependendo de qual memória é dominante, circuitos neuronais distintos são ativados (Herry *et al*, 2008).

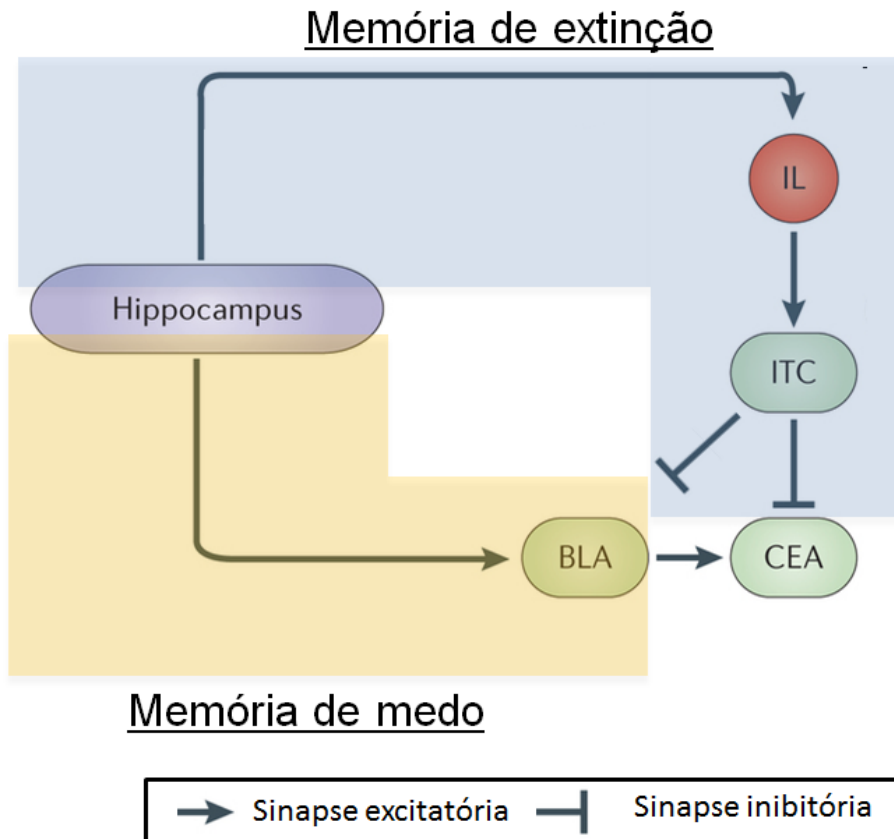


Figura 3. Circuitos da memória de medo e de extinção são distintos, mas coincidem na amígdala. Memórias aversivas contextuais são codificadas por circuitos envolvendo projeções hipocámpais para a amígdala basolateral (BLA). Já na extinção, o circuito responsável por esta memória envolve projeções do hipocampo para o córtex infralímbico (IL) e deste para as células intercalares da amígdala (ITC), que por sua vez inibe a amígdala central (CEA) e BLA. Adaptado de Maren et al., 2013.

O procedimento de extinção é utilizado clinicamente nas chamadas terapias de exposição (Cukor *et al*, 2009; Furini *et al*, 2014), sendo o método mais utilizado na terapia cognitivo comportamental (Johnson and Casey, 2015; Rothbaum and Davis, 2003). Pacientes que passaram por traumas muitas vezes desenvolvem memórias de medo extremamente fortes e incapacitantes. Estas memórias aversivas de trauma tendem a ser evocadas persistentemente, mesmo na ausência de estímulos relacionados ao trauma. Sua evocação também leva a respostas de medo muito intensas, ansiedade generalizada e por vezes ataques de pânico. Visto que a extinção é capaz de inibir a evocação do traço de medo, a terapia de exposição é capaz de melhorar este quadro.

Este método vem sendo empregado com eficácia há décadas, associado ou não à farmacoterapia (Cukor *et al*, 2009; Foa *et al*, 1986). Apesar de muitas vezes efetivo, intrínseco a qualquer procedimento baseado na extinção é a recaída, uma vez que a memória de medo é apenas transitoriamente inibida, mas nunca apagada (Bouton, 2002; Johnson and Casey, 2015). Os mecanismos de recuperação das respostas condicionadas anteriormente descritos (i.e. recuperação espontânea, reaquisição rápida, reinstalação e renovação) são habitualmente observados na clínica (Vervliet *et al*, 2013). Portanto, a busca por intervenções mais eficientes usando os procedimentos de extinção é de grande relevância.

1.5. RECONSOLIDAÇÃO E A MALEABILIDADE DA MEMÓRIA

Em sua forma inicial, a teoria da consolidação pressupunha que apenas a fase de consolidação, responsável pelo armazenamento do traço, envolveria processos neurobiológicos ativos como transcrição gênica, síntese proteica, potenciação sináptica, etc. Uma vez que a memória tivesse sido consolidada, ela seria armazenada permanentemente em um estado fixo, estático, e a evocação seria apenas uma leitura passiva destas informações. Porém, certos achados contradiziam esta visão. Em estudos pioneiros na década de 60 (Misanin *et al*, 1968; Schneider and Sherman, 1968) foi relatado que a memória poderia ser prejudicada caso um tratamento amnésico fosse conduzido após uma sessão de evocação da memória. Importante, esta sessão de evocação (a partir de agora chamada de *reativação* quando no contexto do processo de reconsolidação) foi conduzida dias após o aprendizado inicial, em um momento onde a memória já estava plenamente consolidada e, pela visão da época, deveria estar em um estado resistente a interferências. Estes achados,

chamados na época de amnésia dependente de dicas, sugeriam que ao ser evocada a memória poderia voltar a um estado suscetível a interferências, semelhante ao que ocorre durante o processo inicial de consolidação. Isto levou alguns pesquisadores a hipotetizar que a plasticidade não era confinada aos momentos iniciais da memória, podendo ocorrer também quando ela estivesse sendo ativamente utilizada. Esta ideia foi conceitualizada por Lewis (Lewis, 1979) no modelo dos estados ativos e inativos da memória. Este modelo prediz que as memórias são por essência lábeis e alternam entre dois estados, o inativo e o ativo. O estado inativo ocorre quando uma memória já consolidada não está em uso, e neste caso ela é fixa e não suscetível a modificações. Memórias recentemente adquiridas (antes do término da consolidação) e memórias reativadas (isto é, memórias já armazenadas que estão sendo evocadas) estariam no estado ativo, onde seriam lábeis e passíveis de sofrer interferências.

O modelo dos estados ativos e inativos da memória foi baseado nas mesmas linhas de evidências que sustentavam a teoria da consolidação. A memória é prejudicada se tratamentos amnésicos como choque eletroconvulsivo (Misanin *et al*, 1968; Schneider and Sherman, 1968) ou aprendizado interferente (Gordon, 1977a) forem conduzidos após a reativação. A memória também pode ser modulada positivamente se drogas promnésticas forem administradas após a reativação (Gordon, 1977b). Em todos os casos, estas manipulações só são efetivas se conduzidas temporalmente próximas à reativação, mas não se feitas após um intervalo grande. Isso implica que, assim como ocorre após a aquisição, quando a memória se encontra em um estado lábil que necessita da consolidação para persistir, após a reativação a

memória retornaria a este estado lábil, necessitando de processos neurobiológicos ativos para se reestabilizar.

Esta visão dinâmica da memória, porém, recebeu na época pouca atenção da comunidade científica devido ao forte dogma acerca da teoria da consolidação que dominava a academia. Por muitos anos, o assunto foi pouco discutido e investigado, até que um importante trabalho trouxe o tópico para o centro das atenções ao investigar o tema de maneira sistemática, conceitualizando o fenômeno dentro de uma mecanística neurobiológica (Nader *et al*, 2000). Neste estudo, em uma tarefa comportamental bem compreendida (condicionamento aversivo ao tom em ratos), foi utilizada uma ferramenta farmacológica de ação específica e com propriedade amnésicas clara (o inibidor de síntese proteica anisomicina) diretamente em uma região sabidamente relacionada com as memórias da tarefa utilizada (a BLA). Foi demonstrado que a evocação de uma memória de medo previamente consolidada é capaz levá-la a um estado lábil, tornando-a vulnerável à inibição farmacológica da síntese proteica na BLA. O desfecho amnésico de tal procedimento não ocorreu quando a sessão de reativação foi omitida, ou quando a anisomicina foi infundida após 6 horas da sessão. Também importante, a amnésia não foi observada em um teste de curta duração conduzido 4 horas após a reativação, apenas 24 horas após. Foi dado a este fenômeno o nome de reconsolidação. A reconsolidação prediz que, ao ser evocado, o traço de memória que está estável pode ser reativado, tornado-se desestabilizado. Nesta condição desestabilizada, a memória é lábil e poder ser modificada e, para persistir, necessita ser reestabilizada via processos celulares como a síntese proteica (Figura 4).

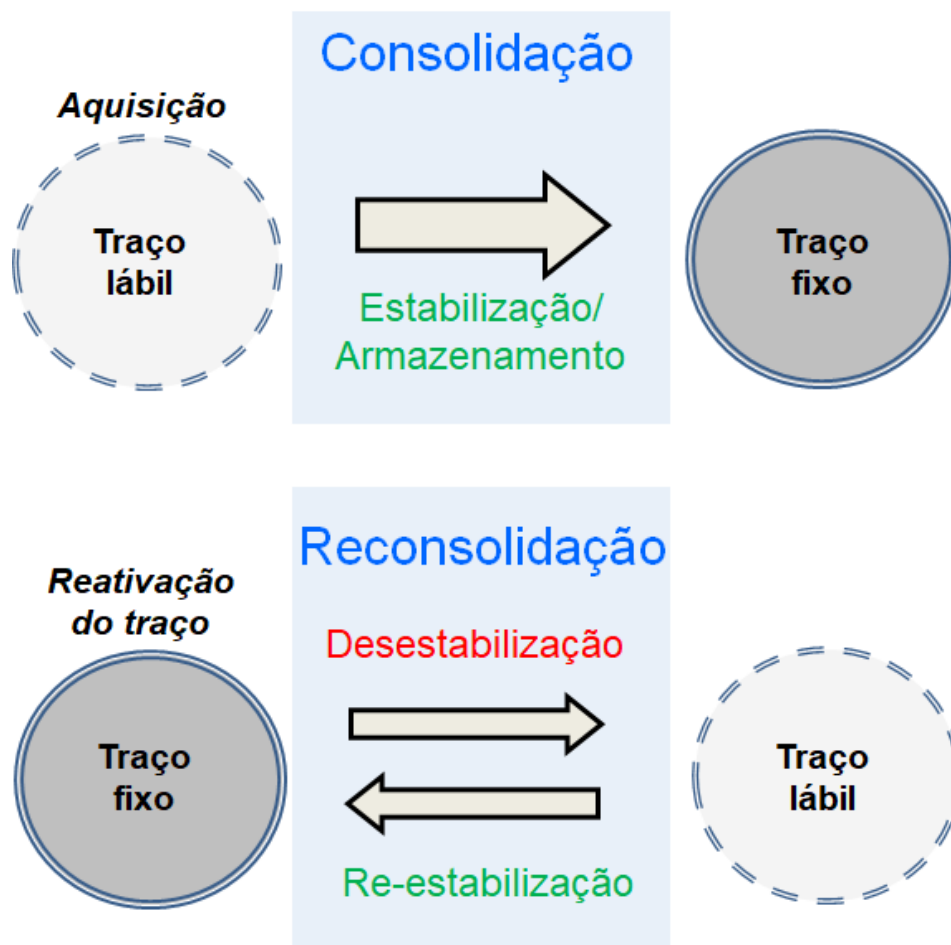


Figura 4. Relação esquemática entre os estados lábeis e fixos da memória na consolidação e na reconsolidação. Após a aquisição a memória se encontra em um estado lábil e instável, necessitando da consolidação para se estabilizar e ser armazenada. Quando o traço é reativado a reconsolidação pode ocorrer. Neste caso, a memória se desestabiliza, tornando-se novamente lábil e necessitando ser reestabilizada para persistir.

Após a publicação deste importante estudo (Nader *et al*, 2000), o tópico passou a ser intensamente investigado no campo da neurociência. A reconsolidação foi demonstrada nas mais diversas tarefas comportamentais, espécies e níveis de análise, indicando que é uma propriedade fundamental da memória (Finnie and Nader, 2012; Nader and Hardt, 2009). Uma ampla gama

de correlatos neurobiológicos da reconsolidação foram identificados (Haubrich and Nader, 2016) e diversas intervenções farmacológicas e moleculares pós-reativação se mostraram eficientes em provocar amnésia, revelando mecanismos cruciais da fase de reestabilização (Tronson and Taylor, 2007). Além disso, estudos mostraram que é possível fortalecer a memória ao modular-se positivamente a reconsolidação. Por exemplo, o tratamento pós-reativação com butirato de sódio (Villain *et al*, 2016), memantina (Samartgis *et al*, 2012), cortisol (Meir Drexler *et al*, 2015), ioimbina (Gazarini *et al*, 2013) e outros (Alberini and Chen, 2012) favorecem o processo de reconsolidação e levam a aumentos de performance.

1.6. FATORES LIMITANTES DA RECONSOLIDAÇÃO

Apesar da reconsolidação ser uma propriedade fundamental da memória, nem sempre quando evocada a memória necessariamente passará por esse processo. Inicialmente, falhas em verificar experimentalmente a reconsolidação foram vistas como evidência negativa de sua ocorrência. Porém, posteriormente foi reconhecido que, na verdade, estes achados revelavam a existência de fatores que são importantes para a indução da fase de desestabilização da reconsolidação (Nader and Hardt, 2009).

Para que a reconsolidação ocorra é necessário que a memória seja i) evocada e ii) labilizada/desestabilizada, caso contrário o traço permanece em seu estado inativo. Foram relatadas diversas condições que diminuem a probabilidade com que uma memória seja desestabilizada após sua evocação (as chamadas condições limitantes da reconsolidação, do inglês “*boundary conditions*”). Entre elas, está a idade da memória, visto que memórias mais

antigas são menos propensas a se reconsolidar do que as recentes (Baratti *et al*, 2008; Eisenberg and Dudai, 2004; Haubrich *et al*, 2015; Suzuki *et al*, 2004). Outro fator importante é a força da memória. Protocolos de condicionamento aversivo muito fortes levam à formação de memórias resistentes à desestabilização (Eisenberg *et al*, 2003; Suzuki *et al*, 2004; Wang *et al*, 2009; Winters *et al*, 2009a).

O fator limitante da força da memória também foi relatado em protocolos onde há aprendizado incremental no decorrer de diversas sessões de treinamento. Nestes protocolos, foi demonstrado que agentes amnésicos pós-reativação são eficientes se administrados quando ainda há espaço para aumento de performance, mas não quando o aprendizado atinge níveis assintóticos (Garcia-DeLaTorre *et al*, 2009; Morris *et al*, 2006; Rodriguez-Ortiz *et al*, 2008). Esta última observação, acerca da discrepância da ocorrência da reconsolidação em memórias bem aprendidas e memórias que ainda não são assintóticas, revelou também o importante papel da novidade. Em protocolos onde a reconsolidação não ocorre, a presença de novidades durante a sessão de reativação é capaz de induzir a reconsolidação (Lee, 2010; Winters *et al*, 2009b). Estudos sugerem que um fator central para a memória ser labilizada é uma diferença entre o que a memória prediz (seu conteúdo) e o que de fato ocorre durante sua evocação (Alfei *et al*, 2015; Sevenster *et al*, 2013). Se a predição não confere exatamente com o desfecho, é detectado um erro de predição (isto é, há uma nova informação), sendo este um gatilho importante para a labilização. Aqui, é importante observar que uma novidade pode ser uma informação nova presente durante a evocação, como um novo objeto colocado pelo observador. Porém, a ausência de novidade do

ponto de vista experimental não significa que, do ponto de vista do animal, ela não exista. Isso por que, por exemplo, um animal que já foi exposto a um contexto mas não teve tempo para armazenar as informações relativas a ele, as verá como novidade ao retornar aquele contexto.

1.7. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA RECONSOLIDAÇÃO

A identificação de que memórias já armazenadas passam por um processo lábil pós-evocação, a reconsolidação, levou a importante questão acerca de seu motivo funcional e fisiológico. Certamente, ela não ocorre a fim de permitir interferências amnésticas sobre o traço. Os estudos relatando fatores limitantes para a ocorrência da reconsolidação que forneceram as primeiras pistas a este respeito. É importante se ter em mente que o processo de reconsolidação pode ser energeticamente custoso, visto que promove alterações plásticas em todo um circuito neuronal responsável pela manutenção de uma informação. Isto envolve processos ativos em diversos níveis, como degradação e síntese proteica, ativação de vias intracelulares, remodelamento sináptico e regulação gênica (Finnie and Nader, 2012; Kaang *et al*, 2009; Tronson and Taylor, 2007). Visto que evocamos memórias a todo momento, seria custoso estar também a todo momento desestabilizando e reestabilizando todas as nossas memórias quando isso não é necessário. Além disso, visto que a reconsolidação permite a modificação da memória, isso abriria janela para interferências indesejáveis em seu conteúdo por estímulos não relevantes. Desta forma, tanto da perspectiva energética quanto da preservação das memórias contra interferências, a reconsolidação deve ser desencadeada apenas em condições em que sua ocorrência de fato é necessária.

A observação de que memórias muito fortes são mais resistentes a se reconsolidar levou à hipótese de que a ela ocorreria justamente para fortalecer memórias fracas. Desta forma, cada vez que uma memória fraca fosse reativada, ela se fortaleceria (Figura 5). Já memórias fracas que não são utilizadas tenderiam a se enfraquecer e serem esquecidas. Visto que memórias constantemente utilizadas provavelmente são importantes, este mecanismo atuaria como a ferramenta pela qual o cérebro seria capaz de realizar a difícil tarefa de selecionar as memórias relevantes e protegê-las do esquecimento. Memórias que já são muito fortes, por outro lado, não necessitariam ser reconsolidadas, explicando o fator constritor da intensidade do treino. Esta visão é sustentada por diversos trabalhos mostrando que a reconsolidação leva ao fortalecimento da memória, promovendo um aumento de performance (Forcato *et al*, 2011; Fukushima *et al*, 2014; Inda *et al*, 2011; Lee, 2008; De Oliveira Alvares *et al*, 2013; Pedroso *et al*, 2013).

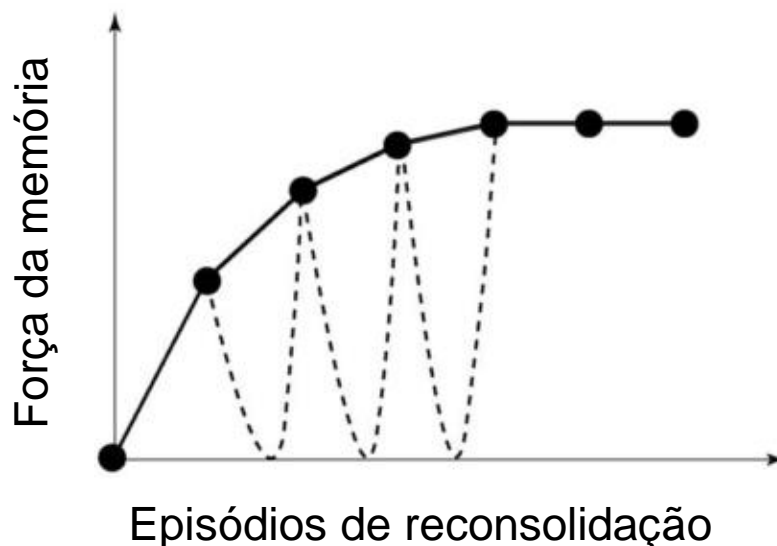


Figura 5. Reconsolidação como processo que permite o fortalecimento da memória. A cada episódio em que uma memória fraca é reconsolidada, sua força aumenta. Quando a memória atinge níveis assintóticos, a indução da reconsolidação deixa de ser necessária. Adaptado de Lee, 2009.

Outra função fisiológica proposta para a reconsolidação é a de permitir que a memória seja atualizada com novas informações presentes durante a sua evocação (Figura 6). Visto que geralmente as memórias são evocadas em situações diferentes das do evento que provocou sua consolidação inicial, a capacidade do traço de ser atualizado com novas informações parece ser crucial para manter o seu conteúdo relevante. Corroborando esta visão estão os estudos anteriormente citados mostrando que, em condições onde a reconsolidação geralmente não ocorre, a apresentação de novidades é capaz de induzir este processo. Trabalhos anteriores de nosso grupo (Crestani *et al*, 2015; Haubrich *et al*, 2015; De Oliveira Alvares *et al*, 2013; Sierra *et al*, 2013) e de outros laboratórios (Forcato *et al*, 2010; Hupbach *et al*, 2007; Monfils *et al*, 2009; Olshavsky *et al*, 2013; Rao-Ruiz *et al*, 2011) demonstraram diretamente esta propriedade atualizadora da reconsolidação.

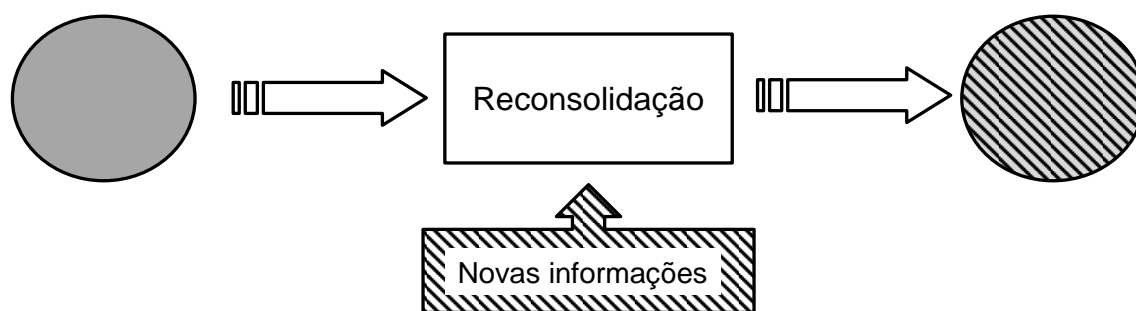


Figura 6. Reconsolidação como processo que permite a atualização do conteúdo da memória. Novas informações relevantes presentes durante a evocação podem ser incorporadas ao traço via reconsolidação, modificando o seu conteúdo.

Quando uma memória é evocada, três desfechos distintos podem ocorrer: a simples evocação da memória sem incorporação de informações; a reconsolidação da memória e sua modificação; a formação de uma nova

memória. Como discutido acima, também são três os fatores conhecidos que modulam a ocorrência da reconsolidação: a idade da memória, a força da memória e a existência de um erro de predição. Quando uma memória é evocada mas não há nada de novo ou relevante, nenhum mecanismo neurobiológico que armazena informações é desencadeado. Quando tal necessidade existe, porém, os três fatores acima interagem para determinar se a memória antiga será modificada, ou uma nova será formada (Figura 6; Besnard, 2012). Memórias muito fortes não precisam de mecanismos de reconsolidação para se fortalecerem ainda mais, e também são percebidas pelo encéfalo como muito importantes. Logo a força da memória atua de modo a limitar a reconsolidação, e novas informações tendem a ser armazenadas em um traço separado. Memórias antigas, por outro lado, teriam a sua labilização inibida em alguns casos visto que as novas informações estão distanciadas temporalmente, e por isso menos relacionadas, sendo em alguns casos mais eficiente armazená-las em um novo traço. Por fim, quanto ao erro de predição, em condições onde há quantidade significativa de novas informações conflitantes com o conteúdo da memória evocada, estas novas informações seriam melhor armazenada separadamente (Sevenster *et al*, 2014). O último caso tem como exemplo típico o caso da extinção, onde há um novo aprendizado oposto que é armazenado via a consolidação de um novo traço.

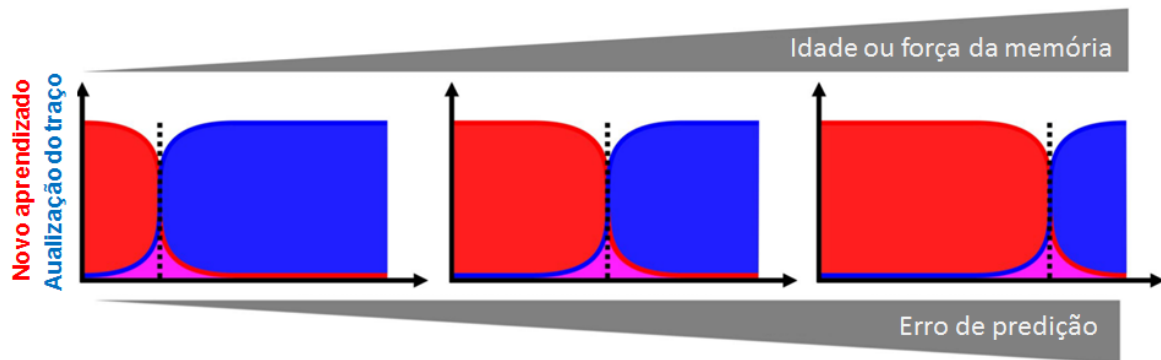


Figura 6. Interação entre diferentes fatores sobre processo a ser desencadeado pela evocação. A medida em que os fatores idade memória, força da memória e erro de previsão aumentam, aumenta também a probabilidade de uma nova memória ser formada, e vice-versa. Adaptado de Besnard, 2012.

1.8. APLICAÇÕES TERAPEUTICAS DA RECONSOLIDAÇÃO

A partir do estudo de Nader e colaboradores (2000), onde o fenômeno da reconsolidação foi demonstrado pela causalidade entre a intervenção amnésica pós-reativação e a consequente redução do medo, rapidamente potenciais aplicações clínicas desse procedimento foram hipotetizadas. O fato de a reconsolidação permitir modificações permanentes no traço de memória torna-a um ideal alvo terapêutico, visto que teoricamente procedimentos baseados nela não apresentariam relapso. Desta forma, memórias mal adaptativas - como as de medo extremo no transtorno do estresse pós-traumático, ou as de atração intensa, como no abuso de substâncias - poderiam ser reativadas com estímulos apropriados, e então apagadas (total ou parcialmente, sendo o último caso o mais realístico) com intervenções amnésicas visando bloquear a reconsolidação. De fato, inúmeros estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que essa estratégia é eficaz tanto em memórias de medo (Gahr *et al*, 2014; Gamache *et al*, 2012; Kindt *et al*, 2014; Kroes *et al*, 2014; Soeter and Kindt, 2015) como em memórias relacionadas a drogas

(Bernardi *et al*, 2006; von der Goltz *et al*, 2009; Robinson and Franklin, 2010; Zhao *et al*, 2011). Um fator complicador para esse método, porém, é que os agentes amnésicos mais efetivos em bloquear a reconsolidação podem ser também tóxicos, ou necessitarem de administrações intraencefálicas, inviabilizando o uso destes em humanos. Desta forma, a busca por intervenções amnésicas efetivas e ao mesmo tempo seguras é componente importante da pesquisa atual no campo da reconsolidação.

Outra estratégia terapêutica é baseada na propriedade funcional da reconsolidação de permitir a atualização da memória com novas informações. Nesta estratégia, não se visa prejudicar a memória alvo com intervenções amnésicas, mas sim ressignificá-la visando modificar o seu componente indesejável. Uma grande vantagem desta estratégia é que ela não necessita do uso de intervenções amnésicas invasivas como o uso de fármacos. Visto que neste caso se explora uma função fisiológica da reconsolidação, e não de ferramentas exógenas para bloquear processos neurobiológicos internos, procedimentos usando esta estratégia por vezes são referidos como sendo de “reconsolidação adaptativa” (do inglês *adaptive reconsolidation*), em oposição ao termo “bloqueio da reconsolidação” (do inglês *reconsolidation blockade*) que se refere ao uso de agentes amnésicos pós-reativação para induzir amnésia. A eficácia do método baseado na reconsolidação adaptativa também foi relatada em diversos trabalhos, tanto em animais de experimentação (Crestani *et al*, 2015; Flavell *et al*, 2011; Haubrich *et al*, 2015; Monfils *et al*, 2009) como em humanos (Oyarzun *et al*, 2012; Schiller *et al*, 2010).

Apesar da ampla gama de trabalhos demonstrando a eficiência das estratégias focadas na reconsolidação para fins terapêuticos, atualmente estes

procedimentos ainda estão na sua infância. Um número importante de trabalhos falhou em reproduzir tais resultados, especialmente em humanos (Golkar *et al*, 2012; Kindt and Soeter, 2013; Marks and Zoellner, 2014; Wood *et al*, 2015), indicando que a translação dos conhecimentos obtidos no nível de ciência básica a partir de estudos em animais para a prática clínica é complexa. O principal ponto desta dificuldade são as variáveis envolvidas nos fatores limitantes sobre a reconsolidação. A natureza biológica desses fatores constrictores ainda são pouco compreendidos mesmo em condições controladas de laboratório, fazendo disto um ponto crucial para uma aplicação mais efetiva e em larga escala de procedimentos baseados na reconsolidação na saúde pública.

No campo teórico, procedimentos baseados na reconsolidação são superiores aos baseados na extinção. O primeiro permite modificações permanentes no traço de memória, enquanto o segundo, apesar de eficiente em inibir o medo, é suscetível à recuperação das respostas aversivas. Porém, como discutido, procedimentos baseados na reconsolidação atualmente pecam pela dificuldade em se estabelecer protocolos efetivos para labilizar a memória em humanos. Por outro lado, a extinção é bem entendida, tanto no âmbito de sua eficácia quanto no de suas limitações. Quase 100 anos após a primeira descrição do fenômeno por Ivan Pavlov (1927), décadas de investigação e prática terapêutica fazem com que os procedimentos baseados na extinção sejam ainda hoje os mais utilizados na terapia cognitivo-comportamental para o tratamento de transtornos relacionados a memórias aversivas. Porém, a forte tendência de recuperação das respostas condicionadas nos procedimentos

atuais de extinção fazem da investigação de novas estratégias mais eficientes uma necessidade.

1.9. RECONSOLIDAÇÃO DO TRAÇO DE EXTINÇÃO

Apesar de a reconsolidação e a extinção serem desencadeadas pela evocação, ambas envolvem processos neurobiológicos distintos e mutuamente exclusivos (de la Fuente *et al*, 2011; Merlo *et al*, 2014). Isto é, durante um episódio de evocação apenas um dos processos será desencadeado. Experimentalmente, a reconsolidação geralmente é observada após reexposições breves ao estímulo condicionado, enquanto a extinção requer uma reexposição muito mais prolongada (Suzuki *et al*, 2004). Consequentemente, agentes amnésicos aplicados após reexposições breves ou longas produzem desfechos opostos, prejudicando a reconsolidação do traço original ou a consolidação do novo traço de extinção, respectivamente (Eisenberg *et al*, 2003; Suzuki *et al*, 2004).

Como qualquer memória de longa duração, a memória de extinção passa pelas fases de aquisição, consolidação, manutenção e evocação (Quirk and Mueller, 2008). Visto que a reconsolidação parece ser um processo intrínseco a todas as memórias, tendo sua ocorrência sido demonstrada nas mais diferentes tarefas, espécies e níveis de análise (Haubrich & Nader, 2016), é possível que a memória de extinção também seja passível de passar por este processo neurobiológico quando evocada. De fato, apesar de muito pouco estudada, a ocorrência da reconsolidação da memória de extinção foi demonstrada em três trabalhos prévios (Eisenberg and Dudai, 2004; Radiske *et al*, 2015; Rossato *et al*, 2010). Neles, uma breve sessão de reativação seguida

de um tratamento amnésico resultou em amnésia da memória de extinção previamente formada, conseqüentemente levando ao retorno da expressão de medo. Ou seja, a reativação tornou a memória de extinção lábil, necessitando da reconsolidação para persistir.

Se a memória de extinção pode ser reconsolidada, hipotetizamos que ela também é suscetível a intervenções focadas neste processo. Aí se incluem as inúmeras modulações dependentes de reconsolidação já reportadas, tanto farmacológicas como comportamentais, visando seu fortalecimento, atualização ou enfraquecimento. Visto (i) o enorme potencial clínico da reconsolidação e somando-se os fatores que atualmente limitam sua aplicação como terapia primária, e (ii) a confiabilidade dos procedimentos de extinção como terapia primária, somada aos seus inerentes pontos fracos, (iii) aqui prevemos que a combinação de ambos os procedimentos pode ser uma estratégia segura e mais eficiente para aplacar transtornos relacionados com memórias de medo.

Neste trabalho, utilizamos o paradigma do medo condicionado ao contexto em ratos para estudar esta possibilidade. Investigamos se i) sessões de reativação seriam capaz de induzir a reconsolidação do traço de extinção e ii) se modulações comportamentais e farmacológicas deste processo poderiam prevenir seu decaimento. Observamos que o traço de extinção é passível de ser reconsolidado e que a modulação deste processo leva ao seu fortalecimento, promovendo robusta proteção contra a recuperação do medo.

Os resultados desta tese estão divididos em dois capítulos, cada qual correspondendo a um artigo produzido durante o doutorado. Especificamente,

no capítulo I constam experimentos que investigam as variáveis experimentais de uma sessão de reexposição ao contexto condicionado que determinam o desfecho neurobiológico a ser desencadeado, a reconsolidação ou a extinção, permitindo o estudo preciso de suas interações. No capítulo II, tal interação entre a extinção e a reconsolidação é então diretamente investigada, focando-se na prevenção da recuperação das respostas de medo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

No modelo de condicionamento aversivo ao contexto em ratos Wistar adultos, determinar os parâmetros experimentais capazes de induzir especificamente a reconsolidação ou a extinção, investigar se é possível induzir a reconsolidação de uma memória de extinção e se este processo permite modulá-la positivamente, levando ao seu fortalecimento e prevenindo a recuperação do medo.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO I

- Determinar se sessões curtas (3 min), intermediárias (9 min) e longas (30 min) de reexposição ao contexto condicionado induzem o processo de reconsolidação ou de extinção, analisando-se o efeito do tratamento pós-reexposição do inibidor de síntese proteica Cicloheximida (Capítulo 1 – Figura Suplementar 2);

- Determinar, no protocolo que induz a reconsolidação, se tal desfecho pode ser prevenido bloqueando-se a fase de desestabilização da memória, analisando-se o efeito da injeção pré-reexposição do bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L Nimodipina sobre a sensibilidade à Cicloheximida pós-reexposição (Capítulo 1 – Figura Suplementar 2);

- Determinar se reexposições de duração efetiva em induzir a reconsolidação podem passar a induzir a extinção quando conduzidas periodicamente, verificando-se os níveis de expressão de medo no decorrer das sessões (Capítulo 1 – Figuras 2-3);

- Determinar se reexposições periódicas de duração efetiva em induzir a reconsolidação podem passar a induzir a extinção quando conduzidas em tempos remotos, verificando-se os níveis de expressão de medo no decorrer das sessões (Capítulo 1 – Figura Suplementar 3);

- Desenvolver um protocolo de reaquisição rápida do medo, avaliando-se a capacidade de um treino fraco em recuperar as respostas aversivas após uma reexposição efetiva em induz extinção (Capítulo 1 –Figura 3).

2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO II

- Determinar o padrão temporal de enfraquecimento da memória de extinção pela avaliação do fenômeno de recuperação espontânea do medo (Capítulo 2 –Figura 1);

- Determinar se sessões curtas de reativação, conduzidas dentro da janela temporal em que a extinção é predominantemente expressa, previnem a recuperação espontânea do medo (Capítulo 2 – Figura 2);

- Determinar a causalidade entre (i) o efeito das sessões de reativação sobre a recuperação espontânea do medo e (ii) a indução da desestabilização do traço de extinção pelas reativações, pela injeção pré-reativação do bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L nimodipina (Capítulo 2 – Figura 3);

- Determinar se a sessão de reativação induz o processo de reconsolidação da memória de extinção analisando-se o efeito de uma droga amnésica sobre sua retenção, pela injeção pós-reativação do inibidor de síntese proteica cicloheximida (Capítulo 2 – Figura 4);

- Determinar se a modulação farmacológica prómnestica da reconsolidação da memória de extinção torna-a protegida contra a reacquirição rápida do medo, pela injeção pós-reativação do inibidor da enzima histona deacetilase butirato de sódio (Capítulo 2 – Figura 5).

3. CAPÍTULO I

Artigo científico intitulado “Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information” publicado em 2015 na revista *Neuropsychopharmacology*, 40: 315–326.

Reconsolidation Allows Fear Memory to Be Updated to a Less Aversive Level through the Incorporation of Appetitive Information

Josue Haubrich^{1,2}, Ana P Crestani^{1,2}, Lindsey F Cassini^{1,2}, Fabiana Santana^{1,2}, Rodrigo O Sierra^{1,2}, Lucas de O Alvares^{1,2,3} and Jorge A Quillfeldt^{*,1,2,3}

¹Psychobiology and Neurocomputation Lab, Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

²Neurosciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

The capacity to adapt to new situations is one of the most important features of memory. When retrieved, memories may undergo a labile state that is sensitive to modification. This process, called reconsolidation, can lead to memory updating through the integration of new information into a previously consolidated memory background. Thus reconsolidation provides the opportunity to modify an undesired fear memory by updating its emotional valence to a less aversive level. Here we evaluated whether a fear memory can be reinterpreted by the concomitant presentation of an appetitive stimulus during its reactivation, hindering fear expression. We found that memory reactivation in the presence of appetitive stimuli resulted in the suppression of a fear response. In addition, fear expression was not amenable to reinstatement, spontaneous recovery, or rapid reacquisition. Such effect was prevented by either systemic injection of nimodipine or intra-hippocampal infusion of ifenprodil, indicating that memory updating was mediated by a reconsolidation mechanism relying on hippocampal neuronal plasticity. Taken together, this study shows that reconsolidation allows for a 're-signification' of unwanted fear memories through the incorporation of appetitive information. It brings a new promising cognitive approach to treat fear-related disorders.

Neuropsychopharmacology (2015) **40**, 315–326; doi:10.1038/npp.2014.174; published online 13 August 2014

INTRODUCTION

Previously established memories might become labile following retrieval, requiring to be reconsolidated in order to endure (Nader *et al*, 2000). It has been suggested that the functional role of reconsolidation is to allow new information to be integrated into the background of an established memory (Besnard *et al*, 2012; Lee, 2009; Rodriguez-Ortiz *et al*, 2005), retaining its predictive and adaptive relevance. Supporting this view, reconsolidation-mediated updating was reported in human episodic memory paradigms (Forcato *et al*, 2010; Hupbach *et al*, 2007) and in animal studies using aversive (Monfils *et al*, 2009; De Oliveira Alvares *et al*, 2013; Rao-Ruiz *et al*, 2011; Sierra *et al*, 2013) and appetitive paradigms (Olshavsky *et al*, 2013b).

Therapeutic approaches to fear-related disorders such as posttraumatic stress disorder (PTSD) aim to hinder aversive responses expressed in the presence of trauma-related cues (Cukor *et al*, 2009). Reconsolidation provides a promising strategy to modify undesired fear memories in such psychiatric conditions, by updating its emotional valence to a less aversive level. As reconsolidation allows permanent changes in the memory trace (Díaz-Mataix *et al*, 2011; Doyère *et al*, 2007; Monfils *et al*, 2009; Nader *et al*, 2000), it could be a more effective strategy than extinction-based therapies—in which fear responses often return by either the passage of time (spontaneous recovery) or exposure to the unconditioned stimulus (reinstatement). It happens because extinction does not disrupt the original memory trace but induces new learning that transiently inhibits fear expression (Archbold *et al*, 2010; Bouton *et al*, 2012; Rescorla and Heth, 1975).

Recent studies have explored the reconsolidation process as a therapeutic target, focusing on memory-related fear and anxiety (Blundell *et al*, 2008; Gamache *et al*, 2012; Parsons and Ressler, 2013; Steckler and Risbrough, 2012; Stern *et al*, 2012). However, their approaches rely mostly on pharmacological interventions aiming to disrupt reconsolidation. Nonetheless, it may be problematic for human application, as most of these pharmacological agents would require intracranial administration, and some of them are

*Correspondence: Dr JA Quillfeldt, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (Psychobiology and Neurocomputation Lab), Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenue Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-970, Brazil, Tel: +55 51 3308 7604, Fax: +55 51 3308 7003, E-mail: quillfe@ufrgs.br

³These authors contributed equally to this work.

Received 27 October 2013; revised 11 June 2014; accepted 26 June 2014; accepted article preview online 15 July 2014

toxic. On the other hand, the possibility to modify memory through reconsolidation updating mechanisms without any drug provides a much safer therapeutic approach, as previously reported (Monfils *et al*, 2009; Rao-Ruiz *et al*, 2011; Schiller *et al*, 2010). As reconsolidation allows changes in the memory content through the incorporation of new information (De Oliveira Alvares *et al*, 2013), it may be able to update fear memories to a less aversive state.

The association between neutral (eg, context) and emotional stimuli (eg, footshock or food) elicits memories of both positive and negative valence. After learning, the brain produces negative affective reactions, such as fear, when re-exposed to neutral stimuli that predict pain; and positive reactions, such as pleasure, when re-exposed to stimuli that predict rewards (Gross and Canteras, 2012; Robinson and Berridge, 2013). A recent study has shown that an aversive learned cue for unpleasantness can become desirable when rats were placed in a different physiological state (Robinson and Berridge, 2013), suggesting that emotional valence can be an important target for memory modifications.

Here we hypothesize that if a contextual fear memory is reactivated in the presence of an appetitive stimuli, such positive information could be incorporated through reconsolidation, retuning its emotional valence to a less aversive level. The updated memory would then contain two emotionally opposite associations—a negative context/shock and a positive context/appetitive association. Our findings show that animals exposed to appetitive stimuli during memory reactivation exhibited a robust and long-lasting decrease in fear expression, confirming our hypothesis.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Male (weighing 210–260 g) and female (180–230 g) Wistar rats from our breeding colony, aged 60–70 days, were used. Animals were housed in plastic cages, 4–5 per cage, with water and food available *ad libitum*. Female subjects were not classified according to their estrous cycle phase, just randomly pooled in the groups. All experiments were performed in accordance with the national animal care legislation and guidelines (Brazilian Law 11794/2008) and approved by the University's Ethics Committee.

Appetitive Stimuli

In the first experiment, different types of palatable food were used as appetitive stimuli: chocolate (milk chocolate, Garoto), sugar cubes, or sweetened cereal (Froot-Loops, Kellogg's). In the remaining experiments, only chocolate was used as appetitive stimulus.

Habituation to Appetitive Stimuli

For 3 consecutive days, animals were habituated in their homecages to one of the available appetitive stimuli consisting of 4-h exposure/day with 5 g (in chunks) of the respective palatable food available per animal. Food was fully consumed in this period. In the first experiment, an additional control group was habituated to neutral objects

the same size and shape of the chocolate chunks ($4 \times 3 \times 1 \text{ cm}^3$ aluminum blocks).

Contextual Fear Conditioning (CFC)

Forty-eight hours after the last habituation, rats were trained on CFC. The CFC chamber consisted of an illuminated Plexiglas box ($25.0 \times 25.0\text{-cm}^2$ grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). In the conditioning (training) session, rats were placed in the chamber for 3 min and then received two 2-s, 0.5-mA footshocks separated by a 30-s interval. Animals were kept in the conditioning environment for an additional minute before returning to their homecages.

Memory Reactivation and Test

Memory reactivation sessions consisted of 3-min re-exposure to the conditioned context. Reactivations were conducted three times, at days 3, 5, and 7 after training. In the experiment 2, two additional groups were submitted to a single 3- or 9-min reactivation session 5 days after training. In the experiment 6, a group of animals was reactivated on days 30, 32, and 34 after training. During the reactivation sessions of the appetitive stimuli groups, palatable food (chocolate, sugar, or sweetened cereal) were placed on the grid floor of the CFC chamber, and animals were able to explore and eat them. Controls were reactivated in the context without any appetitive stimuli. In the first experiment, an additional control group was exposed to a neutral stimulus instead of the appetitive stimulus. In the experiment 3, an additional control was exposed to the appetitive stimulus in a standard empty homecage (3-min exposures on days 3, 5, and 7 after training—unpaired appetitive stimulus group). In experiment 4, reactivation sessions of both the control and the appetitive stimulus groups were conducted in a novel context that did not share any attribute with the training one, as previously described (De Oliveira Alvares *et al*, 2012). In the experiment 5, the appetitive stimulus was presented immediately after the reactivation sessions, during 3-min in another chamber (standard homecage without roommates).

During the test (10 days after training in all experiments, except on experiment 6, in which a group was tested 37 days after training), animals were re-exposed to the training context for 4 min without any food. In the experiment 1, animals received two immediate 2-s 0.5-mA non-paired footshocks (in a $15 \times 10 \times 11.5 \text{ cm}^3$ blue polypropylene box) 24 h after test and were retested for reinstatement in the following day. In the experiment 2, animals were retested 21 days after the first test in order to check for spontaneous recovery. In the experiment 3, after a 4-min test session, animals received a 2-s, 0.25-mA footshock and were removed from the context after additional 30 s (weak retraining sessions). Twenty-four hours later, they were retested for savings effect. Freezing behavior was always measured by a blind researcher.

Stereotaxic Surgery and Cannulae Implantation

Animals used in the experiment 6 were anesthetized by ketamine and xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively).

Guide cannulae were bilaterally implanted at AP -4.2 mm (from bregma), LL ± 3.0 mm, DV 1.8 mm, 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (Supplementary Figure S4). Behavioral procedures were performed 1 week after surgery. Animals with inaccurate cannulae position were excluded from the statistical analysis.

Drugs

Glucose (Sigma) was dissolved in sterile isotonic saline to a concentration of 100 mg/ml. Glucose or its vehicle were injected intra-peritoneally immediately before the reactivation sessions. The total volume injected was 1 ml/kg.

Protein synthesis inhibitor cycloheximide (Sigma) was dissolved in 1% sterile isotonic saline with 1% dimethylsulfoxide to a concentration of 2.2 mg/ml. Cycloheximide or its vehicle were injected intra-peritoneally immediately after the reactivation. The total volume injected was 1 ml/kg.

The L-type voltage-gated calcium channels (LVGCCs) antagonist nimodipine (Sigma) was dissolved in sterile isotonic saline with 8% dimethylsulfoxide to a concentration of 16 mg/ml. Nimodipine or its vehicle was injected subcutaneously 30 min before the reactivation sessions. The total volume injected was 1 ml/kg.

Ifenprodil (Sigma), the selective antagonist of the GluN2B NMDA_R subunit, was dissolved in a phosphate-buffered saline to a concentration of 1 mg/ml. Ifenprodil or its vehicle was infused intrahippocampally at a slow rate (20 μ l/h; 0.5 μ l/side), 15 min before the reactivation sessions.

Glycemia

Blood was collected from the tip of the tail, and glycemia was assessed by On-Call Plus Blood Glucose Monitoring System glucometer (Acon Labs Inc., San Diego, USA).

Data Analysis

Memory was measured quantifying freezing behavior and expressed as percentage of the total session time. Reactivation data was analyzed using Student's *t*-test or repeated-measures ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test. Fear conditioning tests and glucose blood levels measurements were analyzed using Student's *t*-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

RESULTS

Experiment 1: Repeated Reactivations in the Presence of Appetitive Stimuli Lead to the Attenuation of Fear Memory

It has been suggested that reconsolidation enables memory updating by adding new information into the background of a previously stored memory (Lee, 2009). Here we asked whether fear memory updating could modify its emotional valence to a less aversive level.

In order to induce reconsolidation, rats were fear conditioned (CFC), and later, memory was reactivated three times by 3-min context re-exposures. In the appetitive stimuli groups, palatable food (chocolate, sugar, or sweetened cereal) were present inside the conditioned

context during reactivations. Control groups were carried out in the absence of food or in the presence of a neutral stimulus during reactivations (Figure 1a). We hypothesized that reactivation in the presence of an appetitive stimulus would favor fear memory reinterpretation, changing its valence into a less aversive level.

During reactivations sessions (Figure 1b), repeated-measures ANOVA revealed no effect of session ($F_{(2,50)} = 0.257$, $P = 0.774$) or session \times group interaction ($F_{(8,50)} = 0.425$, $P = 0.901$) but significant effect of group ($F_{(4,25)} = 10.66$, $P < 0.001$). Tukey's *post-hoc* indicated that rats from the appetitive stimulus group showed lower freezing levels compared with both animals reactivated without any food (chocolate: $P = 0.001$; cereal group: $P < 0.001$; sugar group: $P = 0.021$) and animals reactivated in the presence of neutral objects (chocolate group: $P = 0.003$; cereal group: $P = 0.002$), with the exception of the sugar group ($P = 0.09$). Hence, the presence of appetitive stimuli during memory reactivation was able to hinder fear expression.

In the test session, one-way ANOVA revealed significant differences among the groups ((Figure 1c; $F_{(4,25)} = 5.66$, $P < 0.002$). Tukey's *post-hoc* indicated that subjects reactivated in the context containing chocolate or cereal, but not sugar, persisted expressing lower freezing levels in comparison with those reactivated without any food (chocolate group: $P = 0.036$; cereal group: $P = 0.014$; sugar group: $P = 0.31$) and those reactivated with neutral objects (chocolate group: $P = 0.029$; cereal group: $P = 0.011$; sugar group: $P = 0.27$). These data suggest that the repeated reactivation in the presence of some appetitive stimulus (chocolate and cereal, but not sugar) enabled memory to incorporate the emotionally positive information, updating its emotional content to a less aversive level.

Extinction is a form of new learning that is effective in inhibiting conditioned fear responses. However, it fails to suppress fear memory permanently due to reinstatement, spontaneous recovery, and rapid reacquisition (Bouton et al, 2006). In contrast, memory updating would possibly allow permanent changes on fear expression. Thus, we evaluated whether an unpaired US (footshock) presentation would reinstate fear expression. In the retest after the reinstatement procedure (Figure 1d), one-way ANOVA showed significant differences among groups ($F_{(4,25)} = 6.52$, $P < 0.001$). Tukey's *post-hoc* test revealed that animals reactivated in the presence of chocolate or cereals persisted in exhibiting lower freezing levels in comparison with those reactivated without any food (chocolate group: $P = 0.01$; cereal group: $P = 0.017$; sugar group: $P = 0.407$) and in the presence of neutral stimulus (chocolate group: $P < 0.01$; cereal group: $P = 0.011$; sugar group: $P = 0.33$), similarly as was observed in the first test.

Accordingly, fear expression attenuation induced by appetitive stimuli seems to be permanent. These results suggest that memory emotional content was effectively modified (updated) rather than transiently inhibited.

Experiment 2—Appetitive Stimulus-Induced Memory Updating is Long-Lasting and not Gender-Specific

In the first set of experiments, CFC memory reactivation in the presence of appetitive stimuli was able to suppress fear

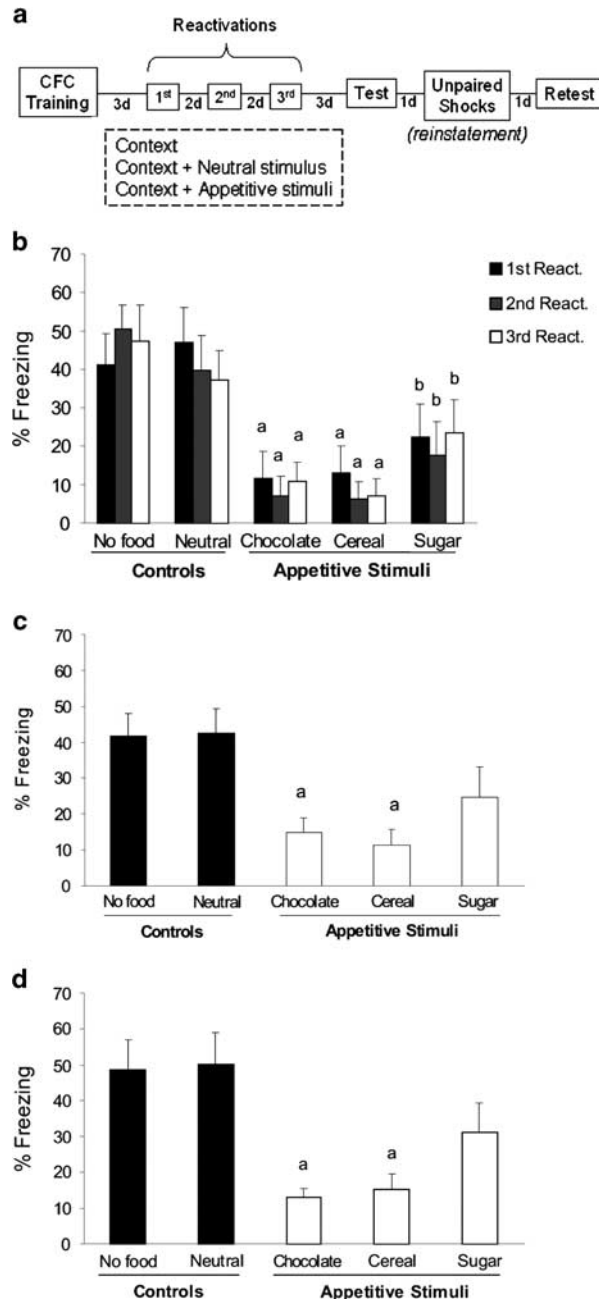


Figure 1 Repeated reactivations in the presence of appetitive stimuli lead to the attenuation of a fear memory. (a) Schematic representation of the experimental procedures. Fear-conditioned rats were submitted to 3-min memory reactivation sessions on days 3, 5, and 7 after training. Reactivations took place in the conditioned context without any food (controls, $n=6$) or in the presence of neutral stimulus ($n=6$) or an appetitive stimulus (chocolate, sweetened cereal, or sugar, $n=6$ per group). On day 10, all groups were tested. On day 11, all groups received two 2-s non-paired footshock (reinstatement) followed by a retest 24 h later. (b) Freezing levels during reactivation sessions. (c) Freezing levels during test. (d) Freezing levels during the retest conducted 24 h after the reinstatement procedure. Data expressed as mean \pm SEM of the percentage of freezing time during reactivations or test. ^aSignificantly different from the no food and neutral groups ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). ^bSignificantly different from the no food group ($P < 0.05$, Tukey's *post-hoc* test).

with no reinstatement. These results indicate that fear inhibition was achieved through the update of fear memory with hedonic information, leading to a modified, less aversive memory. We next evaluated whether the fear suppression induced by our protocol would be long-lasting or prone to spontaneous recovery. Accordingly, animals were submitted to the same procedures described above and were retested 21 days after the first test (Figure 2a).

During reactivations (Figure 2b, left side), repeated-measures ANOVA revealed no effect of session ($F_{(2,34)} = 0.787$, $P = 0.463$) or session \times group interaction ($F_{(2,34)} = 0.798$, $P = 0.458$) but significant effect of group ($F_{(1,17)} = 9.67$, $P < 0.01$), indicating that animals exposed to the appetitive stimulus displayed lower freezing levels than controls. In the first test (Figure 2c, left side) and in the remote test (Figure 2d, left side), animals from the appetitive stimulus group kept expressing lower freezing levels (Student's *t*-test; $t_{(17)} = 5.29$, $P = 0.034$ and $t_{(11)} = 2.89$, $P = 0.015$, respectively). Therefore animals reactivated in the presence of appetitive stimulus showed long-lasting fear suppression, with no spontaneous recovery.

As the previous experiments were conducted with females, we replicated the last experiment in males from the same breeding colony in order to exclude the possibility of a gender-specific phenomenon. Not only freezing levels were very similar between genders, but also male rats displayed the same general response pattern. During reactivations (Figure 2b, right side), repeated-measures ANOVA revealed no effect of session \times group interaction ($F_{(1,13)} = 0.206$, $P = 0.658$) but significant effect of session ($F_{(1,13)} = 13.559$, $P = 0.003$) and group ($F_{(1,17)} = 9.67$, $P < 0.01$), indicating that animals exposed to the appetitive stimulus displayed lower freezing levels than controls. In the first test (Figure 2c, right side) and in the remote test (Figure 2d, right side), animals from the appetitive stimulus group kept expressing lower freezing levels (Student's *t*-test; $t_{(13)} = 3.61$, $P = 0.003$ and $t_{(13)} = 3.75$, $P = 0.009$, respectively). Therefore animals reactivated in the presence of appetitive stimulus showed long-lasting fear suppression, with no spontaneous recovery. Thus the emotional updating induced by this protocol seems to be independent from gender aspects.

The results of this section indicate that the emotional valence of the original fear memory can be altered by the concomitant presentation of appetitive information during multiple memory reactivation sessions, leading to a long-lasting reduction on fear expression.

One could argue if only one reactivation would suffice to induce memory updating. Hence, we conducted an experiment where memory was reactivated once for 3 or 9 min (Supplementary Figure S1A in Supplementary Material). During the 3-min reactivation, rats from the appetitive stimulus group showed significantly less freezing than controls (Student's *t*-test, $t_{(18)} = 2.23$, $P = 0.038$; Supplementary Figure S1B), but no significant difference was found between the groups in the test (Student's *t* test, $t_{(18)} = 0.39$, $P = 0.7$; Supplementary Figure S1C). We hypothesized that a single 3-min reactivation session induced memory updating of little magnitude, leading to a sub-threshold behavioral performance on test. Thus, we next tested for a 9-min reactivation session to allow for a more robust integration of information concerning the appetitive

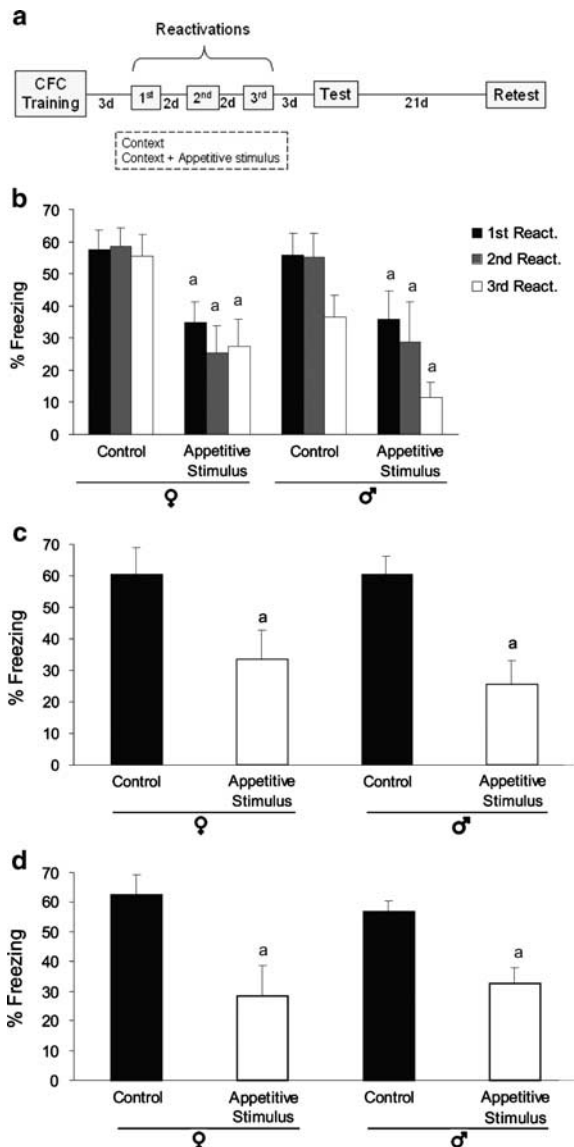


Figure 2 Memory updating induced by appetitive stimulus is long lasting and is not gender specific. (a) Schematic representation of the experimental procedures. Fear-conditioned male and female rats were submitted to memory reactivation sessions on days 3, 5, and 7 after training. Reactivations took place in the conditioned context without any food (control group; females: $n=9$; males: $n=8$) or in the presence of appetitive stimulus (females: $n=10$; males: $n=7$). On day 10, rats were tested and retested 21 days later. (b) Freezing levels during reactivation sessions. (c) Freezing levels during test. (d) Freezing levels during the retest. Data expressed as mean + SEM of the percentage of freezing time during reactivations or test sessions. ^aSignificantly different from the respective control group ($P<0.05$, ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).

stimulus (the 9-min length was not arbitrary, as it is the sum of the multiple short reactivations, and yet, it is not a continuous context re-exposure that could induce an extinction effect). During reactivation, the appetitive stimulus group showed significantly less freezing than controls (repeated-measures ANOVA; $F_{(1,12)}=8.915$, $P=0.014$; Supplementary Figure S1D). No difference was detected among the three 3-min blocks within each group ($F_{(1,12)}=0.15$, $P=0.906$). In the test session, rats

reactivated in the presence of the appetitive stimulus remained showing less freezing than controls (Student's *t*-test, $t_{(11)}=3.4$, $P=0.006$; Supplementary Figure S1E). A retest was conducted 21 days later, and rats from the appetitive stimulus group did not show spontaneous recovery compared with controls (Student's *t*-test, $t_{(11)}=2.54$, $P=0.027$; Supplementary Figure S1F). Next, we tested the 9-min reactivation protocol for reinstatement (Supplementary Figure S1G). Again, the appetitive stimulus group showed significantly less freezing than controls during reactivation (repeated-measures ANOVA; $F_{(1,13)}=22.304$, $P<0.001$; Supplementary Figure S1H) with no within-group difference ($F_{(2,26)}=1.905$, $P=0.169$). In the test, animals from the appetitive stimulus group maintained the low freezing levels (Student's *t*-test, $t_{(13)}=4.4$, $P=0.001$; Supplementary Figure S1I), and fear was not reinstated in the retest (Student's *t*-test, $t_{(13)}=5.8$, $P>0.001$; Supplementary Figure S1J). Therefore these results show that memory updating can be also achieved with a single, yet longer, reactivation session in the presence of appetitive stimulus.

Experiment 3—The Updated Memory does not Reacquire the Aversive Association after a Weak Reconditioning

Next, we evaluated whether the fear expression of an updated memory would be reacquired after a weak retraining. Accordingly, animals were fear conditioned and underwent memory reactivations paired or not with an appetitive stimulus. An additional control group was not submitted to reactivation but exposed to the appetitive stimulus for the same amount of time and at the same time-points (hour of the day) of the reactivations in the empty homecage (unpaired appetitive stimulus group). Also, a parallel group was submitted to a 30-min extinction training instead of the multiple reactivations. In the test, freezing was assessed for 4 min, and then animals received a weak footshock (2 s, 0.25 mA). In the next day, animals were retested for savings effect (Figure 3a).

During reactivations, the appetitive stimulus group showed lower freezing levels than controls (repeated-measures ANOVA; $F_{(1,5)}=85.306$, $P<0.001$; Figure 3b). In the extinction training, repeated-measures ANOVA showed a significant time-dependent decrease on freezing ($F_{(1,15)}=33.73$, $P=0.002$; Figure 3c). In the test session (Figure 3d), one-way ANOVA indicated significant differences among the groups ($F_{(3,30)}=26.11$, $P<0.001$). Tukey's *post-hoc* test revealed no difference between the control and unpaired appetitive stimulus group ($P=0.38$). However, the appetitive stimulus and extinction groups expressed lower freezing levels than the other groups ($P<0.01$).

In the savings test (Figure 3e), one-way ANOVA indicated significant differences among the groups ($F_{(3,30)}=10.05$, $P<0.001$). Tukey's *post-hoc* test revealed that the extinction group rapidly reacquired the contextual fear memory, expressing the same freezing levels than the control and unpaired appetitive stimulus groups ($P>0.05$). On the other hand, the appetitive stimulus group persisted expressing lower freezing levels than the control groups ($P<0.05$), despite not differing from the extinction group ($P=0.068$). Importantly, repeated-measures ANOVA followed by

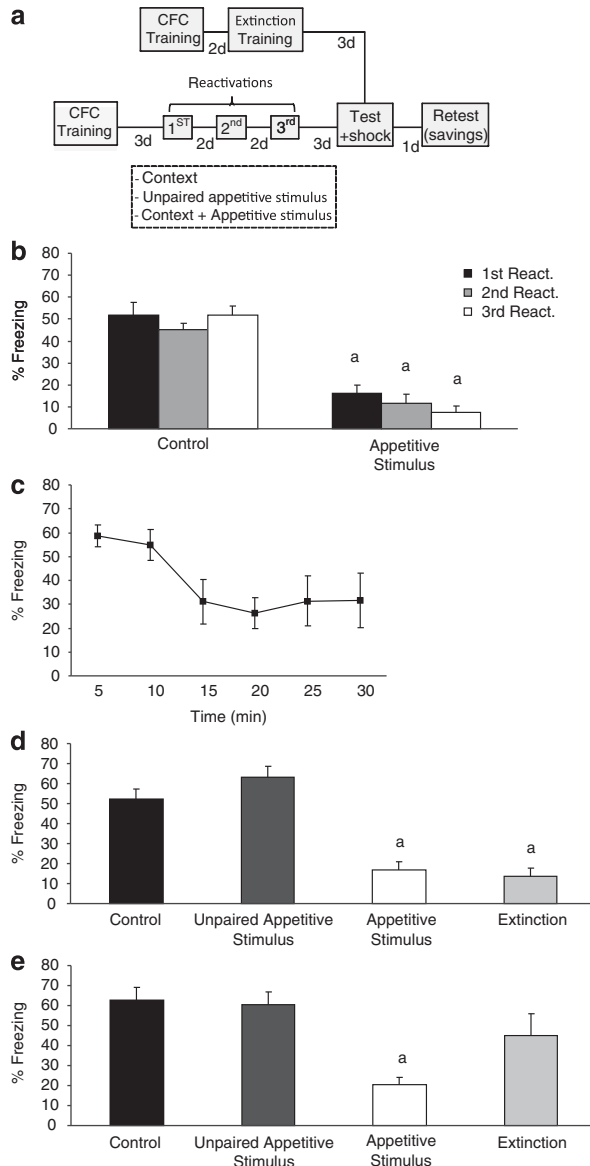


Figure 3 The updated memory does not reacquire the aversive association after a weak reconditioning. (a) Schematic representation of the experimental procedures. Fear-conditioned rats were submitted to memory reactivation sessions on days 3, 5, and 7 after training. Reactivations took place in the conditioned context without any food (control group; $n=8$) or in the presence of appetitive stimulus ($n=9$). Another group was submitted to an extinction session on day 7 ($n=6$). An additional control received the appetitive stimulus in an empty homepage (unpaired appetitive stimulus; $n=8$). On day 10, rats were tested and then received a 2-s 0.25-mA footshock. On day 11, animals were retested for savings. (b) Freezing levels during reactivation sessions. (c) Freezing levels during extinction training. (d) Freezing levels during test. (e) Freezing levels during the retest. Data expressed as mean + SEM of the percentage of freezing time during reactivations or test sessions. ^aSignificantly different from the respective control group ($P<0.05$, repeated-measures ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). In the extinction training, there was a significant within-session difference (repeated-measures ANOVA, $P=0.02$).

Tukey's *post-hoc* test found no difference between test and savings test session in the appetitive stimulus group ($P>0.05$) but revealed a significant increase in fear expression in the extinction group ($P<0.001$). This experi-

ment shows that the emotional-updating procedure does not lead to savings, suggesting that memory valence was effectively re-evaluated.

Experiment 4: Memory Reactivation is a Necessary Condition to the Update of its Emotional Content

To verify whether the above effects are dependent on memory reactivation, fear-conditioned rats were exposed three times to a novel context containing appetitive stimulus (Figure 4a). We predicted that this protocol would not be effective as fear memory would not be associated with the hedonic information.

As expected, there was no significant effect of session, group, and session \times group interaction during reactivations (Figure 4b; Repeated-measures ANOVA $P>0.05$) and in the test (Figure 4c; Student's *t*-test, $t_{(11)}=0.05$, $P=0.96$). This result shows that memory requires to be reactivated in order to reconsolidate and has its emotional content updated with hedonic information.

Experiment 5: Memory Valence Updating does not Depend on Nutritional Properties of the Appetitive Stimulus or on Glucose Levels

Glycemia is known to have a significant role in learning and memory (Gold and Korol, 2012; Messier, 2004). All the studied appetitive stimuli are rich in glucose, and its ingestion may have induced changes in blood glucose levels. Accordingly, besides its hedonic property, appetitive stimuli consumption may have influenced memory through their nutritional effects.

To address these possibilities, we first trained an additional group of animals as described previously, but immediately after reactivation they were isolated in a standard homepage with access to chocolate for 3 min. In this protocol, animals would ingest the edible appetitive stimulus, but the hedonic eating experience would not be contingent with the context.

During reactivations (Figure 5b, left side), repeated-measures ANOVA revealed significant effect of session ($F_{(2,32)}=5.727$, $P=0.007$) but no effect of session \times group interaction ($F_{(2,32)}=0.252$, $P=0.779$) and group $F_{(1,16)}=0.122$, $P=0.732$). In the test, no difference was found between the groups (Figure 5c, left side; Student's *t*-test, $t_{(16)}=0.589$, $P=0.564$). This result shows that the appetitive stimulus must be presented concomitant with memory reactivation in order to be associated with the conditioned context.

Next, we investigated the effect of glucose injection before reactivations. We injected 100 mg/kg of glucose *i.p.*, a dose previously shown to affect fear memory consolidation (Gold, 1986). During reactivations (Figure 5b, right side), repeated-measures ANOVA revealed no effect of session ($F_{(2,30)}=3.304$, $P=0.050$), group ($F_{(1,16)}=0.122$, $P=0.732$), and session \times group interaction ($F_{(2,30)}=0.214$, $P=0.808$). In the test, no difference was found between the groups (Figure 5c, right side; Student's *t*-test, $t_{(15)}=-0.883$, $P=0.391$). These data indicate that the results described in experiments 1 and 2 were attributed to the hedonic impact of the appetitive stimuli rather than the glucose contained in the palatable foods.

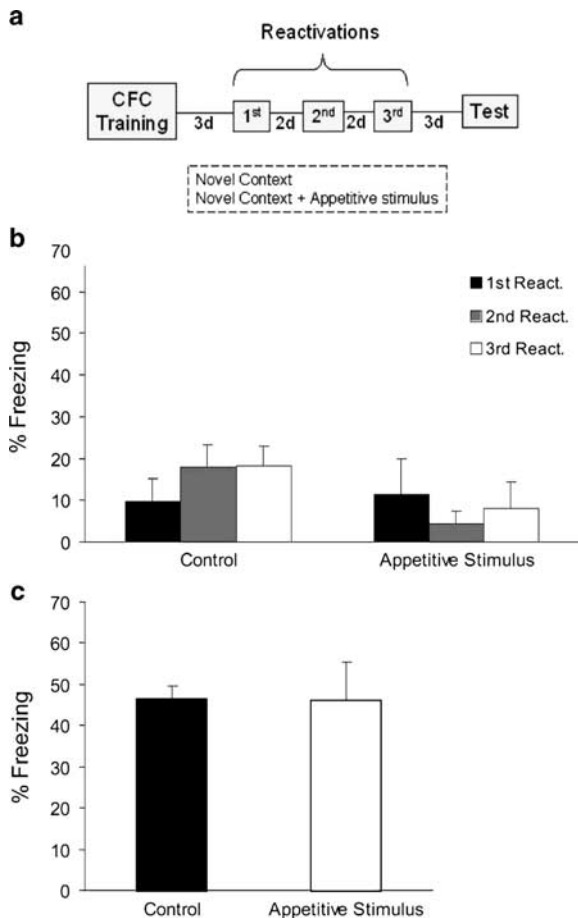


Figure 4 Memory reactivation is a necessary condition to the update of its emotional content. (a) Schematic representation of the experimental procedures. Fear-conditioned rats were submitted to memory reactivation sessions on days 3, 5, and 7 after training. Reactivations took place in a novel context containing appetitive stimulus ($n=6$) or not (control group, $n=7$). On day 10, all groups were tested in the conditioned context. (b) Freezing levels during reactivation sessions. (c) Freezing levels during test. Data expressed as mean \pm SEM of the percentage of freezing time during reactivations or test sessions. There were no significant differences between groups or between sessions in each group.

We also investigated whether chocolate intake would significantly alter the glycemia ($1.4\text{ g} \pm 0.47$ at the third reactivation; Supplementary Table S1A in Supplementary Material). Accordingly, glycemia were measured before and 30 min after appetitive stimulus consumption (2 g of chocolate) or 100 mg/kg i.p. glucose injection. Neither the consumption of the appetitive stimulus nor glucose injections were able to significantly affect the glycemic levels (see Supplementary Table S1B). Taken together, these results suggest that memory updating is caused by the hedonic properties of the appetitive stimuli rather than its nutritional/energetic properties.

Experiment 6: Memory Valence Updating Involves Reconsolidation as it is Mediated by LVGCCs and Hippocampal GluN2B-Containing NMDA Receptors

An established memory reactivation might undergo a labile state, requiring reconsolidation in order to persist or be

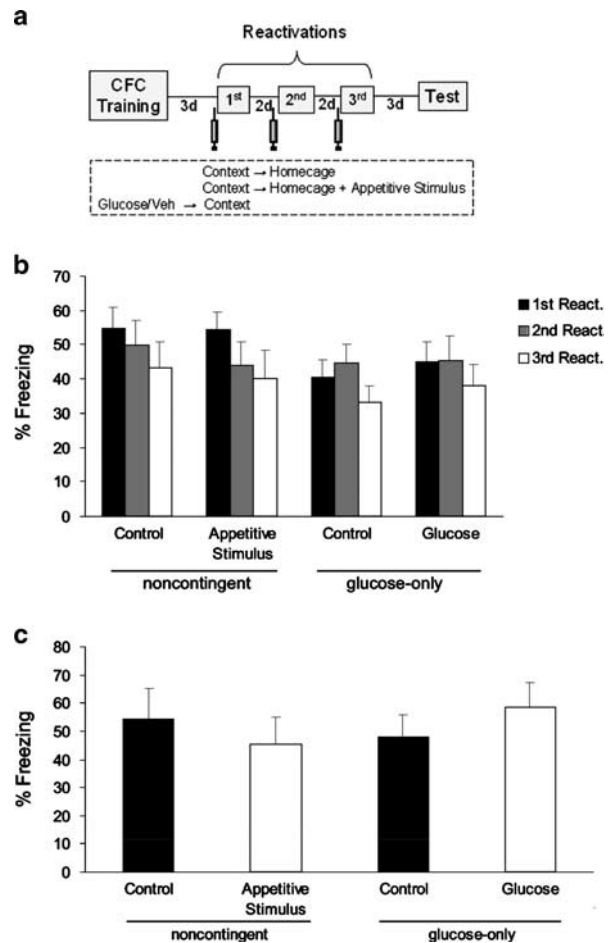


Figure 5 Memory valence updating does not depend on nutritional properties of the appetitive stimulus or on glucose levels. (a) Schematic representation of the experimental procedures. Fear-conditioned rats were submitted to memory reactivation sessions on days 3, 5, and 7 after training. Immediately after reactivations, a group of animals (non-contingent) were left in an empty homecage containing the appetitive stimulus ($n=9$) or not ($n=9$). Another group of animals (glucose-only) were submitted to the same procedure, but instead of being left in the empty homecage, they received i.p. injections of saline ($n=8$) or 100 mg/kg glucose ($n=9$) immediately before reactivations. On day 10, all groups were tested for 4 min. (b) Freezing levels during reactivation sessions. (c) Freezing levels during test. Data expressed as mean \pm SEM of the percentage of freezing time during reactivations or test sessions. There were no significant differences between groups.

updated (Nader *et al*, 2000). Previous studies have reported that the LVGCC activation is required for destabilization of reactivated memory (Suzuki *et al*, 2008; De Oliveira Alvares *et al*, 2013) and requires *de novo* protein synthesis to be reconsolidated (Nader *et al*, 2000). Hence, first we conducted an experiment to know whether our 3-min reactivation protocol was effective in inducing the memory destabilization–reconsolidation process.

Rats were fear conditioned and submitted to a reactivation session 3 days later. In order to disrupt reconsolidation, protein synthesis inhibitor cycloheximide was injected immediately after reactivation. The LVGCC antagonist nimodipine was also injected 30 min before reactivation in order to block memory destabilization/reconsolidation. Animals were tested for 4 min 48 h later (Supplementary

Figure S2A). During the reactivation session (Supplementary Figure S2B), all the groups exhibited similar freezing levels (two-way ANOVA; $F_{(1,46)} = 7.42$, $P > 0.45$). In the test session (Supplementary Figure S2C), two-way ANOVA revealed a significant effect of cycloheximide ($F_{(1,46)} = 7.42$, $P = 0.009$) and a cycloheximide \times nimodipine interaction ($F_{(1,46)} = 5.25$, $P = 0.027$). Tukey's *post-hoc* test indicated that cycloheximide/vehicle group expressed lower freezing levels than the other groups ($P < 0.05$). These data showed that cycloheximide was able to disrupt memory, an effect that was prevented by nimodipine. This confirms that, following a 3-min reactivation session, memory undergoes a destabilization–reconsolidation process.

In addition, we evaluated the effect of cycloheximide after a 9-min continuous reactivation (Supplementary Figure S2D). During reactivation, there was no difference between groups (repeated-measures ANOVA; $F_{(1,12)} = 0.805$, $P = 0.39$; Supplementary Figure S2E) and within groups ($F_{(2,24)} = 1.864$, $P = 0.177$; Supplementary Figure S2E). In the test, rats treated with cycloheximide expressed significantly lower freezing than controls (Student's *t*-test, $t_{(12)} = 2.36$, $P = 0.036$; Supplementary Figure S2F), indicating that reconsolidation was disrupted. Also, we infused cycloheximide in a group of rats that underwent extinction (ie, 30-min context re-exposure; Supplementary Figure S2D). During extinction training, both groups were indistinguishable (repeated-measures ANOVA; $F_{(1, 12)} = 0.059$, $P = 0.811$; Supplementary Figure S2G) and promoted fear extinction within session ($F_{(5,60)} = 13.757$, $P < 0.001$; Supplementary Figure S2G). In the test, cycloheximide-treated rats showed higher freezing levels (Student's *t*-test, $t_{(12)} = 3.226$, $P = 0.007$; Supplementary Figure S2H), indicating that extinction consolidation was disrupted. Hence, both 3- and 9-min reactivation induces the protein synthesis-dependent reconsolidation process, whereas it requires a 30-min context re-exposure to induce extinction.

Next, to directly investigate whether memory emotional updating described in the experiments 1–3 were mediated by reconsolidation, we injected subcutaneously the LVGCC antagonist nimodipine or its vehicle 30 min before each reactivation session (Figure 6a).

During reactivations (Figure 6b), repeated-measures ANOVA revealed a significant difference among groups ($F_{(1,35)} = 78.34$, $P < 0.001$), demonstrating that the appetitive stimulus was able to hinder freezing responses. There was

no effect of drug ($F_{(1,35)} = 0.26$, $P = 0.61$) or group \times drug interaction ($F_{(1,35)} = 0.02$, $P = 0.88$). Thus nimodipine does not affect memory retrieval *per se*.

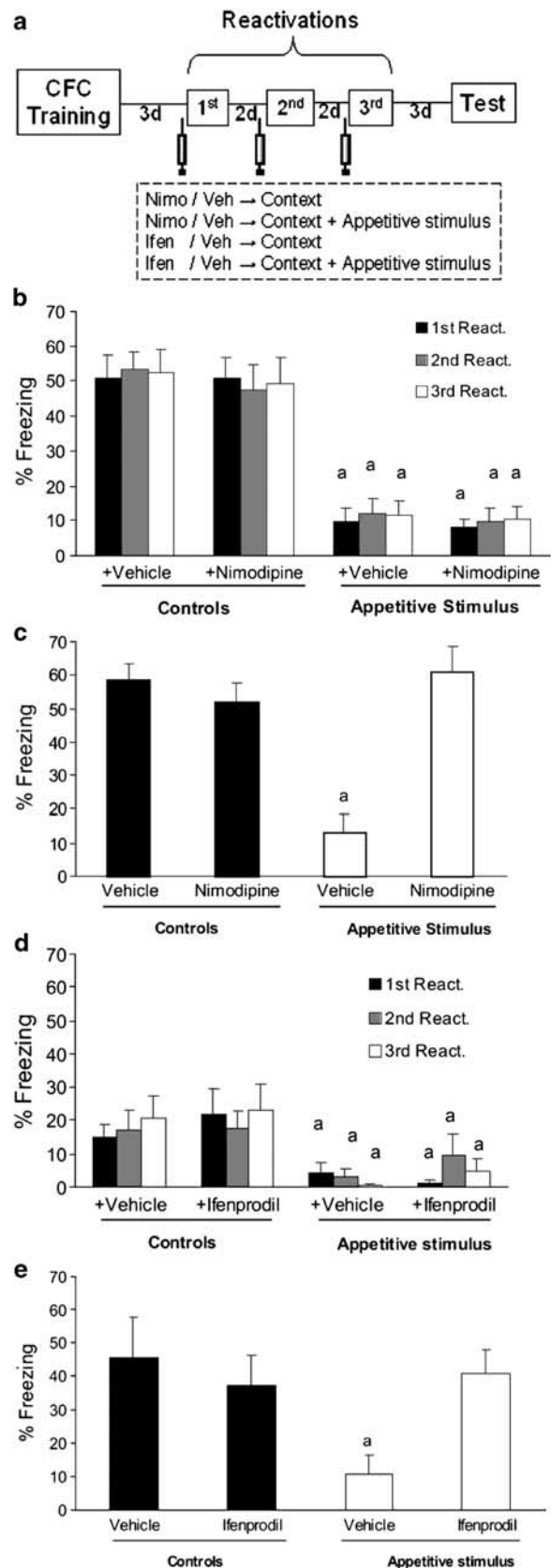


Figure 6 Memory valence updating involves reconsolidation as it is mediated by LVGCCs and hippocampal by GluN2B-containing NMDA receptors. (a) Schematic representation of the experimental procedures. Fear-conditioned rats were submitted to memory reactivation sessions on days 3, 5, and 7 after training. Reactivations took place in the conditioned context without any food or in the presence of appetitive stimulus. On day 10, all groups were tested for 4 min. (b) Freezing levels during reactivation sessions. Nimodipine or its vehicle was administered systemically 30 min before each reactivation ($n = 10$ per group); (c) Freezing levels during test. (d) Freezing levels during reactivation sessions. Ifenprodil (appetitive stimulus group, $n = 6$; control group, $n = 7$) or its vehicle (appetitive stimulus group, $n = 5$; control group, $n = 6$) was infused into the CA1 region of hippocampus 15 min before each reactivation session. (e) Freezing levels during test. ^aSignificantly different from the control group ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).

In the test (Figure 6c), two-way ANOVA showed significant effects of group, drug, and group \times drug interaction (group: $F_{(1,35)} = 9.24$, $P = 0.004$; drug: $F_{(1,35)} = 11.8$, $P = 0.002$, group \times drug: $F_{(1,35)} = 20.66$, $P < 0.001$.) Tukey's *post-hoc* test indicated that subjects from the appetitive stimulus group treated with vehicle differed from all the other groups ($P < 0.001$). Accordingly, blocking the L-VGCC during reactivation prevented fear to be attenuated, showing that the memory content emotional updating relies on the LVGCC-dependent destabilization/reconsolidation process.

As memory ages, it becomes resistant to reconsolidation (Suzuki *et al*, 2004). Hence, we evaluated whether a remote memory could be updated with concomitant appetitive information. First, animals were trained and reactivated 30 days after training Cycloheximide was injected immediately after the reactivation session (Supplementary Figure S3A). During reactivation, there was no difference between groups (Student's *t*-test, $t_{(11)} = 0.452$, $P = 0.66$; Supplementary Figure S3B). In the test, cycloheximide-treated group did not show any difference from the controls (Student's *t*-test, $t_{(11)} = 0.059$, $P = 0.954$; Supplementary Figure S3C), indicating that the remote memory have not reconsolidated. Next, fear-conditioned animals were submitted on days 30, 32, and 34 after training to reactivation sessions in the presence, or not, of the appetitive stimulus (Supplementary Figure S3D). During reactivations, repeated-measures ANOVA showed that the appetitive stimulus group exhibited lower freezing levels than controls ($F_{(1,13)} = 13.24$, $P = 0.003$; Supplementary Figure S3E). In the test, however, fear expression of the appetitive stimulus group was not different from the control levels (Student's *t*-test, $t_{(13)} = 0.458$, $P = 0.654$; Supplementary Figure S3F). Accordingly, a remote memory should be resistant to reconsolidation and, as a consequence, should also not be amenable to updating.

The hippocampus is a central brain structure with respect to contextual fear memory reconsolidation (Winocur *et al*, 2009), and the NMDA_R containing GluN2B subunit is essential for the reactivation-induced memory transition from a stable to a labile state (Ben Mamou *et al*, 2006; Milton *et al*, 2013). In order to test this aspect, we infused the selective GluN2B antagonist ifenprodil bilaterally into the CA1 hippocampal region 15 min before each reactivation.

Compared with all the other experimental groups, the observed effect follows the same general pattern verified in Figure 6b and c. During reactivations (Figure 6d), repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of groups ($F_{(1,19)} = 12.49$, $P = 0.002$) but no effect of drug ($F_{(1,19)} = 0.45$, $P = 0.51$) or group \times drug interaction ($F_{(1,19)} = 0.007$, $P = 0.93$). In the test session (Figure 6e), two-way ANOVA revealed marginal group \times drug interaction ($F_{(1,19)} = 4.39$, $P = 0.050$). Tukey's *post-hoc* showed that animals from the appetitive stimulus group receiving vehicle expressed less freezing than those that received ifenprodil ($P = 0.035$) and controls ($P = 0.016$). The lower freezing levels displayed in Figure 6d experiment seems to be just a local effect—probably due to the immobilization procedure needed for the drug infusion—as in the test session, where no previous immobilization was necessary, freezing levels remained similar to that observed in the other experiments.

Thus the hippocampal GluN2B antagonism did not affect fear expression during reactivations, but prevented memory to be updated. This result shows that NMDA-related hippocampal plasticity has a critical role in linking hedonic information to an already consolidated contextual fear memory trace.

DISCUSSION

In the present study, we evaluate the emotional updating of aversive memories through the concomitant presence of hedonic information during reconsolidation. Our results demonstrate that providing stimulus of positive emotional valence during multiple reactivations allows fear memory to be updated to a less aversive level. This procedure resulted in a decreased fear expression when tested in the context previously associated with the footshocks. Moreover, it prevented reinstatement (Experiment 1), spontaneous recovery (Experiment 2), and rapid reacquisition (Experiment 3). Reactivation in the original context was required for the observed effect (Experiment 4), and the concomitant appetitive stimuli relied on its hedonic content to induce updating, as the effect seemed to be dissociated with its nutritional/energetic properties (Experiment 5). We have also found that incorporation of hedonic information to the memory trace is dependent on the destabilization-reconsolidation process, as the phenomenon was prevented both by i.p. injection of the LVGCC antagonist nimodipine and the intrahippocampal infusion of the GluN2B antagonist and is constrained by the memory age boundary condition (Experiment 6).

Taste and smell of food are universal stimuli that produce a hedonic experience, one of the multiple concurrent components of reward (Berridge and Kringelbach, 2013). Previous works have shown that reconsolidation allows memory content to be updated through the incorporation of new information into preexisting memories (for reviews, see Lee, 2009; Besnard, 2012). Also, it has been shown that that an appetitive memory can be updated with aversive information, indicating that memory valence can be changed through reconsolidation (Olshavsky *et al*, 2013b). Here we have demonstrated for the first time that fear memory can be updated with concomitant appetitive information, retuning its emotional valence. Interestingly, two recent papers have shown that animals with distinct orienting phenotypes respond differently to appetitive and aversive memory updating (Olshavsky *et al*, 2013a, b). Here the updating process happened only when chocolate or cereal were presented but not with sugar or a non-edible neutral stimulus. We hypothesize that chocolate and cereal have a more salient hedonic value than the others, allowing for memory updating to a less aversive level.

During conditioning, the acquired context-shock association led to the consolidation of an emotional memory with negative valence. However, reactivating memory concomitantly with an appetitive stimulus resulted in a context-appetitive stimulus association that changed memory emotional valence to a less aversive state. Indeed, when the appetitive stimulus was presented in a different context, such association did not occur (Experiment 4).

Noteworthy, during reactivations the freezing behavior was decreased when appetitive stimulus was present, and somehow this lower emotional state of fear was incorporated into the memory trace. Thus animals kept expressing low freezing levels, even in a posterior test (conducted without appetitive stimuli). One could argue that such effects might be attributed to the nutritional/energetic content of the ingested foods. However, glucose injection before reactivation or chocolate intake in a non-contingent place immediately after reactivation showed no effect on fear expression in the test (Experiment 5). These results show that the fear attenuation effect is not related to the ingested food compounds. However, the lack of effect of glucose here does not rule out the possibility that this substance may affect memory reconsolidation in a different experimental design.

Interestingly, memory was updated to a less aversive level either when the appetitive stimulus was presented during three reactivation sessions of 3 min (Figures 1–3) or during a single 9-min reactivation session (Supplementary Figure S1D–J). However, a single 3-min reactivation was ineffective in hindering fear (Supplementary Figure S1A–C). It is an apparent contradiction as both 3- and 9-min reactivation sessions were able to induce reconsolidation, as indicated by the disruptive effect of the postreactivation infusion of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Supplementary Figure S2A–F). However, it is important to notice that an intervention such as the protein synthesis inhibitor infusion have a dramatic disruptive effect upon memory. On the other hand, the incorporation of appetitive information appears to have a more subtle impact in comparison to the cycloheximide-induced effect. Hence, we hypothesized that the single 3-min reactivation session induces the incorporation of some degree of appetitive information, but this ‘partial’ updating of memory content was not sufficient to retune the overall valence of memory to result in an observable change in behavior. Accordingly, multiple 3-min reactivations or a prolonged 9-min reactivation were required to induce a profound re-evaluation of memory content.

The most common therapy in treating fear-related disorders comes from cognitive behavioral therapies that typically involve extinction-based approaches (Rothbaum and Davis, 2003). However, the fear reduction achieved with extinction and other retroactive interference paradigms such as counterconditioning are not permanent as these procedures do not erase nor modify the original fear memory (Bouton, 2002). Rather, they lead to the formation of a new inhibitory memory that suppress the expression of the initial trace (Bouton *et al*, 2012). On the other hand, modifications on memory content through reconsolidation may allow for permanent changes in fear expression. This idea was reported to be possible in previous studies showing persistent fear suppression by providing an extinction session during the reconsolidation window (Clem and Haganir, 2010; Monfils *et al*, 2009; Schiller *et al*, 2010). It has been shown that the mechanism behind the reactivation–extinction updating involves the mediation of hippocampal GluA2-containing AMPA receptor endocytosis (Rao-Ruiz *et al*, 2011). In this study, we developed a different updating approach by adding information with positive valence during memory reactivation. In order to

evaluate whether our updating protocol induces updating of memory content, or some sort of new learning is taking place, we investigated whether the aversive context–shock association could re-emerge. We found that the reactivation + appetitive stimulus procedure resulted in resilient fear attenuation that was not amenable to reinstatement (Experiment 1), spontaneous recovery (Experiment 2), and rapid reacquisition (Experiment 3), therefore indicating a permanent modification of the memory content.

If a reactivated memory becomes labile and requires reconsolidation in order to persist, then blocking destabilization should also prevent reconsolidation. Previous works showed that memory destabilization/reactivation, but not consolidation or retrieval, depends on the LVGCC and on the GluN2B-containing NMDA receptors. In this work, we have shown that nimodipine (Suzuki *et al*, 2008; Flavell *et al*, 2011; De Oliveira Alvares *et al*, 2013) and ifenprodil (Ben Mamou *et al*, 2006; Milton *et al*, 2013) were both able to block memory destabilization and prevent reconsolidation. We found that both systemic nimodipine and intrahippocampal ifenprodil infused before the reactivation sessions were able to prevent the fear attenuation, indicating that such effect is indeed mediated by reconsolidation (Experiment 6).

Memory become increasingly resistant to reconsolidation with age (Bustos *et al*, 2009; Frankland *et al*, 2006; Milekic and Alberini, 2002; Suzuki *et al*, 2004). Likewise, here we found that protein synthesis inhibition after reactivation disrupts recent (Supplementary Figure S2A–F) but not remote memory (Supplementary Figure S3A–C). We speculated that our reconsolidation-based protocol would also be constrained by this boundary condition. Indeed, our updating protocol failed to promote fear attenuation of 30-days-old memory (Supplementary Figure S3D–F). This could present an important limitation for the treatment of old traumata. However, the fact that older memories are more resistant to be destabilized does not imply that they cannot undergo reconsolidation (Bustos *et al*, 2009; Suzuki *et al*, 2004; Winters *et al*, 2009). For instance, Gräff *et al* (2014) showed that the reactivation–extinction procedure fails to attenuate remote fear memories. Remarkably, they found that remote memories can be updated by pharmacologically upregulating neuroplasticity-related genes. In addition, older memories can undergo reconsolidation through longer reactivation sessions (Bustos *et al*, 2009; Suzuki *et al*, 2004). Hence, memory age is an important boundary condition to reconsolidation-mediated updating, but it can be circumvented by pharmacological manipulations and possibly by other methodological adaptations (such as more intense reactivation sessions).

Several studies have shown that fear memories can be weakened by blocking reconsolidation with different drugs (Nader *et al*, 2000; Debiec and LeDoux, 2006; Lee *et al*, 2006; Besnard *et al*, 2012). However, these pharmacological tools usually cannot be readily administered to humans. In agreement with previous reports (Flavell *et al*, 2011; Monfils *et al*, 2009; Olshavsky *et al*, 2013a; Schiller *et al*, 2010), our results suggest that fear memory can be permanently attenuated without employing drugs or more invasive methodologies. In summary, our findings demonstrate that fear memory may be somehow ‘reinterpreted’ by the

presence of an appetitive stimulus during reactivation. This procedure seems to promote a re-evaluation of the contextual fear memory, turning it into a less threatening experience. The ability to shape emotional content of memories through reconsolidation represent a promising preclinical avenue, leading to putative treatments of fear and anxiety disorders such as PTSD or phobias. Our findings also suggest that the development of new non-pharmacological therapeutic approaches may be quite effective in treating fear-related disorders.

FUNDING AND DISCLOSURE

This work was supported by fellowships and grants from CAPES (MEC), CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), and FINEP ("Rede Instituto Brasileiro de Neurociências," IBN-Net, No. 01.06.0842-00). All the authors declare having no other source of compensation besides primary institution and federal funding. They also report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest relevant to the subject matter of this article.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Mrs Zelma Regina V de Almeida for her kind technical assistance and Dr Carla Dalmaç and Dr Maria Elisa Calcagnotto (Depto Biochemistry, ICBS) for their relevant contributions to this paper.

REFERENCES

Archbold GEB, Bouton ME, Nader K (2010). Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. *Eur J Neurosci* 31: 1303–1311.

Berridge KC, Kringelbach ML (2013). Neuroscience of affect: brain mechanisms of pleasure and displeasure. *Curr Opin Neurobiol* 23: 294–303.

Besnard A (2012). A model of hippocampal competition between new learning and memory updating. *J Neurosci* 32: 3281–3283.

Besnard A, Caboche J, Laroche S (2012). Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Prog Neurobiol* 99: 61–80.

Blundell J, Kouser M, Powell CM (2008). Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem* 90: 28–35.

Bouton ME (2002). Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction four mechanisms of relapse. *Biol Psychiatry* 52: 976–986.

Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran Ka, Maren S (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* 60: 352–360.

Bouton ME, Winterbauer NE, Todd TP (2012). Relapse processes after the extinction of instrumental learning: renewal, resurgence, and reacquisition. *Behav Processes* 90: 130–141.

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.

Clem RL, Huganir RL (2010). Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science* 330: 1108–1112.

Cukor J, Spitalnick J, Difede J, Rizzo A, Rothbaum BO (2009). Emerging treatments for PTSD. *Clin Psychol Rev* 29: 715–726.

De Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt Ja (2013). Reactivation enables memory updating,

precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244: 42–48.

De Oliveira Alvares L, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF et al (2012). Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22: 1092–1095.

Debiec J, LeDoux JE (2006). Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. *Ann NY Acad Sci* 1071: 521–524.

Díaz-Mataix L, Debiec J, LeDoux JE, Doyère V (2011). Once the US-triggered reconsolidation of fear memory and its CS neural representation is disrupted, a rein-statement procedure does not lead to their recovery. *J Neurosci* 31: 9538–9543.

Doyère V, Debiec J, Monfils M-H, Schafe GE, LeDoux JE (2007). Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nat Neurosci* 10: 414–416.

Flavell CR, Barber DJ, Lee JLC (2011). Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nat Commun* 2: 504.

Forcato C, Rodríguez MLC, Pedreira ME, Maldonado H (2010). Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol Learn Mem* 93: 77–84.

Frankland PW, Ding H-K, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ (2006). Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 13: 451–457.

Gamache K, Pitman RK, Nader K (2012). Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 37: 2789–2796.

Gold PE (1986). Glucose modulation of memory storage processing. *Behav Neural Biol* 45: 342–349.

Gold PE, Korol DL (2012). Making memories matter. *Front Integr Neurosci* 6: 116.

Gräff J, Joseph NF, Horn ME, Samiei A, Meng J, Seo J et al (2014). Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell* 156: 261–276.

Gross CT, Canteras NS (2012). The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci* 13: 651–658.

Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L (2007). Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* 14: 47–53.

Lee JLC (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32: 413–420.

Lee JLC, Milton AL, Everitt BJ (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26: 10051–10056.

Mamou C Ben, Gamache K, Nader K (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci* 9: 1237–1239.

Messier C (2004). Glucose improvement of memory: a review. *Eur J Pharmacol* 490: 33–57.

Milekic MH, Alberini CM (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36: 521–525.

Milton AL, Merlo E, Ratano P, Gregory BL, Dumbreck JK, Everitt BJ (2013). Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *J Neurosci* 33: 1109–1115.

Monfils M-H, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE (2009). Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science* 324: 951–955.

Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406: 722–726.

Olshavsky ME, Jones CE, Lee HJ, Monfils M-H (2013a). Appetitive behavioral traits and stimulus intensity influence maintenance of conditioned fear. *Front Behav Neurosci* 7: 179.

- Olshavsky ME, Song BJ, Powell DJ, Jones CE, Monfils M-H, Lee HJ (2013b). Updating appetitive memory during reconsolidation window: critical role of cue-directed behavior and amygdala central nucleus. *Front Behav Neurosci* **7**: 186.
- Parsons RG, Ressler KJ (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nat Neurosci* **16**: 146–153.
- Rao-Ruiz P, Rotaru DC, Van Der Loo RJ, Mansvelder HD, Stiedl O, Smit AB *et al* (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci* **14**: 1302–1308.
- Rescorla RA, Heth CD (1975). Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **1**: 88–96.
- Robinson MJF, Berridge KC (2013). Instant transformation of learned repulsion into motivational ‘wanting’. *Curr Biol* **23**: 282–289.
- Rodriguez-Ortiz CJ, la Cruz V De, Gutiérrez R, Bermudez-Rattoni F (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* **12**: 533–537.
- Rothbaum BO, Davis M (2003). Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions. *Ann NY Acad Sci* **1008**: 112–121.
- Schiller D, Monfils M-H, Raio CM, Johnson DC, Ledoux JE, Phelps EA (2010). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* **463**: 49–53.
- Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J *et al* (2013). Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem* **20**: 379–387.
- Steckler T, Risbrough V (2012). Pharmacological treatment of PTSD—established and new approaches. *Neuropharmacology* **62**: 617–627.
- Stern CAJ, Gazarini L, Takahashi RN, Guimarães FS, Bertoglio LJ (2012). On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology* **37**: 1–11.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* **24**: 4787–4795.
- 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.
- 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.
- Winters BD, Tucci MC, DaCosta-Furtado M (2009). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn Mem* **16**: 545–553.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

Supplementary Figure legends

Supplementary figure 1. A single reactivation allows memory updating

A, Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to a 3 or 9-min memory reactivation session 5 days after training. Reactivations took place in the conditioned context without any food (control group) or in the presence of appetitive stimulus. **B**, Freezing levels during reactivation session (n = 10 per group). **C**, Freezing levels during test. **D**, Freezing levels during reactivation session (control: n =7; appetitive stimulus: n=6). **E**, Freezing levels during test. **F**, Freezing levels during the retest. **G**, Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to a 9-min memory reactivation session 5 days after training. Reactivations took place in the conditioned context without any food (control group) or in the presence of appetitive stimulus. **H**, Freezing levels during reactivation session (control: n = 8; appetitive stimulus: n = 7). **I**, Freezing levels during test. **J**, Freezing levels during the retest. Data expressed as mean+SEM of percent of freezing time during reactivations or test sessions. (a) Significantly different from respective control group (P<0.05, ANOVA or Student's t test).

Supplementary figure 2. Memory reactivation induces the destabilization-reconsolidation process.

A, Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to memory a 3 min reactivation session 3 days after

training. Nimodipine or its vehicle was infused 30-min before reactivation. Cycloheximide or its vehicle was infused immediately after reactivation. A test session was conducted 2 days later (Veh/Veh, n = 11, Nimo/Veh, n = 15; Veh/Chx, n = 13; Nimo/Chx, n = 11). **B**, Freezing levels during reactivation sessions. **C**, Freezing levels during test. **D**, Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to a 9 min reactivation sessions or a 30 min extinction session 3 days after training and cycloheximide or its vehicle was infused immediately after (n = 7 per group). A test session was conducted 2 days later. **E**, Freezing levels during reactivation sessions. **F**, Freezing levels during test. **G**, Freezing levels during extinction session. **H**, Freezing levels during test. Data expressed as mean+SEM of percent of freezing time during reactivations or test sessions. (a) Significantly different from respective control group ($P < 0.05$, ANOVA or Student's t test).

Supplementary figure 3. Remote memory does not reconsolidate

A, Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to memory reactivation sessions 30 days after training. Cycloheximide (n = 6) or its vehicle (n = 7) was infused immediately after reactivation. A test session was conducted 2 days later. **B**, Freezing levels during reactivation sessions. **C**, Freezing levels during test. **D**, Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to memory reactivation sessions on days 30, 32 and 34 after training.

Reactivations took place in the conditioned context without any food (control group; n = 8) or in the presence of appetitive stimulus (n = 7). On day 37, rats were tested. **E**, Freezing levels during reactivation sessions. **F**, Freezing levels during test. Data expressed as mean+SEM of percent of freezing time during reactivations or test sessions. (a) Significantly different from respective control group (P<0.05, ANOVA or Student's t test).

Supplementary figure 4. Dorsal hippocampus cannula placement.

Top panel: The picture represents a typical brain section showing cannula aimed at dorsal hippocampus. Bottom panel: schematic representation of cannulae placement (based on Paxinos and Watson atlas). This figure represents the animals in Fig. 6.D-E experiment.

Supplementary table 1. Food consumption and glucose blood levels.

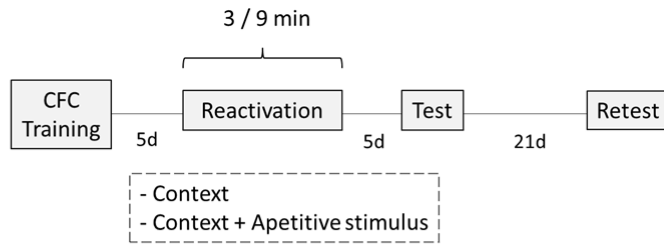
A.

	1st Reactivation	2nd Reactivation	3rd Reactivation
Chocolate	0.93 ± 0.27 g	1.3 ± 0.42 g	1.4 ± 0.47 g
Cereal	0.12 ± 0.06 g	0.54 ± 0.11 g	0.54 ± 0.19 g
Sugar	<0.01 g	0.18 ± 0.08 g	0.27 ± 0.13 g

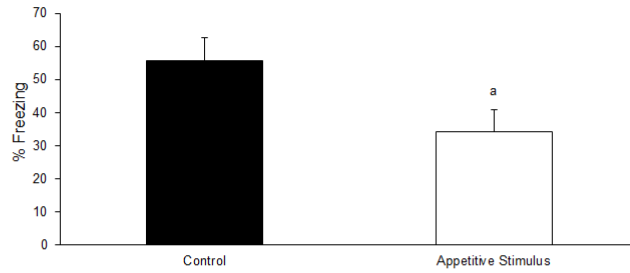
B.

	Basal (mg/dL)	30 min (mg/dL)
Chocolate (2g)	81.33 ± 5.61	76.67 ± 4.40
Glucose (100mg/kg)	76.11 ± 5.97	89.56 ± 10.52
Glucose (500mg/kg)	80.89 ± 5.30	88.67 ± 4.18 *

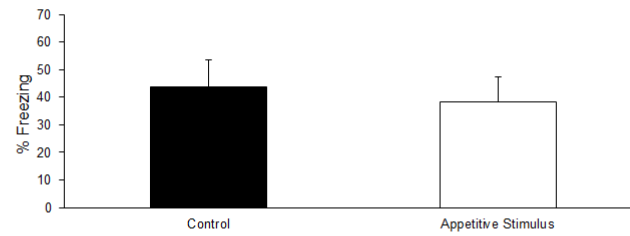
A, Consumption of appetitive stimuli across reactivation sessions (n = 6 per group). **B**, Blood glucose levels before and 30min after appetitive stimulus consumption (2g of chocolate), i.p. 100mg/kg glucose or i.p. 500mg/kg glucose administration (N = 9 per group). Data expressed as mean+SEM. * Only the 500mg/kg glucose administration was able to significantly increase glycemia level (Paired-samples *t* test: $t_{(8)}=-5.01$, $P=0.001$)



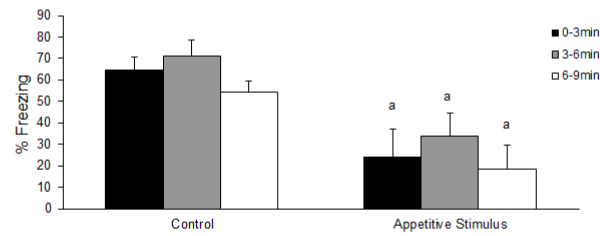
S1.A



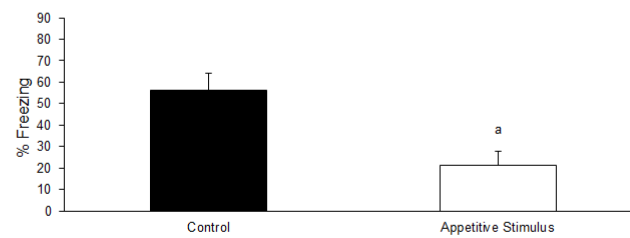
S1.B



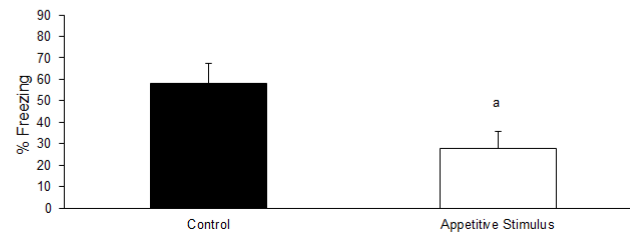
S1.C



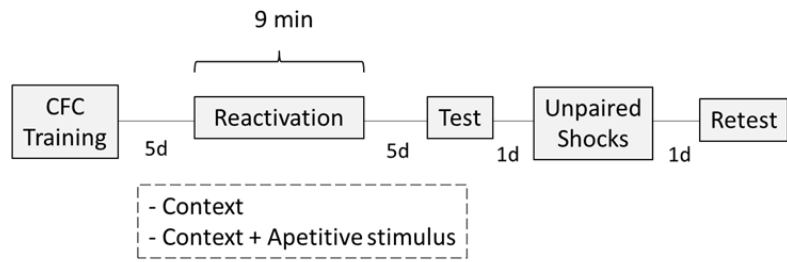
S1.D



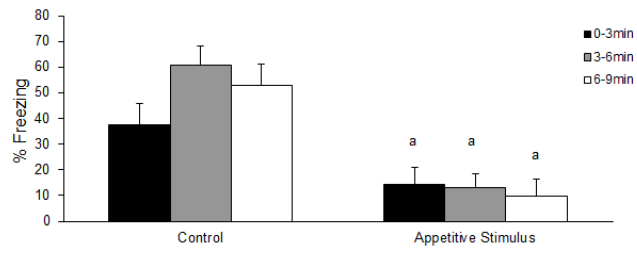
S1.E



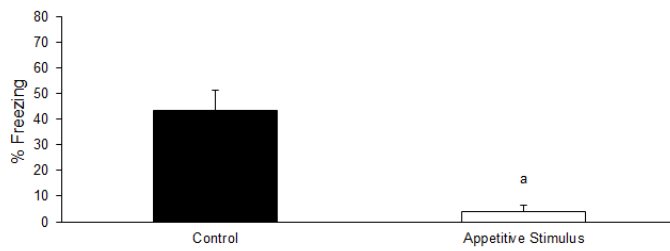
S1.F



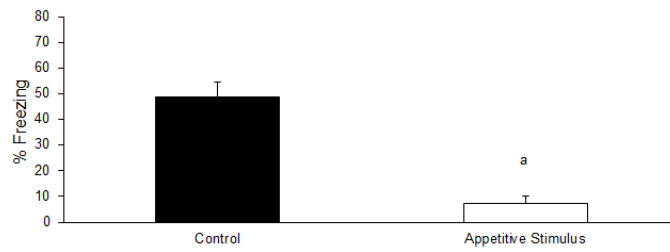
S1.G



S1.H

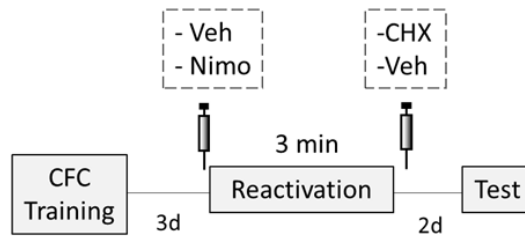


S1.I

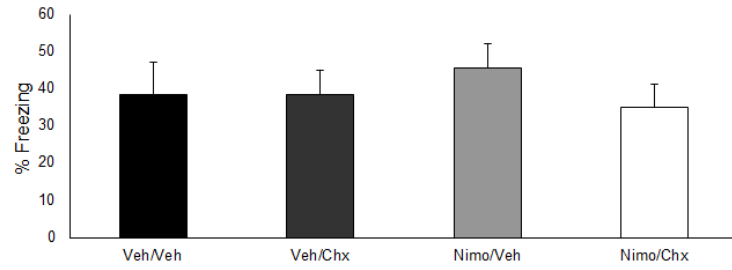


S1.J

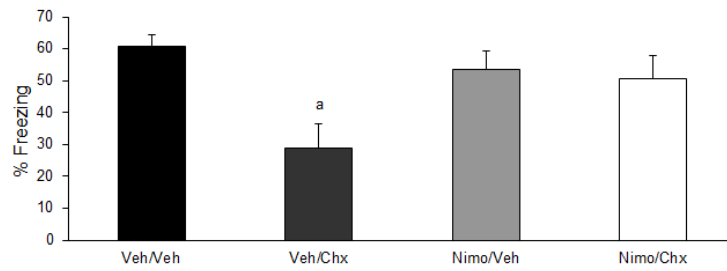
S2.A



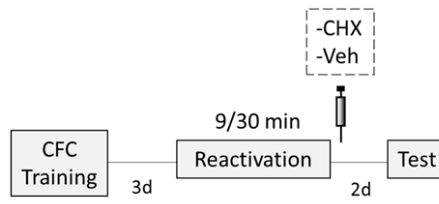
S2.B



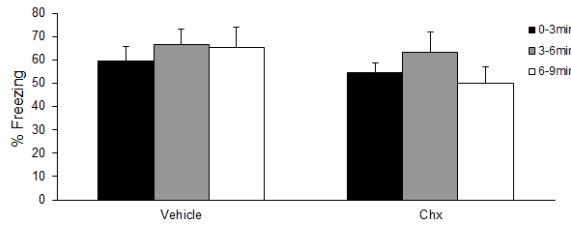
S2.C



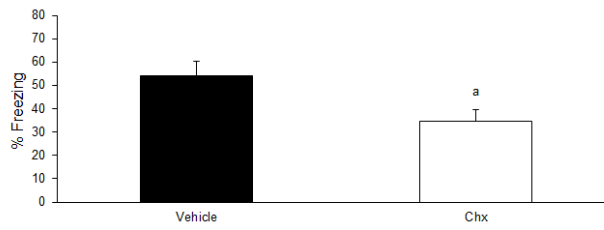
S2.D



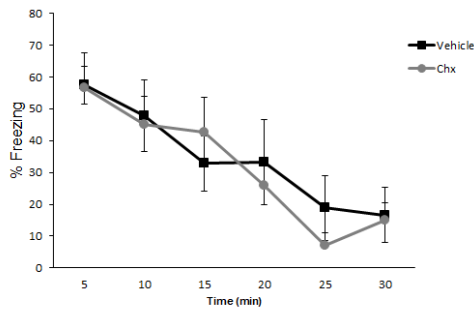
S2.E



S2.F



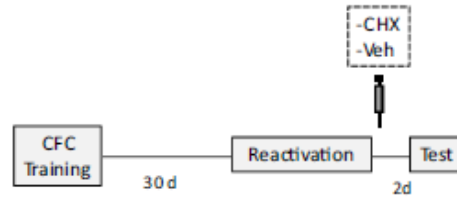
S2.G



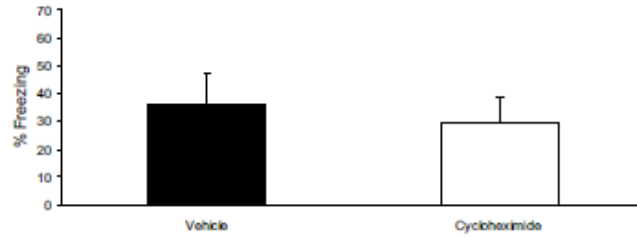
S2.H



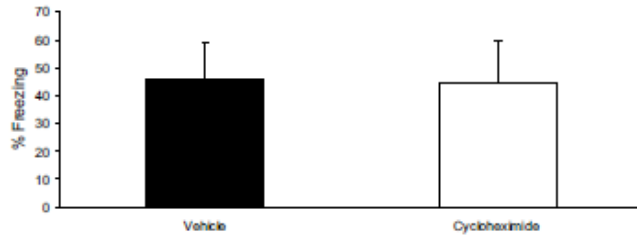
S3.A



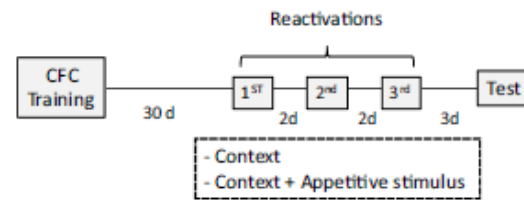
S3.B



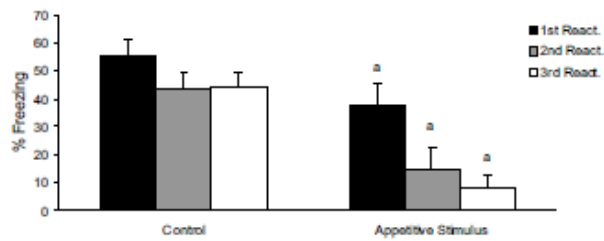
S3.C



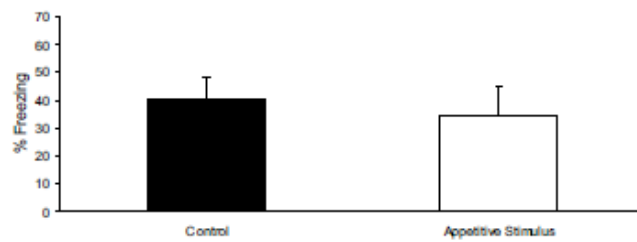
S3.D

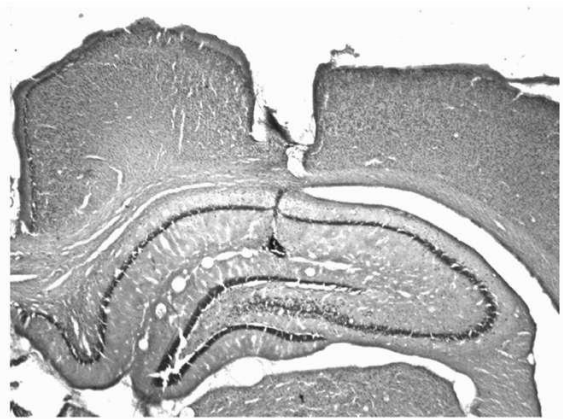
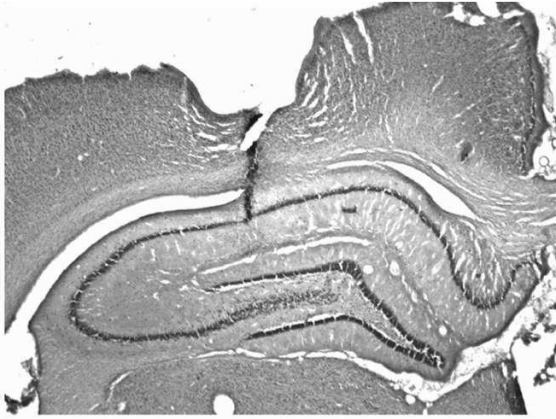


S3.E

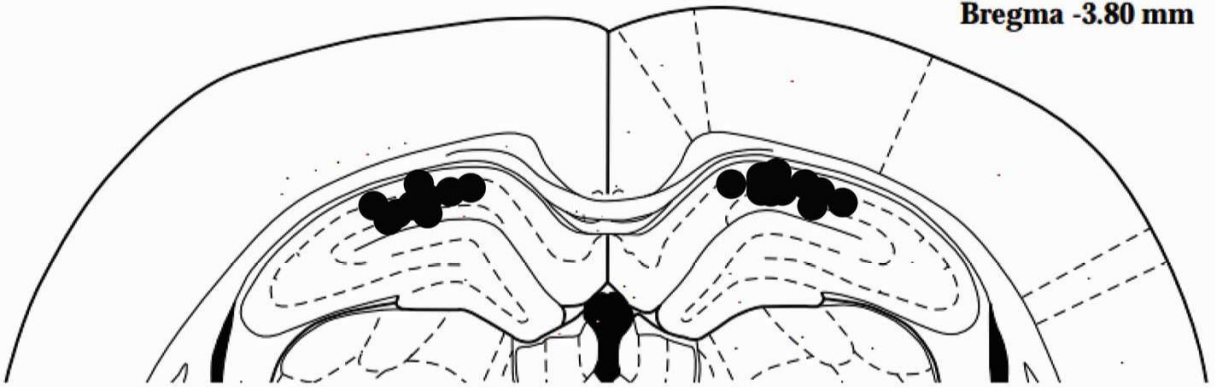


S3.F





Bregma -3.80 mm



Bregma -3.60 mm



4. CAPÍTULO II

Artigo científico intitulado “Enhancement of extinction memory by pharmacological and behavioral interventions targeted to its reactivation” publicado em 2017 na revista *Scientific Reports*, 7:10960.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Enhancement of extinction memory by pharmacological and behavioral interventions targeted to its reactivation

Josué Haubrich , Adriano Machado, Flávia Zacouteguy Boos, Ana P. Crestani, Rodrigo O. Sierra, Lucas de Oliveira Alvares  & Jorge A. Quillfeldt

Extinction is a process that involves new learning that inhibits the expression of previously acquired memories. Although temporarily effective, extinction does not erase an original fear association. Since the extinction trace tends to fade over time, the original memory can resurge. On the other hand, strengthening effects have been described in several reconsolidation studies using different behavioral and pharmacological manipulations. In order to know whether an extinction memory can be strengthened by reactivation-based interventions in the contextual fear conditioning task, we began by replicating the classic phenomenon of spontaneous recovery to show that brief reexposure sessions can prevent the decay of the extinction trace over time in a long-lasting way. This fear attenuation was shown to depend both on L-type calcium channels and protein synthesis, which suggests a reconsolidation process behind the reactivation-induced strengthening effect. The extinction trace was also susceptible to enhancement by a post-reactivation infusion of a memory-enhancing drug (NaB), which was also able to prevent rapid fear reacquisition (savings). These findings point to new reactivation-based approaches able to strengthen an extinction memory to promote its persistence. The constructive interactions between extinction and reconsolidation may represent a promising novel approach in the realm of fear-related disorder treatments.

Memory retrieval is a dynamic phenomenon that can, given the right conditions, trigger two distinct processes, reconsolidation or extinction. Following a brief retrieval session in the same training context, a previously consolidated memory may enter a labile state that requires *de novo* protein synthesis in order to re-stabilize and persist, a process called reconsolidation¹. However, prolonged, non-reinforced retrieval sessions can induce extinction². Although the reconsolidation of fear memories have been extensively studied^{3,4}, very few studies have so far investigated the possibility that an extinction trace would undergo reconsolidation following retrieval⁵⁻⁷, and its possible outcomes and clinical applications are currently unexplored⁸.

Extinction decreases conditioned responses through a process that entails the consolidation of a new inhibitory memory; it is thought not to be unlearning or erasure of the original trace^{9,10}. Extinction-based therapies are commonly employed to hinder aversive responses in patients with fear-related disorders such as posttraumatic stress disorder^{11,12}. Despite being an effective intervention, the relapse of fear symptoms is often reported¹³ showing that, compared to robust fear memories, extinction is less enduring and prone to decay. Fear responses can easily recover due to several relapse processes, such as spontaneous recovery, reinstatement, renewal, and rapid reacquisition^{14,15}. Accordingly, it is of great importance to find better approaches to enhance extinction strength and persistence.

Despite both reconsolidation and extinction being triggered by retrieval, they are distinct processes. Behaviorally, reconsolidation is usually engaged by brief re-exposures to the conditioned stimulus (CS) whereas extinction requires longer ones. In addition, the induction of reconsolidation is modulated by other contextual and cognitive factors collectively known as boundary conditions¹⁶. By varying the duration of exposure to the CS, an amnesic agent will selectively impair either the reconsolidation of the original trace, or the consolidation

Psychobiology and Neurocomputation lab and Neurobiology of Memory lab. Neurosciences Graduate Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.H. (email: biohaubrich@gmail.com) or J.A.Q. (email: quillfe@ufrgs.br)

of the extinction trace^{17–23}. The fact that both processes do not take place simultaneously suggests a trace dominance effect, in that the dominant trace will be the first, if not the only one, affected by any interference. Trace dominance also occurs when previously consolidated fear and extinction traces coexist, affecting their retrieval. In such conditions, re-exposure to the CS, which can potentially activate both fear and extinction traces, will result in the expression of the dominant memory and in the inhibition of the other one². As discussed above, initially, extinction is dominant and easily suppresses fear. However, with time the original fear trace overcomes the inhibition by extinction and becomes dominantly expressed again¹⁴. In addition, there is a double dissociation between the two processes regarding molecular markers such as Zif268²⁴, calcineurin^{19,25} and BDNF²⁶, indicating that both processes do not occur in parallel.

It is often suggested that the functional role of the destabilization-restabilization process behind reconsolidation is to allow memory to update in order to retain its predictive and adaptive relevance^{3,27–29}. For instance, memory content can be updated through the incorporation of novel information^{30–34}. In addition, several studies reported that reconsolidation may mediate memory enhancement and strengthening^{30,35–39} as well memory attenuation (without extinction) of aversive experiences^{34,40}. Interestingly, there are studies showing that in some tasks reconsolidation only happens when memory is not yet at an asymptotic level^{41–43}, further highlighting its role in the strengthening of the memory trace. However, so far it is unknown whether a consolidated extinction trace can be modified by reconsolidation.

Reconsolidation can open a window to allow the pharmacological modulation the reactivated memory. This would parallel classic experiments in which the post-reactivation infusion of amnesic agents impair memory¹, or at least effectively diminish fear responses in phobias⁴⁴. Also, post-reactivation interventions that promote reconsolidation can lead to enhanced performance^{45–47}. Hence, specific compounds administered during the window of memory lability during reconsolidation allows for positive or negative modulation of memory strength.

Given its clinical relevance, there is considerable interest in the development of more efficient extinction-based approaches⁴⁸. Extinction memories are effective in transiently suppressing fear responses but the fear returns easily². Stemming from the fact that the retrieval-driven process of reconsolidation can lead to memory strengthening, either behaviorally^{30,35–39}, or pharmacologically^{45–47}, we hypothesize that if an extinction memory is reactivated, it may undergo a reconsolidation process and be positively modulated by behavioral and pharmacological interventions, resulting in an increased resistance to relapse.

To verify this, we evaluated the effect of brief re-exposures to the conditioned context in animals that were previously trained in contextual fear conditioning (CFC) and submitted to extinction. We found that spontaneous recovery was observed 2 weeks after extinction, but periodical reactivation sessions were able to delay fear trace resurgence for at least 4 weeks. This effect was shown to depend upon L-type voltage-gated calcium channels (L-VGCC), and a reactivation one day after the extinction session was shown to cause the extinction trace to transiently become labile in a protein-synthesis dependent manner. All taken together, the data strongly suggests a reconsolidation process acting upon the extinction trace. Also, in a protocol employed to investigate fear rapid reacquisition - another post-extinction relapse process⁴⁹ - a single post-reactivation infusion of sodium butyrate (NaB), a HDAC inhibitor that positively regulates neuronal plasticity⁵⁰, was able to enhance the extinction memory to the point of resisting fear recovery. The evidence shows that the extinction trace can be effectively strengthened by reactivation-based interventions.

Results

Experiment 1: Extinction memory only transiently inhibits fear expression. Extinction is new learning that temporarily suppresses a previously acquired memory. Thus, following extinction, two opposing memories co-exist and compete for expression. Initially, the extinction memory is dominant over the fear trace and thus able to inhibit its expression. However, this suppression is not permanent. As time elapses, fear memory overcomes extinction inhibition and aversive behavioral responses return. This process is called spontaneous recovery¹⁵. First, we assessed the temporal profile of spontaneous recovery in our CFC protocol. Accordingly, animals were fear conditioned and 24 hours later underwent extinction training. The next day, a test session was conducted to evaluate extinction retention. A second test was conducted 7, 14, 21 or 28 days later to assess spontaneous recovery (Fig. 1A).

During the extinction session, freezing levels decayed over time in all groups, indicating extinction acquisition (Repeated-measures ANOVA, $F_{(5,140)} = 13.625$, $P = 0.001$; Fig. 1B). At test 1, animals exhibited low freezing levels, indicating extinction retention (Fig. 1C). To assess spontaneous recovery, performance at test 1 and test 2 were compared with a repeated measures ANOVA, which revealed a significant group x session interaction (Repeated-measures ANOVA, $F_{(3,27)} = 8.085$, $P = 0.0005$). Tukey's *post-hoc* showed that there was significant recovery of fear responses only in groups where test 2 was conducted either 21 ($P = 0.013$) or 28 days ($P = 0.0002$) after test 1, but not earlier (7 days: $P = 0.999$; 14 days: $P = 0.969$; Fig. 1C).

The results illustrate the well described¹⁵ time-dependent spontaneous recovery of fear memory following extinction. In our protocol, extinction memory suppresses fear responses for at least 14 days. After 14 days, spontaneous recovery of fear can take place. Hence, although initially dominant, extinction memory decays with the passage of time allowing for the resurgence of fear expression.

Experiment 2: Periodical reactivations of extinction trace delays its time-dependent decay (spontaneous recovery). In experiment 1 we found that initially extinction memory is dominant over the aversive memory trace, preventing its expression. This effect fades at later time-points when extinction is no longer able to suppress fear expression. It has been reported that reactivation sessions can lead to memory strengthening^{30,36,39}. Since the extinction trace decays over time, we predicted that its reactivation would possibly result in its strengthening, thus enhancing its persistence and ability to suppress fear at remote time-points.

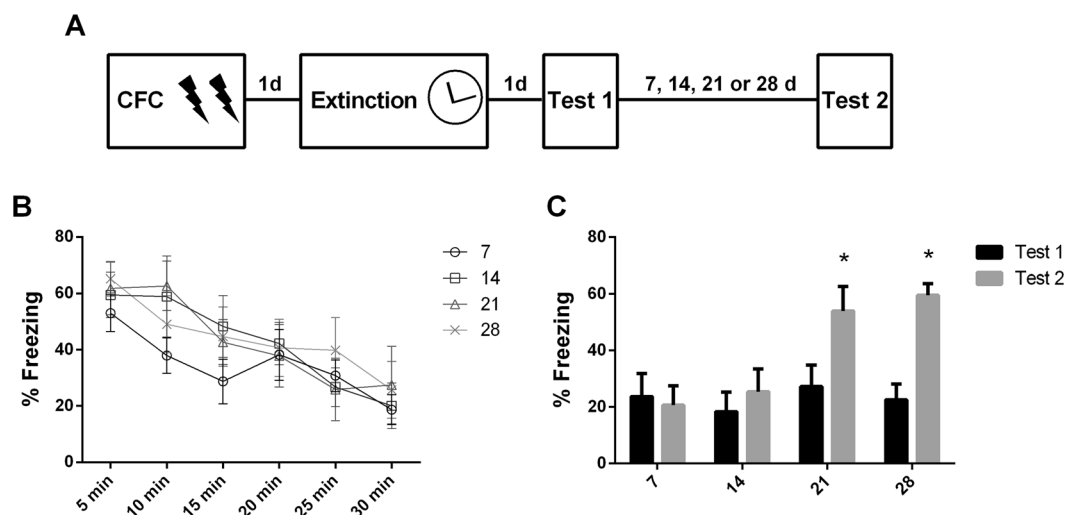


Figure 1. Extinction memory fails to suppress fear permanently. (A) Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to 30-min extinction session and were tested 24 hours later. A second test was conducted 7, 14, 21 or 28 days after test 1 ($N = 6/9$ per group). (B) Freezing levels during extinction sessions. (C) Freezing levels during tests. (*) Significant difference between tests 1 and 2 ($P < 0.05$, Repeated-Measures ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).

Accordingly, fear-conditioned rats underwent extinction training, were tested 1 day later and retested 28 days later for spontaneous recovery. In the interval between test and retest, a group of animals underwent 3-min reactivation sessions on days 7, 14 and 21 days after test 1 (Reactivation group) or remained in their homecages (Control group; Fig. 2A). An additional group was submitted to reactivation sessions but no extinction training (No extinction + reactivation group). The 7 day interval between reactivations was chosen because at this time-point, extinction is still robustly expressed (Experiment 1).

During extinction training, animals effectively displayed a time-dependent decrease of fear responses ($F_{(5,110)} = 30.516$, $P = 0.001$; Fig. 2B). On test 1, there was significant difference between groups ($F_{(2,28)} = 8.11$, $P = 0.002$; Fig. 2C). Tukey's *post-hoc* showed that Control and Reactivation groups displayed similar freezing levels ($P = 0.915$) and both showed lower freezing than the No extinction + reactivation group ($P = 0.007$ and $P = 0.001$, respectively). During reactivation sessions, Repeated-measures ANOVA showed a significant difference between Reactivation and No Extinction + reactivation groups ($F_{(1,19)} = 46.63$, $P = 0.0001$) and no effect of session ($F_{(2,38)} = 2.28$, $P = 0.116$) nor group x session interaction ($F_{(2,38)} = 1.00$, $P = 0.376$; Fig. 2D). Comparison between test 1 and test 2 revealed significant group x session interaction (Repeated-measures ANOVA, $F_{(2,28)} = 3.89$, $P = 0.03$). Tukey's *post-hoc* showed that fear in the Reactivation group and in the No extinction + reactivation group did not change from test 1 to test 2 ($P = 0.844$), but there was significant fear recovery in the control group ($P = 0.02$). Importantly, freezing of Reactivation group was lower than all others on test 2 (Reactivation x Control: $P = 0.007$; Reactivation x No extinction + reactivation: $P = 0.0001$; Fig. 2E). This shows that reactivation strengthened extinction memory and thus prevented fear recovery at a remote time-point. Notably, in this protocol, reactivation sessions per se had no effect on fear levels when no extinction learning took place.

Experiment 3 - Reactivation-induced strengthening of extinction depends on L-VGCCs. In order to induce reconsolidation, memory must be reactivated and enter into a labile state. Previous works have shown that the activation of L-type voltage-gated calcium channels (L-VGCC) during reactivation is required for destabilization, and their blockade by nimodipine prevents reconsolidation from taking place⁵¹. To assess the role of L-VGCC in the reactivation-induced strengthening of extinction, we repeated the experimental design of the last experiment and administered nimodipine before reactivation (Fig. 3A).

During extinction training, animals displayed a time-dependent decrease of fear responses ($F_{(5,125)} = 13.55$, $P = 0.001$; Fig. 3B). On test 1, animals from the Vehicle and Nimodipine groups exhibited equally low freezing levels (Student's *t* test; $t_{(25)} = 0.510$, $P = 0.615$; Fig. 3C). During reactivation sessions, there was a significant group x session interaction ($F_{(2,50)} = 7.863$, $P = 0.001$; Fig. 3D) with nimodipine-treated animals exhibiting increased fear across sessions ($P = 0.004$), whereas there was no change in fear expression in vehicle-treated rats ($P = 0.983$).

At the second test, nimodipine-treated rats displayed higher freezing levels than controls ($t_{(25)} = 5.44$, $P = 0.0001$; Fig. 3E). Comparing the performance of both test sessions, a repeated-measures ANOVA found a significant group vs session interaction ($F_{(1,20)} = 7.75$, $P = 0.006$). Tukey's *post-hoc* revealed that the performance of nimodipine-treated animals at test 2 was higher than the performance of all other groups and sessions ($P < 0.001$). This shows that extinction enhancement by reactivations require L-VGCC activation.

Experiment 4: A single extinction trace reactivation opens a protein-synthesis sensitive window. Following reactivation, memory may undergo a phase that requires *de novo* protein synthesis to be reconsolidated and persist. Thus, in this labile state it is susceptible to disruption by protein synthesis inhibitors¹. In previous work, it has been demonstrated that the extinction memory is susceptible to reconsolidation

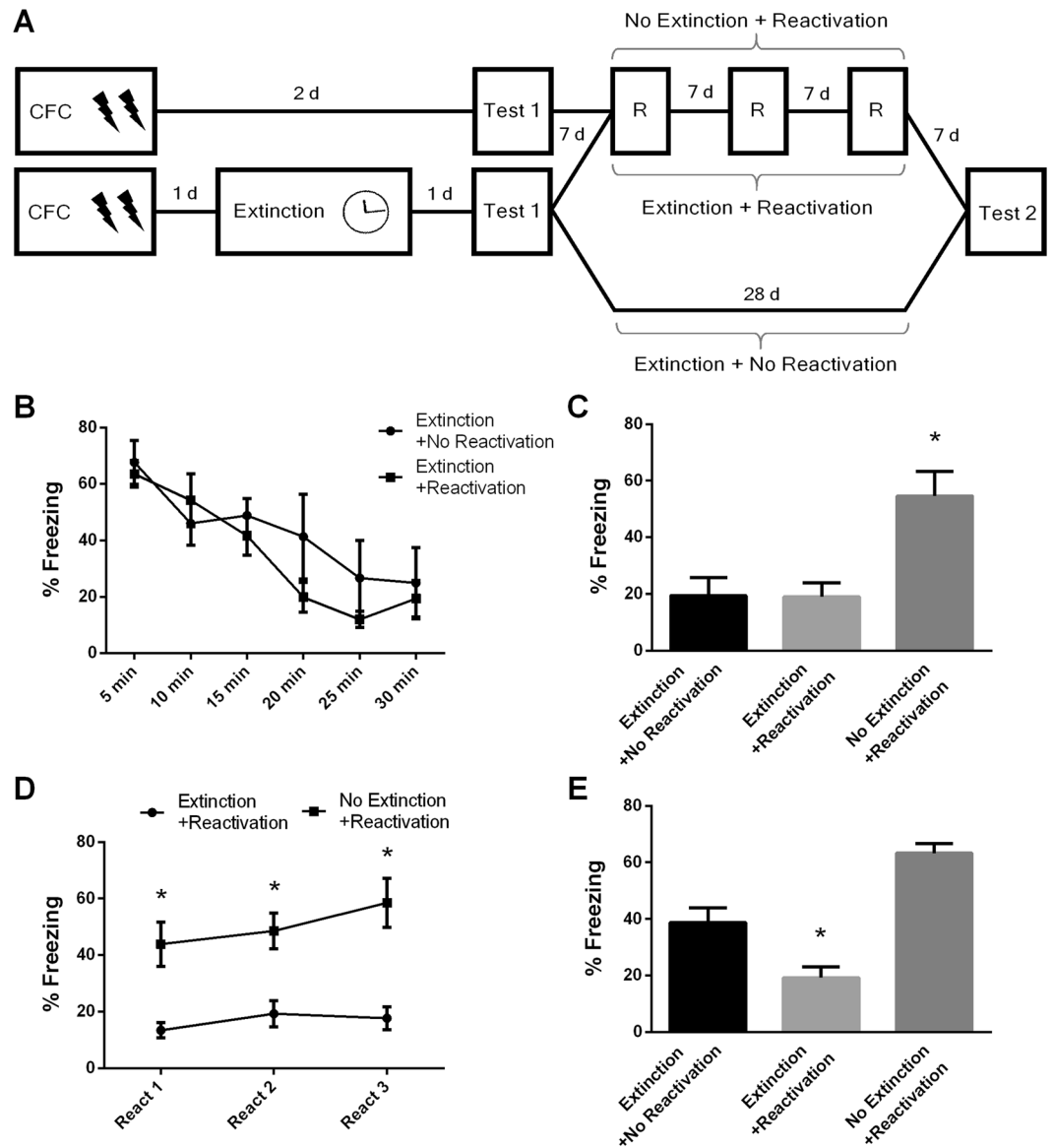


Figure 2. Periodical reactivations prevent spontaneous recovery of extinction memory. **(A)** Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to 30-min extinction session or remained in their homecages (No extinction + Reactivation group; $N = 7$). A test was conducted in the next day and a retest 28 days later. In the interval between tests, animals were reactivated by 3-min on days 7, 14 and 21 after test 1 or remained in their homecages (Extinction + No reactivation group; $N = 10$; Extinction + Reactivation group; $N = 14$). **(B)** Freezing levels during extinction sessions. **(C)** Freezing levels during retest. **(D)** Freezing levels during reactivations. **(E)** Freezing levels during retest. (*) Significant differences between groups ($P < 0.05$, Two-Way or Repeated-Measures ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).

disruption by post-reactivation interference in the inhibitory avoidance paradigm^{5,6}. After employing reexposure sessions in previous experiments, we here evaluated whether these reexposures were actually a reactivation session involving the recruitment of protein synthesis. Accordingly, animals were fear conditioned and the next day a group underwent extinction training (extinction group) while others remained in their homecages (no-extinction group). On day 2 after training, all animals underwent a brief 3 min reactivation session and immediately after were injected with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) or its vehicle. On the following day, animals were tested (Fig. 4A).

During the extinction session, a repeated-measures ANOVA revealed extinction acquisition ($F_{(5,75)} = 24.08$, $P = 0.001$; Fig. 4B). During reactivation, a two-way ANOVA indicated that animals that previously underwent extinction displayed lower freezing levels compared to the no-extinction group ($F_{(1,43)} = 23.32$, $P = 0.001$; Fig. 4C). At the test, a two-way ANOVA revealed a significant group \times drug interaction ($F_{(1,43)} = 22.64$, $P = 0.001$). Tukey's *post-hoc* revealed that cycloheximide-treated animals in the no-extinction group displayed lower freezing levels than vehicle-treated ones ($P = 0.01$), indicating that fear memory was impaired. In the extinction group,

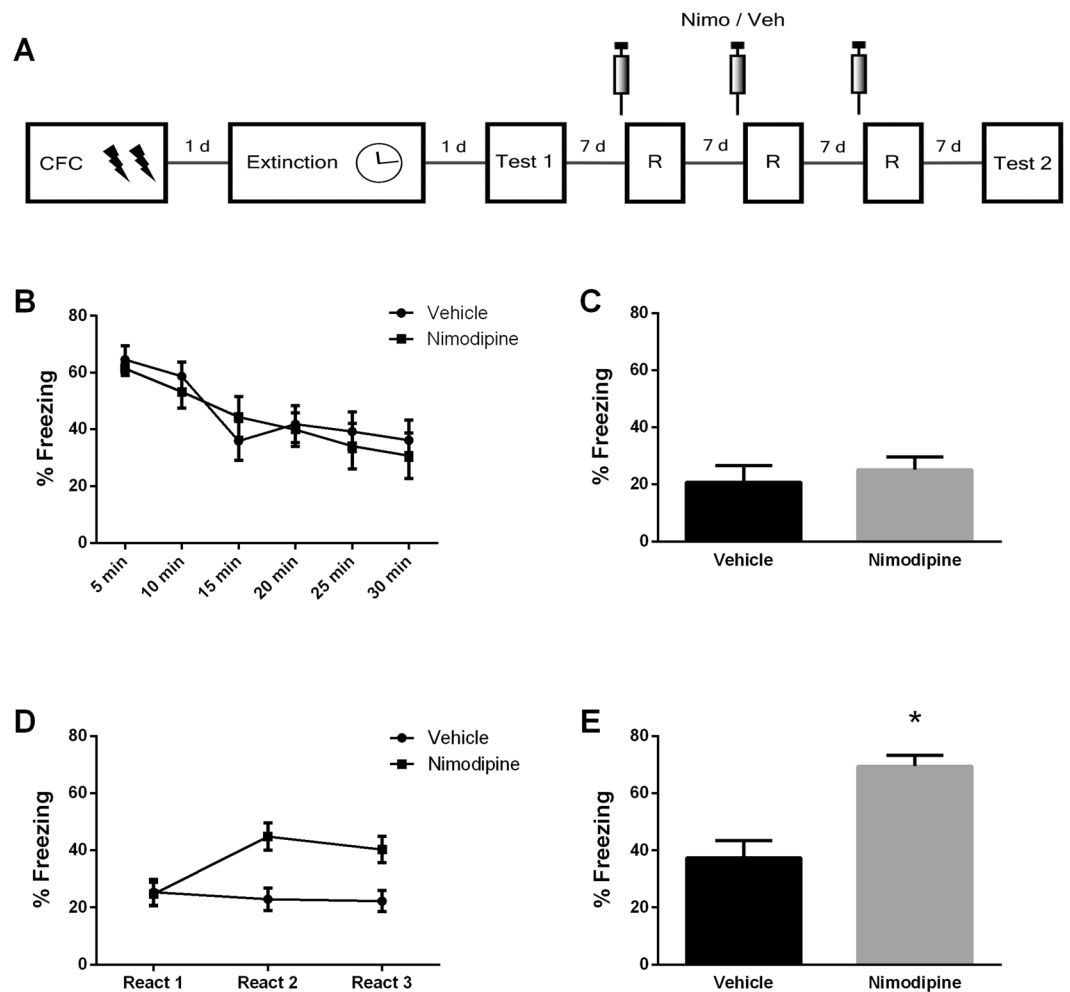


Figure 3. Reactivation-induced strengthening of extinction relies on L-type voltage-gated calcium channels. (A) Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to 30-min extinction session. A test was conducted in the next day and a retest 28 days later. In the interval between tests, animals were reactivated by 3-min on days 7, 14 and 21 after test 1. Nimodipine (N = 15) or its vehicle (N = 12) were s.c. infused 30 min prior each reactivation (B) Freezing levels during extinction session. (C) Freezing levels during test. (D) Freezing levels during reactivations. (E) Freezing levels during retest. (*) Significant differences between groups ($P < 0.05$, Two-Way or Repeated-Measures ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).

CHX-treated animals showed higher freezing levels than vehicle-treated ones ($P = 0.001$), indicating that extinction memory was disrupted.

Accordingly, when no extinction training was conducted, the fear trace is destabilized by reactivation and is disrupted by CHX. When the extinction and fear memories co-exist, a trace dominance effect takes place and the extinction memory is the one that suffers destabilization, requiring *de novo* protein synthesis to persist. This finding shows that the extinction trace was effectively reactivated, suggesting that reconsolidation is the mechanism mediating the extinction memory's strengthening.

Experiment 5 – Another extinction trace relapse process, Rapid Reacquisition, can be pharmacologically detained with a post-reactivation treatment. It has been reported that reconsolidation can be enhanced by post-reactivation administration of compounds such as HDAC inhibitors, resulting in increased performance in a post-reactivation long-term memory test^{45, 52–54}. Here, we asked whether extinction could be positively modulated by post-reactivation treatment with the HDAC inhibitor sodium butyrate (NaB). We thus employed a reconditioning protocol that allows detection of relative changes in the strength of fear and extinction memory according to the ratio of fear reacquisition. For instance, usually following standard extinction procedures, reacquisition is rapid^{32, 34}, but it can be slow in certain circumstances such as extensive extinction learning or weak initial conditioning¹⁴.

Fear conditioned rats underwent extinction training and a reactivation session 24 h later. Immediately after reactivation, NaB or its vehicle was infused (i.p). In the four next days, animals underwent a mixed testing and weak reconditioning procedure to assess fear reacquisition. Each session consisted of a 4 min test followed by a weak footshock and additional 30 s period in the box (Fig. 5A). During extinction training, animals displayed

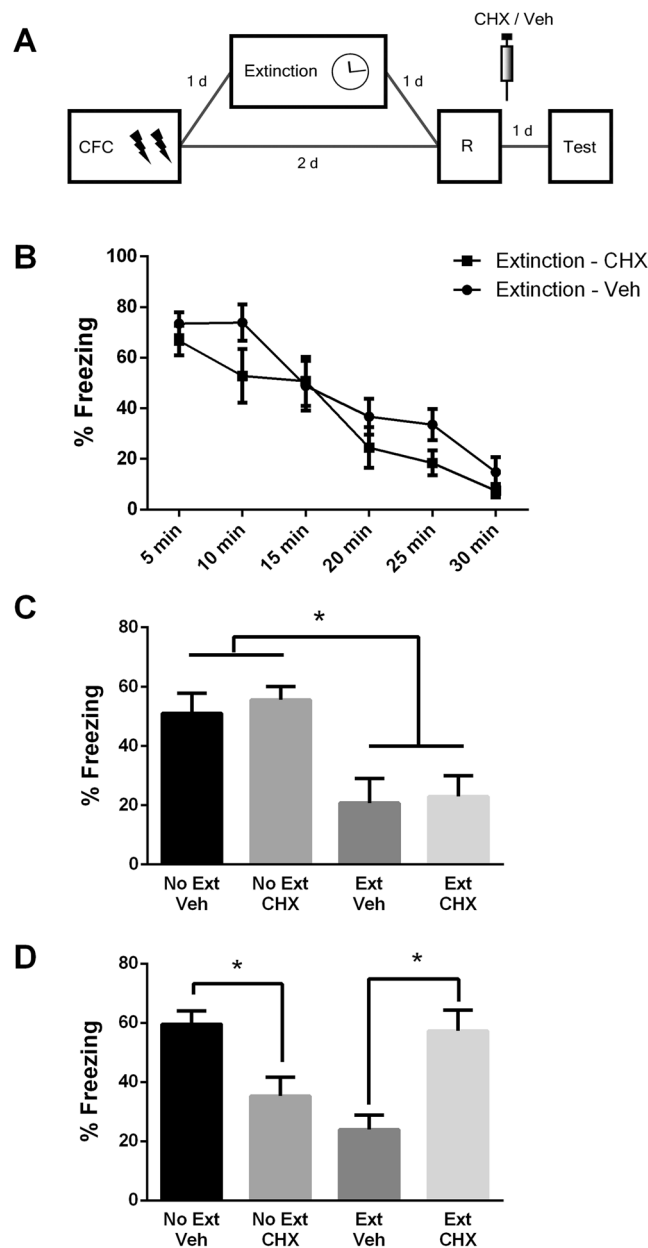


Figure 4. Extinction memory requires *de novo* protein synthesis after its reactivation in order to persist. **(A)** Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to 30-min extinction session or remained in their homecages. A reactivation session was conducted 7 days later followed by a test in the next day. Immediately after reactivation, animals received i.p. infusion of cycloheximide (Extinction group: $N = 10$; No-extinction group: $N = 14$) or its vehicle (Extinction group: $N = 9$; No-extinction group: $N = 11$). **(B)** Freezing levels during extinction session. **(C)** Freezing levels during reactivation session. **(D)** Freezing levels during test session. (*) Significant differences between groups ($P < 0.05$, Repeated-Measures or Two-Way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).

a time-dependent decrease of fear responses ($F_{(5,110)} = 32.89$, $P = 0.001$; Fig. 5B). At reactivation, there was no difference between groups later infused with NaB or Veh ($t_{(22)} = 0.59$, $P = 0.56$; Fig. 5C). During the 4 test sessions (ending with a weak reconditioning whose effect was analyzed in the following test; Fig. 5D), repeated measures ANOVA indicated a significant drug \times session interaction ($F_{(3,66)} = 4.82$, $P = 0.004$). Tukey's *post-hoc* revealed that during the first test, Veh and NaB groups were equal in freezing level ($P = 0.99$). However, after one reconditioning session, Veh-treated promptly showed fear reacquisition ($P = 0.0002$) whereas NaB-treated did not ($P = 0.99$). The NaB-treated group only showed significant reacquisition after three reconditioning sessions, at test 4 ($P = 0.002$).

These results show that post-reactivation NaB treatment rendered the extinction memory resistant to rapid reacquisition. Animals from the vehicle group readily showed savings following a single weak retraining session.

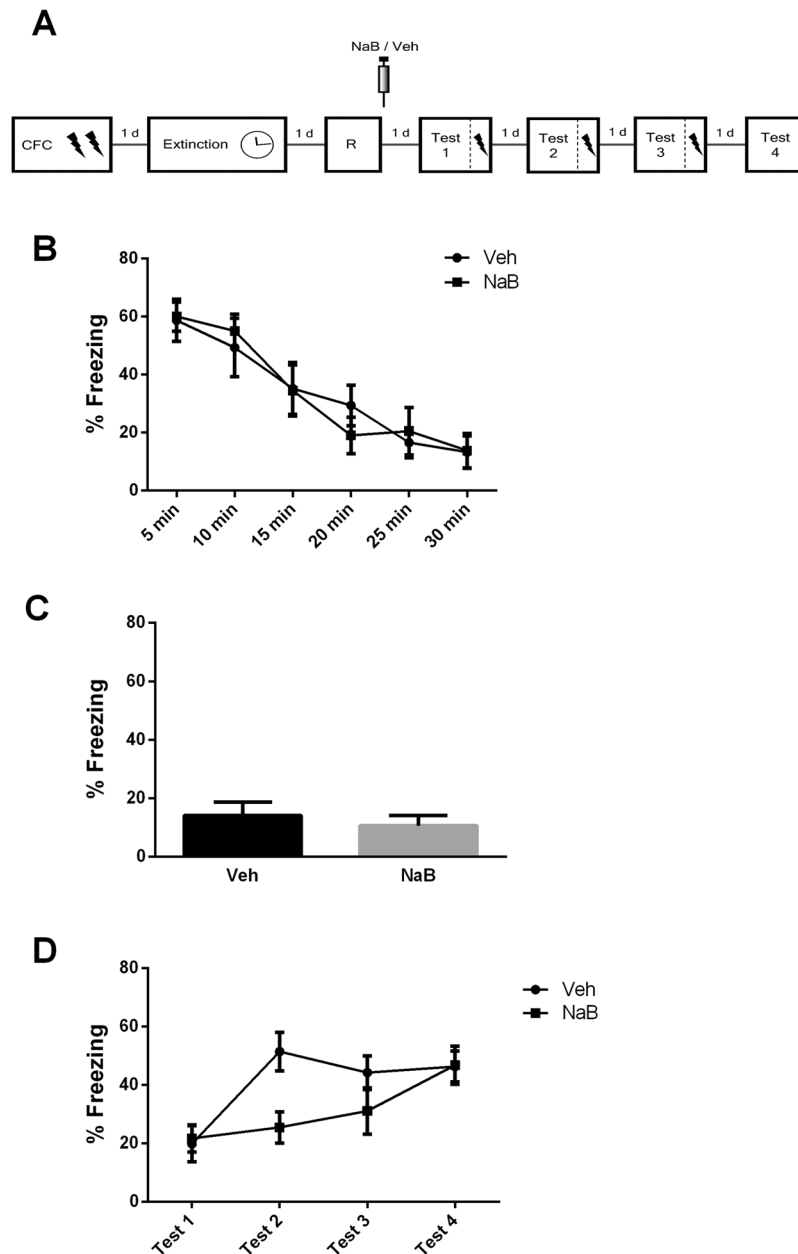


Figure 5. Post-reactivation infusion of NaB, a memory-enhancing drug, also strengthens extinction trace by preventing rapid reacquisition of fear. (A) Schematic representation of the experimental procedures. Fear conditioned rats were submitted to 30-min extinction session. A reactivation was conducted 24 h later followed by the immediate administration of sodium butyrate (NaB; $N = 12$) or its vehicle ($N = 12$). In the next 3 days, animals underwent test sessions ending with the delivery of a weak footshock plus additional 30 s of contextual exploration (rapid reacquisition protocol). One day later, a standard test was conducted. (B) Freezing levels during extinction session. (C) Freezing levels during reactivation. (D) Freezing levels during tests. (*) Significant differences between groups ($P < 0.05$, Independent-samples t test or Repeated-Measures ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test).

NaB-treated animals, on its turn, only showed savings following 3 reconditioning sessions. This demonstrates that the extinction trace can be strengthened by post-reactivation pharmacological interventions.

Discussion

In the present study, we demonstrate that a contextual fear extinction memory can be enhanced by brief reactivation sessions. First, we showed that following extinction learning, spontaneous recovery of fear is observable 21 days after, but not 14 days or earlier (Experiment 1). Next, we found that when extinction memory was periodically reactivated, its time-dependent decay was prevented and no spontaneous recovery of fear was verified for at least 28 days (Experiment 2), an effect also shown to be mediated by L-VGCCs (Experiment 3). In order to

verify if protein synthesis was being recruited by the reexposure sessions, we infused cycloheximide after reactivation and observed the occurrence of a new plasticity window, supporting the idea that reconsolidation is the process taking place (Experiment 4). Finally, employing a different protocol aimed at another relapse mechanism of extinction memory – rapid reacquisition (savings) – we verified that post-reactivation HDAC pharmacological inhibition was also able to enhance the extinction trace, as proven by the observed resistance to rapid reacquisition of fear response.

It is known that the loss of conditioned responses following extinction is not permanent⁵⁵ since extinction does not actually rely on memory erasure. Instead, it promotes new learning which prevents the expression of the previously stored association¹⁴. Hence, extinction and fear memories co-exist and compete for expression. This leads to a trace-dominance effect with extinction inhibiting fear expression. However, extinction easily decays and fear memory overcomes its inhibition through several relapse mechanisms^{15,20}. The most evident of these is the return of fear by the mere passage of time, termed spontaneous recovery¹⁵. In addition, fear memory can become disentangled from extinction inhibition by behavioral phenomena such as rapid reacquisition, reinstatement, and renewal¹⁴. The decay of extinction memory over time is showed in Experiment 1. Initially, extinction suppresses conditioned fear responses. However, at remote time-points this effect vanishes, resulting in spontaneous recovery. Rapid reacquisition is observed in experiment 5. Control rats rapidly display high fear after a single weak reconditioning session. New methods designed to circumvent extinction's poor persistence by enhancing its strength would potentially improve psychiatric treatments of fear-related disorders⁴⁸.

Since extinction memory weakens over time and loses its ability to suppress fear¹⁵, preventing this decay would be beneficial. In Experiment 2, we found that the persistence of an extinction memory can be positively modulated by its simple reactivation. Accordingly, there were no signs of spontaneous recovery when animals underwent brief reactivations, even 4 weeks after extinction training. Interestingly, reactivation did not increase fear responses in animals not submitted to an extinction training as previously reported³⁰, probably due to a ceiling effect. Hence, brief reactivations sessions were able to prevent extinction's time-dependent decay in a long lasting manner.

It is often suggested that reconsolidation takes place in order to allow memory content to be updated, maintaining its adaptive relevance to better guide future behaviors. Reports of reconsolidation-driven memory updating show that it can occur through the incorporation of new information^{32,34} or by the strengthening of existing associations^{30,35–39}. It is important to point out that even when the strengthening results from additional learning from an identical second learning trial, the destabilization-restabilization process is still required³⁶. Hence, we hypothesized that the reactivation-driven strengthening effect observed in experiment 2 could be mediated by a reconsolidation process, which encompasses a reactivation-dependent destabilization phase followed by a restabilization phase that requires *de novo* protein synthesis. Previous works have shown that the L-VGCC blocker nimodipine prevents memory destabilization, thus preventing reconsolidation⁵¹. In experiment 3, we found that the strengthening effect of reactivation was prevented by the L-VGCC blocker nimodipine, which supports the involvement of reconsolidation in the enhancement of extinction trace. Nimodipine has also been implicated in the impairment of extinction acquisition as well as of consolidation^{56,57}. However, in our experimental protocol, nimodipine was injected several days after the extinction session took place, making its effects distinct from those obtained around the initial extinction learning. Thus, regardless which process is actually being blocked – reconsolidation or extinction – experiment 3 shows that reactivation-induced strengthening of extinction requires the activation of L-VGCC to take place.

Reconsolidation is a process in which a previously established memory is reactivated and becomes labile, requiring *de novo* protein synthesis to persist. To further address the question of whether a reactivation session induces the reconsolidation of the extinction trace, we investigated the effect of post-reactivation protein synthesis inhibition in animals that did or did not previously undergo extinction training (Experiment 4). In animals that did not undergo extinction, post-reactivation protein synthesis inhibition disrupted reconsolidation of the contextual fear memory, resulting in low freezing levels. The opposite behavioral outcome took place in the group that underwent extinction: in the test, CHX-treated animals exhibited high freezing levels, indicating that the extinction memory was disrupted. In this experiment, since extinction was disrupted by protein synthesis inhibition after a single reexposure (as confirmed in a test the following day), no extra reexposure sessions were investigated. The results of this experiment suggest that the extinction trace was hindered to a point that it was no longer able to suppress fear. In accordance with previous work^{5,7}, it indicates that reactivation did not merely promote “additional extinction learning”, but prompted the extinction trace to enter a labile state that required reconsolidation in order to persist. One must notice that either the extinction memory or the fear memory was being expressed at the time of reactivation. Accordingly, the trace that is dominantly activated by the reactivation was the one destabilized and thus impaired by the protein synthesis inhibition.

Finally, we assessed if the extinction trace could be positively modulated by post-reactivation treatment with a memory-enhancing drug. Several pharmacological agents have been shown to enhance memory consolidation and reconsolidation, including HDAC inhibitors such as sodium butyrate^{45,52,53}. In experiment 5, we found that post-reactivation NaB treatment enhanced the extinction trace, allowing it to resist relapse by a rapid reacquisition protocol. Animals treated with NaB displayed remarkable resistance to savings after a rapid reacquisition procedure. Vehicle-treated animals showed savings after a single weak reconditioning session, whereas NaB-treated rats required 3 reconditioning sessions to show the same recovery effect. This shows that even a brief reactivation session renders an extinction trace amenable to enhancement by positive interference. Extinction enhancement by post-reactivation HDAC inhibition, as reported here, suggests that the same beneficial effect could be achieved with other memory-enhancing drugs in order to inhibit fear expression over time.

The possibility that the reactivation-dependent strengthening of extinction could have been mediated by additional extinction instead of reconsolidation must be considered. It has been reported that even short re-exposures to a context can lead to extinction when conducted at remote time-points³⁵. Although the experimental protocol

of that paper differs from ours in a significant number of aspects, we have included an additional experimental group to control this specific concern: in experiment 2, the “No-extinction + reactivation” group underwent the same three reactivation sessions but was not submitted to an extinction session. This group showed no fear attenuation, neither during reactivations nor the test, different from what would be expected in extinction. Additional evidence comes from experiment 4. If a brief re-exposure induced additional extinction, then the cycloheximide treatment would have disrupted only the incremental learning of that session, leaving spared what was previously stored. However, post-reactivation cycloheximide has disrupted the extinction trace, abolishing the inhibition of fear in a test conducted 24 h later. The disruption of a previously stored trace by post-reactivation protein synthesis inhibition is consistent with the reconsolidation interpretation. Thus, considering the convergence of all behavioral and pharmacological evidence obtained with the present experimental design, our results indicate that what took place during the reactivations sessions was a reconsolidation process that mediated the strengthening of extinction memory.

Fear recovery after extinction-based approaches is critical to understand in order to improve behavioral and pharmacological treatments of anxiety disorders. In fact, extinction enhancement could be considered a hallmark of psychiatric research. Here, we found that brief reactivation sessions were effective in preventing spontaneous recovery of an extinct fear memory. This effect was mediated by L-VGCCs and involves protein synthesis, strongly suggesting reconsolidation is the mechanism behind this strengthening. We also found that positive post-reactivation pharmacological modulation was able to prevent fear rapid reacquisition. Together, these findings show that extinction can benefit from reactivation-based interventions aimed to enhance its strength and persistence. It also adds to the notion that reconsolidation and extinction are not completely separate processes as current paradigms often suggest⁵⁸. Due to the prominence of extinction-based cognitive behavioral therapies, these findings bring relevant insights to both basic and clinical research.

Methods

Subjects. Male Wistar rats from our breeding colony weighing 300–350 g, aged 60–70 days, were used. Animals were housed in plastic cages, four to five per cage, with water and food available *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with national animal care legislation and guidelines (Brazilian Law 11794/2008) and approved by the University’s Ethics Committee.

Contextual Fear Conditioning. The CFC chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25.0 × 25.0-cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). In the conditioning session, rats were placed in the chamber for 3-min, and then received two 2-secs 0,7 mA footshocks separated by a 30-sec interval. Animals were kept in the conditioning environment for additional 30 sec before returning to their homecages.

Memory extinction, reactivation, and test sessions. Brief or long context re-exposures were used to induce memory reactivation or extinction learning, respectively. Extinction training consisted of 30-min re-exposure to the conditioned context and always occurred 24 hours after CFC. Memory reactivation sessions consisted of 3-min re-exposure to the conditioned context. On Experiments 2 and 3, reactivations were conducted on days 7, 14 and 21 after test 1. On experiments 4 and 5 they were conducted 24 hours after extinction training.

Test sessions consisted of 4-min re-exposure to the context. On experiments 1, 2, and 3, the first test was conducted 24 hours after the extinction training and a second test was conducted 7, 14, 21 or 28 days later, in order to assess fear spontaneous recovery. On experiments 4 and 5, the test session was conducted 24 hours after reactivation in order to assess the effect of post-reactivation pharmacological manipulations.

To address rapid reacquisition (or “savings”; Experiment 5), animals underwent a 4-min test followed by a weak footshock (one 2-secs 0.4 mA). After an additional 30 seconds, they returned to their homecages. This procedure was repeated daily three times, followed by an additional test one day later. In this procedure, freezing was always scored before the footshock (that consisted of a standard test session). This allowed us to both measure performance and submit animals to a weak reconditioning session.

Drugs. Protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX; Sigma) was dissolved in sterile isotonic saline with 1% dimethylsulfoxide to a concentration of 2.2 mg/mL. Cycloheximide or its vehicle was injected intra-peritoneally (i.p.) immediately after the reactivation. The total volume injected was 1 mL/kg.

The L-type voltage-gated calcium channels (LVGCCs) antagonist nimodipine (Sigma) was dissolved in sterile isotonic saline with 8% dimethylsulfoxide to a concentration of 16 mg/mL. Nimodipine or its vehicle was injected subcutaneously 30 min before the reactivation sessions. The total volume injected was 1 mL/kg.

Sodium butyrate (NaB; Sigma), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, was dissolved in sterile isotonic saline to a concentration of 0.6 g/mL. The total volume injected was 1 mL/kg i.p., immediately after reactivation.

Drug concentrations used were chosen from previous work (CHX from³⁴, Nimodipine from³⁴, NaB from⁵⁴).

Data Analysis. Memory was measured by quantifying freezing behavior and expressed as a percentage of the total session time. Freezing was scored by an observer blind to the experimental conditions. Homoscedasticity and normality of the data distribution were confirmed with Levene’s test and Kolmogorov-Smirnov test, respectively. Extinction sessions were analyzed using Repeated-Measures ANOVA. Reactivation sessions were analyzed using Student’s t test, Two-way ANOVA, or Repeated-Measures ANOVA, followed by Tukey’s *post-hoc* test. Test sessions were analyzed using Student’s t test, Two-way ANOVA, or Repeated-Measures ANOVA, followed by Tukey’s *post-hoc* test.

References

- Nader, K., Schafe, G. E. & Le Doux, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**, 722–6 (2000).
- Hartley, C. A. & Phelps, E. A. Changing fear: the neurocircuitry of emotion regulation. *Neuropsychopharmacology* **35**, 136–46 (2010).
- Finnie, P. S. B. & Nader, K. The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 1667–707 (2012).
- Tronson, N. C. & Taylor, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 262–75 (2007).
- Rossato, J. I., Bevilacqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H. & Cammarota, M. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 21801–21805 (2010).
- Radiske, A. *et al.* Requirement for BDNF in the reconsolidation of fear extinction. *J Neurosci* **35**, 6570–6574 (2015).
- Eisenberg, M. & Dudai, Y. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *Eur J Neurosci* **20**, 3397–3403 (2004).
- Rosas-Vidal, L., Rodriguez-Romaguera, J., Do-Monte, F. & Andero, R. Targeting the reconsolidation of extinction memories: a novel potential strategy to treat anxiety disorders. *Mol. Psychiatry* **20**, 1264–1265 (2015).
- Bouton, M. E., Westbrook, R. F., Corcoran, K. A. & Maren, S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol. Psychiatry* **60**, 352–60 (2006).
- Quirk, G. J. & Mueller, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* **33**, 56–72 (2008).
- Furini, C., Myskiw, J. & Izquierdo, I. The learning of fear extinction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **47**, 670–683 (2014).
- Cukor, J., Spitalnick, J., Difede, J., Rizzo, A. & Rothbaum, B. O. Emerging treatments for PTSD. *Clin. Psychol. Rev.* **29**, 715–26 (2009).
- Vervliet, B., Craske, M. G. & Hermans, D. Fear extinction and relapse: state of the art. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **9**, 215–48 (2013).
- Bouton, M. E. Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry* **52**, 976–986 (2002).
- Rescorla, R. A. Spontaneous recovery. *Learn. Mem.* **11**, 501–9 (2004).
- Nader, K. & Hardt, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* **10**, 224–234 (2009).
- Pedreira, M. E. & Maldonado, H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* **38**, 863–869 (2003).
- Bustos, S. G., Maldonado, H. & Molina, V. A. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* **34**, 446–57 (2009).
- Merlo, E., Milton, A. L., Goozee, Z. Y., Theobald, D. E. & Everitt, B. J. Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *J. Neurosci.* **34**, 2422–31 (2014).
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E. & Dudai, Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* **301**, 1102–1104 (2003).
- Suzuki, A. *et al.* Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* **24**, 4787–95 (2004).
- Lee, J. L. C., Milton, A. L. & Everitt, B. J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J. Neurosci.* **26**, 10051–6 (2006).
- Flavell, C. R. & Lee, J. L. Reconsolidation and extinction of an appetitive pavlovian memory. *Neurobiol Learn Mem* **104**, 25–31 (2013).
- Tedesco, V., Roquet, R. F., DeMis, J., Chiamulera, C. & Monfils, M.-H. Extinction, applied after retrieval of auditory fear memory, selectively increases zinc-finger protein 268 and phosphorylated ribosomal protein S6 expression in prefrontal cortex and lateral amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.* **115**, 78–85 (2014).
- de la Fuente, V., Freudenthal, R. & Romano, A. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J. Neurosci.* **31**, 5562–73 (2011).
- Kirtley, A. & Thomas, K. L. The exclusive induction of extinction is gated by BDNF. *Learn. Mem.* **17**, 612–619 (2010).
- Lee, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci.* **32**, 413–20 (2009).
- Besnard, A., Caboche, J. & Laroche, S. Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Prog. Neurobiol.* **99**, 61–80 (2012).
- Nadel, L. & Hardt, O. Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology* **36**, 251–73 (2011).
- De Oliveira Alvares, L. *et al.* Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* **244**, 42–48 (2013).
- Forcato, C., Rodriguez, M. L. C., Pedreira, M. E. & Maldonado, H. Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol. Learn. Mem.* **93**, 77–84 (2010).
- Monfils, M.-H., Cowansage, K. K., Klann, E. & LeDoux, J. E. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science (80-)*. **324**, 951–955 (2009).
- Hupbach, A., Gomez, R., Hardt, O. & Nadel, L. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn. Mem.* **14**, 47–53 (2007).
- Haubrich, J. *et al.* Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology* **40**, 315–326 (2015).
- Inda, M. C., Muravieva, E. V. & Alberini, C. M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J. Neurosci.* **31**, 1635–43 (2011).
- Lee, J. L. C. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci.* **11**, 1264–6 (2008).
- Fukushima, H. *et al.* Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *Elife* **2014**, 1–19 (2014).
- Pedroso, T. R. *et al.* Inhibition of protein synthesis or mTOR in the basolateral amygdala blocks retrieval-induced memory strengthening. *J. Neural Transm.* **120**, 1525–1531 (2013).
- Forcato, C., Rodriguez, M. L. C. & Pedreira, M. E. Repeated labilization-reconsolidation processes strengthen declarative memory in humans. *PLoS One* **6**, e23305 (2011).
- Crestani, A. P. *et al.* Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Sci. Rep.* **5** (2015).
- Garcia-DeLaTorre, P., Rodriguez-Ortiz, C. J., Arreguin-Martinez, J. L., Cruz-Castaneda, P. & Bermudez-Rattoni, F. Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn. Mem.* **16**, 514–519 (2009).
- Lee, J. L. C. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front. Behav. Neurosci.* **4**, 168 (2010).
- Morris, R. G. M. *et al.* Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* **50**, 479–89 (2006).
- Soeter, M. & Kindt, M. An Abrupt Transformation of Phobic Behavior After a Post-Retrieval Amnesic Agent. *Biol Psychiatry*, doi:10.1016/j.biopsych.2015.04.006 (2015).
- Bredy, T. W. & Barad, M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn. Mem.* **15**, 39–45 (2008).
- Stern, S. A. & Alberini, C. M. Mechanisms of memory enhancement. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **5**, 37–53 (2013).

47. Tronson, N. C., Wiseman, S. L., Olausson, P. & Taylor, J. R. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat. Neurosci.* **9**, 167–9 (2006).
48. Fitzgerald, P. J., Seemann, J. R. & Maren, S. Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain Res. Bull.* **105**, 46–60 (2014).
49. Bouton, M. E., Winterbauer, N. E. & Todd, T. P. Relapse processes after the extinction of instrumental learning: renewal, resurgence, and reacquisition. *Behav. Processes* **90**, 130–41 (2012).
50. Gräff, J., Kim, D., Dobbin, M. M. & Tsai, L. Epigenetic Regulation of Gene Expression in Physiological and Pathological Brain Processes. 603–649, doi:10.1152/physrev.00012.2010 (2011).
51. Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P. W. & Kida, S. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn. Mem.* **15**, 426–33 (2008).
52. Federman, N., Fustinana, M. S. & Romano, A. Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory. *Neuroscience* **219**, 145–156 (2012).
53. Villain, H., Florian, C. & Roullet, P. HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. *Sci. Rep.* **6**, 27015 (2016).
54. Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K. & Wood, M. A. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 9447–52 (2009).
55. Pavlov, I. P. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Book **17** (1927).
56. Flavell, C. R., Barber, D. J. & Lee, J. L. C. Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nat. Commun.* **2**, 504 (2011).
57. Cain, C. K., Blouin, A. M. & Barad, M. L-Type Voltage-Gated Calcium Channels Are Required for Extinction, But Not for Acquisition or Expression, of Conditional Fear in Mice. *J. Neurosci.* **22**, 9113–9121 (2002).
58. Almeida-Correa, S. & Amaral, O. B. Memory labilization in reconsolidation and extinction—evidence for a common plasticity system? *J Physiol Paris* **108**, 292–306 (2014).

Acknowledgements

We thank Mrs. Zelma Regina V. de Almeida for her kind and professional technical assistance, and M.Sc. Jane Zhang for her generous and competent language revision. This work was supported by fellowships and grants from CAPES (MEC), CNPq (MCT), and PROPESQ (UFRGS). All the authors declare having no other source of compensation besides primary institution and federal funding.

Author Contributions

J.H. designed the study, performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. A.M., F.Z.B., A.P.C. and R.O.S. helped in the experiments and contributed with ideas. L.O.A. and J.A.Q. helped to design the study and writing the manuscript. All authors have reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

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



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

© The Author(s) 2017

5. DISCUSSÃO

É sabido que memórias de extinção são tênues e propensas a decair (Bouton, 2002; Rescorla, 2004; Vervliet *et al*, 2013). Isto é problemático, visto que procedimentos baseados na extinção são os mais comumente utilizados nas terapias cognitivo-comportamentais (Johnson and Casey, 2015). Isso faz da busca de procedimentos de extinção mais efetivos um importante objetivo para o campo das neurociências. Em trabalhos anteriores do nosso laboratório (De Oliveira Alvares *et al*, 2013) e de outros grupos (Forcato *et al*, 2011; Fukushima *et al*, 2014; Inda *et al*, 2011; Lee, 2008; Pedroso *et al*, 2013), relatou-se que a reconsolidação pode levar ao fortalecimento da memória reativada. Aqui, hipotetizamos que a memória de extinção é plástica e pode ser reconsolidada e modificada por este processo, e que a combinação de procedimentos de extinção e reconsolidação podem gerar estratégias terapêuticas mais efetivas. Desta forma, nesta tese foi investigado a possibilidade de reconsolidar um traço de extinção de forma a induzir o seu fortalecimento.

Averiguação das variáveis metodológicas que afetam a indução da reconsolidação e da extinção da memória

No artigo Haubrich *et al.*, 2015 (Capítulo I), exploramos a propriedade da reconsolidação de possibilitar alterações no traço reativado visando atenuar uma memória de medo (Lee, 2010; De Oliveira Alvares *et al*, 2013). Nos perguntamos se tal mecanismo permitiria incorporar às memórias de medo informações emocionalmente positivas, diminuindo a aversividade desta memória. Vimos que ao submeter os animais a reexposições breves ao

contexto condicionado na presença de estímulos apetitivos (i.e. chocolate ou cereal adocicado), os níveis de congelamentos foram inferiores aos animais apenas reexpostos ao contexto. Tal atenuação do medo persistiu em um teste posterior mesmo na ausência dos estímulos apetitivos, indicando que a memória contextual de medo teve sua valência emocional modificada. Possivelmente, a presença de um reforço positivo durante as reexposições levou a uma espécie de aprendizado de contracondicionamento que, via reconsolidação, ressignificou a memória contextual para níveis menos aversivos.

Sendo este um procedimento novo, foi necessário averiguar-se se o fenômeno induzido pelas reexposições foi de fato a modificação da memória via reconsolidação ou uma facilitação da extinção (ou outro processo envolvendo a formação de uma nova memória), além de se testar diferentes protocolos de recuperação do medo a fim de atestar a sua efetividade. Os resultados obtidos formaram a base teórica e metodológica que permitiu, a seguir, estudarmos diretamente a reconsolidação da extinção e suas possíveis consequências quanto à recuperação do medo.

Tanto a extinção quanto a reconsolidação são processos desencadeados pela evocação da memória, o que no paradigma de condicionamento aversivo ao contexto se configura em uma reexposição ao contexto condicionado. Assim sendo, de forma a permitir o estudo da complexa interação entre a extinção e a reconsolidação, primeiro buscamos determinar precisamente os parâmetros experimentais efetivos em induzir cada um dos desfechos.

A síntese proteica é necessária para tanto para a reconsolidação como para a extinção, mas seu bloqueio leva a desfechos distintos em ambos os casos. No bloqueio da reconsolidação, a memória aversiva previamente formada é prejudicada levando à diminuição das respostas condicionadas de medo. Já no bloqueio da extinção esta nova memória não é consolidada, fazendo com que os níveis de congelamento se mantenham elevados. Frente os distintos desfechos comportamentais em cada um destes cenários, é possível determinar qual é o processo neurobiológico decorrente de diferentes tipos de sessões de reexposição.

Portanto, com o objetivo de avaliar se as reexposições gerariam reconsolidação ou extinção, injetamos o inibidor de síntese proteica cicloheximida após sessões de reexposição ao contexto de diferentes durações. Vimos que em sessões de 3 e de 9 minutos, a inibição da síntese proteica pós-reexposição leva a uma diminuição da expressão do medo em um teste conduzido 24 h depois (Figuras S2.A – S2.F, Capítulo I). Além disso, o bloqueio da desestabilização da memória com a infusão pré-reexposição da droga nimodipina reverteu o efeito amnésico da cicloheximida no protocolo de 3 minutos. Isso demonstra que nestes procedimentos, a reexposição foi de fato uma reativação da memória capaz de induzir a sua labilização e consequente reconsolidação. Já quando a reexposição foi de 30 minutos, o tratamento com cicloheximida pós-reexposição fez as respostas de congelamento aumentarem em relação aos animais veículo (Figuras S2.G – S2.H, Capítulo I), mostrando que nesse protocolo um novo aprendizado de extinção é desencadeado.

Para que a memória de extinção ocorra, é necessário que haja inicialmente a aquisição da memória relacionada a este aprendizado, o que

comportamentalmente se observa na diminuição gradual dos níveis de congelamento no decorrer da reexposição. Nos nossos protocolo, isso só foi observado quando a reexposição foi de 30 min, sendo que em reexposições de 3 min e 9 min não houve declínio das respostas de medo durante as sessões (Figuras S1 – S2, grupos controle, Capítulo I). Central neste trabalho, também observamos que quando as reexposições de 3 minutos (capazes de induzir a reconsolidação, e portanto, sendo reativações da memória) são conduzidas repetidas vezes (até três vezes), não há decaimento dos níveis de congelamento durante as sessões, mostrando que não ocorre aprendizado de extinção (Figura 3, Capítulo I).

Importante também, vimos que a reexposição de 3 minutos não é capaz de tornar lábil uma memória remota de 30 dias visto a ausência de efeito da cicloheximida neste caso (Figuras S3.A – S3.C, Capítulo I). Isso mostra que nosso protocolo de condicionamento aversivo ao contexto gera memórias que são afetadas pelo fator limitador da reconsolidação relacionado com a idade do traço (Nader and Hardt, 2009). Portanto, para serem efetivas, as reativações devem ser conduzidas antes dessa janela temporal de labilização se fechar. De importância ainda maior é a observação de que mesmo em uma memória remota que é resistente à labilização, as três sessões de reativação de 3 minutos não são capazes de induzir a extinção. Quando as reativações foram conduzidas 30 dias após o treino, não houve qualquer diminuição do medo durante as sessões e no teste (Figuras S3.D – S3.F, Capítulo I). Isto é relevante pois em um trabalho anterior, foi demonstrado que em protocolos aversivos mais fracos, sessões de reativações se tornam sessões de extinção com o passar do tempo devido ao decaimento da memória de medo (Inda *et al*,

2011). Portanto, tal potencial fator confundidor foi descartado. Este conjunto de dados mostram que sessões de reexposição de 3 minutos induzem confiavelmente o processo de reconsolidação, e a extinção não é induzida mesmo quando as reexposições são conduzidas repetidas vezes e em tempos remotos. Para a indução da extinção, é necessária uma reexposição muito mais longa, de 30 minutos.

Complementarmente, a fim de verificar a efetividade do procedimento de atenuação do medo proposto no artigo, realizamos diferentes protocolos de recuperação do medo. Analisamos a reinstalação (Figura 1, Capítulo I), a recuperação espontânea (Figura 2, Capítulo I), e a reaquisição rápida (Figura 3, Capítulo I). O último foi especialmente importante, pois permite detectar a relação entre a força da memória de medo e a de extinção. Em condições onde a memória de extinção é relativamente fraca em relação à de medo, a reaquisição é rápida (Bouton, 2002; Monfils *et al*, 2009), mas no contrário ela é lenta (Bouton, 2002). Portanto, esta intervenção permite estudar diretamente a força da memória de extinção. Vimos que no protocolo de atenuação da memória de medo via reconsolidação, uma sessão de reaquisição não tem qualquer efeito. Porém, após o procedimento de extinção aqui utilizado, as resposta de medo retornam integralmente aos níveis pré-extinção (Figura 3, Capítulo I). Assim, este protocolo de reaquisição rápida permite verificar diretamente se a memória de extinção foi fortalecida (não apresentando reaquisição rápida) ou não (apresentando a rápida reaquisição do medo).

Portanto, com nosso protocolo de medo condicionado ao contexto, é possível investigar a interação entre a reconsolidação e a extinção de maneira confiável. Reativações de 3 min e 9 min induzem a reconsolidação, e apenas

reexposições de 30 minutos induzem a extinção. Reativações de 3 minutos, mesmo quando conduzidas repetidas vezes e até em tempos remotos, não são capazes de levar ao aprendizado da extinção. Além disso, diversos protocolos foram desenvolvidos para permitir a avaliação de um tratamento quanto a sua susceptibilidade à recuperação do medo.

Enfraquecimento tempo-dependente da memória de extinção

Dos fenômenos causadores da ressurgência do medo após terapias baseadas na extinção, a recuperação espontânea é o mais clássico (Rescorla, 2004). Nele, se verifica que (i) em tempos recentes a extinção é efetiva em inibir respostas condicionadas de medo mas (ii) posteriormente o medo voltam a se expressar integralmente.

A fim de estudar o fenômeno de enfraquecimento da extinção, buscamos determinar a dinâmica temporal da recuperação espontânea do medo em nosso protocolo de condicionamento aversivo ao contexto (Figura 1, Capítulo II). Para tanto, submetemos os animais condicionados a uma sessão de extinção e, no dia seguinte, os testamos a fim de verificar a linha base de expressão do medo pós extinção. Em seguida, diferentes grupos de animais foram retestados em diferentes momentos: após 7, 14, 21 ou 28 dias. A comparação dos níveis de congelamento entre o teste 1 e os retestes conduzidos em momentos variados nos permitiu verificar, então, a dinâmica temporal da recuperação espontânea do medo. Quando o reteste ocorreu em tempos recentes (7 e 14 dias), verificamos não haver qualquer diferença nos níveis de congelamento em relação ao teste 1. Ou seja, até 14 dias não há recuperação do medo. Porém, aos 21 e 28 dias, houve robusto aumento nos

níveis de congelamento. Isto demonstra que, em algum ponto entre os dias 14 e 21, a memória de extinção decai a um patamar onde ela perde sua capacidade de inibir o traço aversivo.

Importante salientar que tal decaimento provavelmente não foi abrupto como os resultados podem sugerir, mas gradual. Hipotetizamos que a partir do momento da sua formação, a memória de extinção se torna progressivamente mais fraca, até um momento onde tal enfraquecimento é observável comportamentalmente. Desta forma, apesar de indistintas no comportamento, provavelmente a força da memória de extinção no dia 14 já era menor do que no dia 7, porém ainda capaz de inibir o medo. Independentemente desta disso, os dados demonstram conclusivamente que, no protocolo aqui utilizado, a memória de extinção é efetiva em inibir o medo até 14 dias da sua formação, mas não após 21 dias.

Efeito da reativação da memória sobre o enfraquecimento do traço de extinção

Conforme já demonstrado em trabalhos prévios de nosso laboratório (De Oliveira Alvares *et al*, 2013) e de outros grupos (Forcato *et al*, 2014; Frenkel *et al*, 2005; Fukushima *et al*, 2014; Lee, 2008), uma função fisiológica da reconsolidação é a de fortalecer memórias de intensidade não assintótica em direção a este nível. Em conjunto, estes estudos mostram que quando uma memória é reativada, se observa performance superior em um teste posterior. Desta forma, hipotetizamos que se uma memória de extinção for reativada, e se isso induzir sua reconsolidação, ela será fortalecida, evitando o seu decaimento natural e a recuperação espontânea do medo em tempos remotos.

A fim de testar esta hipótese, os animais foram condicionados, submetidos a sessão de extinção e testados no dia seguinte para averiguar a retenção inicial da memória de extinção. Uma sessão de reteste foi conduzida no dia 28, onde no experimento anterior foi demonstrado claramente que ocorre robusta recuperação espontânea. Com o intuito de induzir o fortalecimento da memória de extinção, um grupo de animais foi submetido, no intervalo entre teste e reteste, às 3 sessões de reativação que anteriormente se mostraram adequada para induzir o processo de reconsolidação (Figuras S2.A-C, Capítulo I), e também *per se* incapazes de induzir extinção (Figuras 3 e S3.D-F, Capítulo I). Já os animais do grupo controle permaneceram em suas caixas moradias no intervalo entre os dois testes. Um grupo controle adicional (No extinction + reactivation) não foi submetido à sessão de extinção, mas passou pelas 3 reativações. Este controle adicional foi conduzido a fim de se controlar internamente neste experimento se as reativações teriam por si só algum efeito. Este desenho nos permitiu analisar o efeito das reativações sobre a recuperação espontânea.

No teste 1, ambos os grupos que passaram pela sessão de extinção apresentaram respostas igualmente inferiores ao grupo não submetido a este procedimento. Durante as reativações, em todas as sessões se observou respostas de medo significativamente menores no grupo que passou pela extinção em relação ao não extinto. No teste 2, observamos que o grupo controle, como esperado, apresentou recuperação espontânea do medo, replicando o resultado do experimento 1. No grupo não submetido à extinção, apenas às reativações, não houve qualquer diferença entre os testes. No grupo que passou pela extinção e também pelas reativações, porém,

observamos que no teste 2 os níveis de congelamento permaneceram baixos, iguais aos do teste 1, indicando que a recuperação espontânea não ocorreu. Além disso, no teste 2, os níveis de congelamento do grupo extinção + reativação foram inferiores a todos os demais (Figura 2, Capítulo II).

Este resultado mostra novamente que a memória de extinção decai de maneira tempo-dependente, ocorrendo recuperação espontânea do medo no teste remoto. Porém, as reativações periódicas dessa memória de extinção foram capazes de prevenir este desfecho, mantendo as respostas de medo persistentemente baixas. Como discutido no experimento anterior, o momento onde o decaimento da extinção é tal a ponto permitir a recuperação do medo se dá entre os dias 14 e 21. No experimento anterior, também vimos que no dia 7 a memória de extinção ainda é robusta, sendo dominante em relação à memória de medo. Assim sendo, logicamente a reativação conduzida no intervalo de 7 dias levou à evocação do traço de extinção, o que possivelmente induziu a sua reconsolidação. Ao repetir este procedimento em intervalos de 7 dias, os sucessivos *rounds* de reconsolidação e fortalecimento impediram o decaimento da extinção, mantendo-a dominante de maneira duradoura. É importante também observar que na ausência da sessão de extinção, as reativações provavelmente induziram a reconsolidação do traço de medo. Neste grupo, esperávamos que a memória de medo também pudesse ser fortalecida, o que não foi observado comportamentalmente possivelmente por um efeito teto.

Portanto, estes resultados demonstram que reativações periódicas de uma memória de extinção são efetivas em promover o seu fortalecimento, levando a uma robusta proteção contra a recuperação espontânea.

Papel da labilização da memória de extinção no seu fortalecimento induzido por sessões de reativação

A teoria de reconsolidação postula que quando reativada, a memória pode entrar em um estado lábil e estável onde é suscetível a interferências, necessitando se reestabilizar para persistir (Haubrich and Nader, 2016; Nader and Hardt, 2009). O processo pelo qual uma memória se torna lábil é também chamado de desestabilização, pois reflete a transição da memória de um estado inativo (estável) para um estado ativo (instável). A desestabilização envolve diversos mecanismos específicos (Finnie and Nader, 2012), um deles sendo a ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VGCC). O bloqueio dos mecanismos de desestabilização fazem que, mesmo após uma reativação, a memória não se torne lábil e a reconsolidação não aconteça (Suzuki *et al*, 2008).

O resultado da sessão anterior mostra que uma vez formada a memória de extinção, sessões curtas de reativação conduzidas em intervalos de 7 dias são capazes de prevenir a recuperação do medo. Nós hipotetizamos que tal efeito é decorrente da reconsolidação do traço de extinção induzido pelas reativações. Caso o fortalecimento da extinção seja mesmo decorrente da sua reconsolidação, o bloqueio do processo de desestabilização impediria tal desfecho, resultando na recuperação do medo.

Com o intuito de testar esta predição, nós escolhemos utilizar o fármaco nimodipina, um bloqueador dos L-VGCC que é efetivo em bloquear a desestabilização (Figuras S2.A-C, Capítulo I). Repetimos o desenho experimental de condicionamento, sessão de extinção, teste recente, 3

sessões de reativação e reteste remoto, sendo que um grupo de animais foi tratado com nimodipina 30 min antes de cada, enquanto os controles receberam veículo.

Durante o teste 1, ambos os grupos apresentaram respostas de medo igualmente baixas. Durante as sessões de reativação, porém, já foi possível observar diferenças entre ambos. No grupo controle, os níveis de congelamento permaneceram baixos e estáveis no decorrer das reativações. Porém, os tratados com nimodipina apresentaram aumento das respostas de medo no decorrer das mesmas sessões. No reteste remoto, os animais tratados com Nimodipina apresentaram respostas mais altas de congelamento do que os veículos. Comparando-se os testes 1 e 2, apenas os animais do grupo nimodipina apresentaram recuperação do medo. Este resultado demonstra que o fortalecimento da extinção decorrente das reativações periódicas é mediado pela ativação dos LVGCC (Figura 3, Capítulo II). Visto que o bloqueio dos L-VGCC previne a desestabilização da memória, este resultado sugere que o processo neurobiológico subjacente foi a reconsolidação do traço de extinção.

É importante discutir que os L-VGCC também são importantes para a aquisição/consolidação da extinção (Flavell *et al*, 2011). Logo, os resultados deste experimento também poderiam ser explicados pela interpretação de que cada sessão de reativação, na verdade, induziu um novo aprendizado de extinção, e não a reconsolidação do traço previamente formado. Assim, a proteção contra a recuperação espontânea seria consequência da soma de aprendizados de extinção adicionais. Porém, algumas questões fazem isto ser improvável. Ao contrário dos trabalhos estudando a participação dos L-VGCC

na extinção, aqui esta intervenção farmacológica foi feita vários dias após o aprendizado inicial de extinção. Além disso, tanto o resultado do grupo No Ext + React do experimento anterior, como no Capítulo I discutidas anteriormente, fica claro que sessões de reativação de 3 min não são suficientes para induzir aprendizado de extinção no nosso protocolo. Porém, ainda sim, existe a possibilidade de que as reativações de 3 min seriam suficientes para induzir um novo aprendizado de extinção em condições onde já há um aprendizado prévio de extinção, como ocorre neste protocolo. A resposta definitiva em relação ao mecanismo neurobiológico engajado nas reativações (reconsolidação ou extinção adicional) é dada no experimento a seguir.

Desta forma, os resultados desta sessão sugerem que a ocorrência do processo de desestabilização-reconsolidação do traço de extinção é necessário para o seu fortalecimento, uma vez que se a desestabilização for bloqueada, a proteção contra a recuperação espontânea induzida pelas reativações não ocorre.

Determinação do processo neurobiológico decorrente da reativação da extinção

A reconsolidação é um processo onde uma memória previamente formada é desestabilizada após sua reativação, necessitando de síntese proteica para se reestabilizar e persistir (Nader *et al*, 2000). Assim sendo, a inibição da síntese proteica faz com que uma memória lábil não se reestabilize e se perca. Nós hipotetizamos que quando memórias de medo e de extinção coexistem, um fenômeno de dominância de traço acontece e apenas um dos traços será reativado e reconsolidado. Visto que em tempos recentes a

memória de extinção é dominante, sessões de reativação conduzidas nesta janela induziriam a sua desestabilização, conseqüentemente fazendo-a necessitar de síntese proteica para se reestabilizar e persistir.

Esta hipótese foi testada utilizando-se o inibidor de síntese protéica cicloheximida pós-reativação. Um grupo de animais passou pelas sessões de condicionamento, reativação e teste, e outro pelo condicionamento, extinção, reativação e teste. No grupo que não passou pela extinção, o tratamento pós-reativação com cicloheximida levou ao bloqueio da reconsolidação da memória de medo, visto a diminuição nos níveis de congelamento observados na sessão de teste 24 h depois. Está é uma demonstração clássica da ocorrência da reconsolidação e mostra que nosso protocolo é efetivo para tal. No grupo que passou pela extinção, vimos que durante a reativação o congelamento foi baixo, indicando que a memória de extinção estava sendo expressa inibindo o medo. No teste, porém, animais tratados com cicloheximida apresentaram um grande aumento na expressão do medo, sendo esta igual aos animais não extintos que receberam veículo. Ou seja, após o tratamento pós-reativação com cicloheximida a memória de extinção foi abolida. Isso indica que a sessão de reativação induziu o processo de reconsolidação da memória de extinção.

No experimento anterior, discutimos que os dados poderiam ser interpretados na ótica de que as sessões de reativação, em vez de ocasionarem a reconsolidação, induziriam novos aprendizados de extinção. Os resultados do experimento discutido aqui demonstra que este não é o caso. No caso de as sessões de reativação representarem aprendizados de extinção adicionais, o tratamento com cicloheximida prejudicaria apenas o aprendizado incremental daquela sessão, sem afetar o traço que foi previamente formado e

armazenado. Porém, o que observamos é que o traço de extinção foi fortemente prejudicado, e a inibição sobre o medo totalmente revertida. Assim sendo, o resultado deste experimento, em acordo com trabalhos prévios (Eisenberg and Dudai, 2004; Rossato *et al*, 2010), mostra de maneira inequívoca que a reativação de fato desencadeia o processo de reconsolidação da memória de extinção.

Investigação acerca da susceptibilidade da memória de extinção de ser fortalecida por um fármaco promnóstico agindo sobre sua reconsolidação

A literatura acerca da reconsolidação mostra que intervenções farmacológicas pós-reativação não necessariamente levam à amnésia. Dependendo da intervenção, as memórias podem ser moduladas positivamente, culminando em um aumento de performance em testes posteriores (Alberini and Chen, 2012; Lee *et al*, 2009; de Oliveira Alvares *et al*, 2008; Portero-Tresserra *et al*, 2013). Já foram descritas diversas intervenções farmacológicas com ação promnóstica sobre a reconsolidação, entre elas, a inibição da enzima histona deacetilase (HDAC; Bredy and Barad, 2008; Federman *et al*, 2012; Stefanko *et al*, 2009; Villain *et al*, 2016) que tem como efeito a ativação da expressão gênica via mecanismos epigenéticos (Barrett *et al*, 2008).

No experimento anterior verificamos que a memória de extinção é enfraquecida quando sua reconsolidação é farmacologicamente prejudicada. Aqui, investigamos se o desfecho oposto é possível com uma intervenção farmacológica promnóstica agindo sobre a reconsolidação da extinção. Com

esse objetivo, injetamos após a reativação a promnética droga butirato de sódio (Stefanko *et al*, 2009), inibidora da enzima HDAC , e investigamos se tal tratamento teria um efeito protetor sobre outro fenômeno de recuperação do medo, a reaquisição rápida.

A reaquisição rápida consiste no retorno da expressão do medo após uma sessão fraca de retreinamento que por si só não seria capazes de gerar respostas de medo semelhantes em animais *naive* (Bouton *et al*, 2012) . Este tipo de recuperação é típica após procedimentos de extinção, mas não após procedimentos de reconsolidação, como mostrado na figura 3 do Capítulo I. Diferente do protocolo do Capítulo I, porém, aqui as sessões de retreinamento foram conduzidas repetidas vezes até se observar a recuperação do medo.

Observamos que após uma única sessão de recondicionamento, já foi possível verificar um grande aumento da expressão do medo nos animais tratados com veículo, ilustrando a susceptibilidade de uma memória de extinção a este procedimento. Em contrapartida, os animais tratados com butirato de sódio não apresentaram qualquer recuperação. Apenas após 3 sessões de recondicionamento grupo tratado com butirato de sódio passou a apresentar respostas de medo semelhantes aos veículos (Figura 5, Capítulo II).

Portanto, esse resultado demonstra que memórias de extinção podem ser moduladas positivamente com fármacos promnéticos agindo sobre a sua reconsolidação. Este procedimento resultou em um robusto fortalecimento do traço extinção, protegendo-o contra a reaquisição rápida do medo. Tal desfecho possivelmente resultou da modulação positiva da rede hipocampo-infralímbica que suporta a memória de extinção, visto a demonstração prévia

da relação entre o aumento da acetilação de histonas nestas estruturas e o favorecimento da extinção (Stafford *et al*, 2012). Além disso, este achado indica que os diversos exemplos já reportados na literatura acerca da modulação farmacológica positiva da reconsolidação podem potencialmente ser aplicados também para fortalecer a reconsolidação de memórias de extinção, o que traz perspectivas promissoras para novas estratégias terapêuticas.

Considerações finais

A extinção e a reconsolidação são largamente vistas como processos opostos e mutuamente exclusivos, e realmente o são em várias circunstâncias. Porém, esta visão dogmática fez com que os cientistas ativamente evitassem um processo para melhor estudar o outro. Apesar desta divisão ter sido frutífera para o melhor entendimento dos mecanismos distintos de ambos, o estudo de suas interações acabou por ser ignorado. O estudo desta interação foi exatamente o foco deste trabalho. Nós vimos que memórias de extinção podem ser moduladas via reconsolidação, o que tem profundas implicações.

No âmbito translacional, nosso trabalho mostra que procedimentos baseados na extinção (i.e. terapias de exposição em humanos) podem ter sua efetividade grandemente aumentada, diminuindo as chances de recaída. Também importante, o uso de procedimentos de reconsolidação sobre a extinção permite o seu fortalecimento em momentos posteriores à sua aquisição/consolidação inicial por meio de intervenções breves, sendo assim uma ferramenta prática. Potencialmente, essa nova perspectiva pode levar a avanços expressivos na eficácia com que conseguimos tratar transtornos psiquiátricos relacionados a memórias de medo.

Esta descoberta abre todo um novo campo de investigação: memórias de extinção possivelmente podem ser fortalecidas, modificadas, moduladas, etc., pelos inúmeros procedimentos de reconsolidação já descritos na literatura. Além disso, este trabalho avança conceitualmente o campo da neurobiologia da memória ao revelar uma dinâmica interação entre os processos de extinção e reconsolidação que até então era desconhecido.

6. CONCLUSÕES

6.1. Capítulo I

No capítulo I determinou-se precisamente, em nosso protocolo de condicionamento aversivo ao contexto, os parâmetros metodológicos que induzem o processo de reconsolidação ou o de extinção. Especificamente:

- Sessões de 3 a 9 min de duração induzem a reconsolidação, enquanto que sessões de 30 min induzem a extinção;
- O processo de reconsolidação decorrente da reexposição de 3 min pode ser prevenido se a fase de desestabilização for bloqueada;
- Reativações de 3 min, mesmo quando conduzidas repetidas vezes, não são capazes de promover a extinção;
- Reativações de 3 min, mesmo quando conduzidas repetidas vezes em tempos remotos, não são capazes de promover a extinção;
- A reexposição de 30 min leva à formação de uma memória de extinção que é sensível à reaquisição rápida do medo após um retreinamento fraco.

6.2. Capítulo II

No capítulo II, verificamos que a memória de extinção pode ser reconsolidada, o que permite o seu fortalecimento por reativações periódicas ou por intervenções farmacológicas promnésticas pós-reativação, protegendo-a contra a recuperação do medo. Especificamente:

- A memória de extinção passa por um enfraquecimento tempo-dependente que culmina na recuperação espontânea das respostas de medo;
- Sessões de reativação da memória de 3 min são capazes de fortalecer a memória de extinção, prevenindo seu decaimento e a recuperação espontânea do medo;
- A prevenção da recuperação espontânea pelas sessões de reativação tem como fator imperativo a indução da desestabilização do traço de extinção;
- Uma sessão de reativação é capaz de desencadear a reconsolidação do traço de extinção, abrindo uma janela de plasticidade que torna esta memória suscetível a intervenções farmacológicas amnéticas;
- A modulação positiva da reconsolidação do traço de extinção com um fármaco promnóstico leva ao seu fortalecimento, resultando em proteção contra a reaquisição das respostas de medo.

7. PERSPECTIVAS

- Em cada um dos artigos, foram demonstrados novos métodos baseados na reconsolidação que provocam robusta supressão do medo que é resistente a fenômenos de recuperação das respostas aversivas. Visto as semelhanças entre ambos no nível de mecanismos neurobiológicos envolvidos e protocolos experimentais utilizados, pretendemos no futuro estudar se ambas as estratégias podem ser combinadas, levando a efeitos ainda mais robustos.

- Visto o grande potencial terapêutico dos achados descritos nesta tese, pretendemos realizar colaborações para testar estes novos procedimentos em humanos de forma a permitir sua aplicação na prática clínica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberini CM, Chen DY (2012). Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci* **35**: 274–83.
- Alberini CM, Milekic MH, Tronel S (2006). Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cell Mol Life Sci* **63**: 999–1008.
- Alfei JM, Monti RI, Molina VA, Bueno AM, Urcelay GP (2015). Prediction error and trace dominance determine the fate of fear memories after post-training manipulations. *Learn Mem* **22**: 385–400.
- Bailey CH, Kandel ER (Elsevier: 2008). *Synaptic remodeling , synaptic growth and the storage of long-term memory in Aplysia*. *Prog Brain Res* **169**: .
- Baratti CM, Boccia MM, Blake MG, Acosta GB (2008). Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 426–440.
- Barrett RM, Wood MA, Barrett RM, Wood MA (2008). Beyond transcription factors : The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory Beyond transcription factors : The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. 460–467doi:10.1101/lm.917508.
- Bernardi RE, Lattal KM, Berger SP (2006). Postretrieval propranolol disrupts a cocaine conditioned place preference. *NeuroReport Rapid Commun Neurosci Res* **17**: 1443–1447.
- Besnard A (2012). A model of hippocampal competition between new learning and memory updating. *J Neurosci* **32**: 3281–3.
- Bouton ME (2002). Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry* **52**: 976–986.
- Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran K a, Maren S (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms.

Biol Psychiatry **60**: 352–60.

Bouton ME, Winterbauer NE, Todd TP (2012). Relapse processes after the extinction of instrumental learning: renewal, resurgence, and reacquisition. *Behav Processes* **90**: 130–41.

Bredy TW, Barad M (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* **15**: 39–45.

Bridge DJ, Voss JL (2014). Hippocampal binding of novel information with dominant memory traces can support both memory stability and change. *J Neurosci* **34**: 2203–2213.

Crestani AP, Zaccouteguy Boos F, Haubrich J, Ordoñez Sierra R, Santana F, Molina JMD, *et al* (2015). Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation. *Sci Rep* **5**: .

Cukor J, Spitalnick J, Difede J, Rizzo A, Rothbaum BO (2009). Emerging treatments for PTSD. *Clin Psychol Rev* **29**: 715–26.

Danziger K (Cambridge, 2008). *Marking the Mind A History of Memory*. Cambridge Univ Press .

Devenport LD (1998). Spontaneous recovery without interference : Why remembering is adaptive. *Anim Learn Behav* **26**: 172–181.

Duncan CP (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol* **42**: 32–44.

Eisenberg M, Dudai Y (2004). Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *Eur J Neurosci* **20**: 3397–3403.

Eisenberg M, Kobil T, Berman DE, Dudai Y (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* **301**: 1102–1104.

- Federman N, Fustiñana MS, Romano a (2012). Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory. *Neuroscience* **219**: 145–56.
- Finnie PSB, Nader K (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neurosci Biobehav Rev* **36**: 1667–707.
- Flavell CR, Barber DJ, Lee JLC (2011). Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nat Commun* **2**: 504.
- Flexner LB, Flexner JB, Stellar E (1965). Memory and cerebral protein synthesis in mice as affected by graded amounts of puromycin. *Exp Neurol* **13**: 264–272.
- Foa EB, Kozak MJ, Marks I, McNally R, Miller G, Persons J (1986). Emotional Processing of Fear : Exposure to Corrective Information. **99**: .
- Forcato C, Fernandez RS, Pedreira ME (2014). Strengthening a consolidated memory: the key role of the reconsolidation process. *J Physiol Paris* **108**: 323–333.
- Forcato C, Rodríguez MLC, Pedreira ME (2011). Repeated labilization-reconsolidation processes strengthen declarative memory in humans. *PLoS One* **6**: e23305.
- Forcato C, Rodríguez MLC, Pedreira ME, Maldonado H (2010). Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiol Learn Mem* **93**: 77–84.
- Frankland PW, Bontempi B (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* **6**: 119–30.
- Frenkel L, Maldonado H, Delorenzi A (2005). Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur J Neurosci* **22**: 1757–1766.
- Fukushima H, Zhang Y, Archbold G, Ishikawa R, Nader K, Kida S (2014).

- Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *Elife* **2014**: 1–19.
- Furini C, Myskiw J, Izquierdo I (2014). The learning of fear extinction. *Neurosci Biobehav Rev* **47**: 670–683.
- Gahr M, Schonfeldt-Lecuona C, Spitzer M, Graf H (2014). Electroconvulsive therapy and posttraumatic stress disorder: first experience with conversation-based reactivation of traumatic memory contents and subsequent ECT-mediated impairment of reconsolidation. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **26**: E38-9.
- Gamache K, Pitman RK, Nader K (2012). Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* **37**: 2789–96.
- Garcia-DeLaTorre P, Rodriguez-Ortiz CJ, Arreguin-Martinez JL, Cruz-Castaneda P, Bermudez-Rattoni F (2009). Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn Mem* **16**: 514–519.
- Gazarini L, Stern CA, Carobrez AP, Bertoglio LJ (2013). Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting alpha1- and beta-adrenergic receptors. *Learn Mem* **20**: 210–219.
- Golkar A, Bellander M, Olsson A, Ohman A (2012). Are fear memories erasable?-Reconsolidation of learned fear with fear-relevant and fear-irrelevant stimuli. *Front Behav Neurosci Vol 6 Nov 2012, ArtID 80* **6**: .
- Goltz C von der, Vengeliene V, Bilbao A, Perreau-Lenz S, Pawlak CR, Kiefer F, *et al* (2009). Cue-induced alcohol-seeking behaviour is reduced by disrupting the reconsolidation of alcohol-related memories. *Psychopharmacol* **205**: 389–397.
- Gordon WC (1977a). Similarities of recently acquired and reactivated memories in interference. *Am J Psychol* **90**: 231–242.

- Gordon WC (1977b). Susceptibility of a Reactivated Memory to the Effects of Strychnine : A Time-Dependent Phenomenon '. *Physiol Behav* **18**: 95–99.
- Gordon WC, Spear NE (1973). Effect of reactivation of a previously acquired memory on the interaction between memories in the rat. *J Exp Psychol* **99**: 349–355.
- Haubrich J, Cassini LF, Diehl F, Santana F, Fürstenau de Oliveira L, Oliveira Alvares L de, *et al* (2016). Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus* **26**: .
- Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, Alvares Lde O, *et al* (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, Nader K (2016). Memory Reconsolidation. *Curr Top Behav Neurosci* 1–26doi:10.1007/7854_2016_463.
- Hebb DO (1949). The organization of behavior. *New York Wiley* doi:10.2307/1418888.
- Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Müller C, Lüthi A (2008). Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **454**: .
- Herry C, Johansen JP (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat Publ Gr* **17**: 1644–1654.
- Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L (2007). Reconsolidation of episodic memories: A subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* **14**: 47–53.
- Inda MC, Muravieva E V, Alberini CM (2011). Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* **31**: 1635–43.
- Johnson DC, Casey BJ (2015). Easy to remember, difficult to forget: The development of fear regulation. *Dev Cogn Neurosci* **11**: 42–55.

- Kaang BK, Lee SH, Kim H (2009). Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *Neuroscientist* **15**: 430–435.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T (McGraw-Hill: New York, 2000). *Principles of Neural Science*. .
- Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell* **157**: 163–86.
- Kindt M, Soeter M (2013). Reconsolidation in a human fear conditioning study: a test of extinction as updating mechanism. *Biol Psychol* **92**: 43–50.
- Kindt M, Soeter M, Sevenster D (2014). Disrupting reconsolidation of fear memory in humans by a noradrenergic beta-blocker. *J Vis Exp*
doi:10.3791/52151.
- Kroes MCW, Tendolkar I, Wingen G a van, Waarde J a van, Strange B a, Fernández G (2014). An electroconvulsive therapy procedure impairs reconsolidation of episodic memories in humans. *Nat Neurosci* **17**: 204–6.
- la Fuente V de, Freudenthal R, Romano A (2011). Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J Neurosci* **31**: 5562–73.
- Lechner HA, Squire LR, Byrne JH, Mu G (1999). 100 Years of Consolidation—Remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem* **6**: 77–88.
- Ledoux JE (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* **23**: 155–184.
- Lee JLC (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* **11**: 1264–6.
- Lee JLC (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* **32**: 413–20.
- Lee JLC (2010). Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* **4**: 168.

- Lee JLC, Gardner RJ, Butler VJ, Everitt BJ (2009). D-cycloserine potentiates the reconsolidation of cocaine-associated memories. *Learn Mem* **16**: 82–5.
- Lewis DJ (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* **86**: 1054–1083.
- Maren S, Phan KL, Liberzon I (2013). The contextual brain : implications for fear conditioning , extinction and psychopathology. *Nat Neurosci* **14**: 417–428.
- Marks EH, Zoellner LA (2014). Attenuating fearful memories: effect of cued extinction on intrusions. *Emotion* **14**: 1143–1154.
- McGaugh JL (2000). Memory--a Century of Consolidation. *Science (80-)* **287**: 248–251.
- McGaugh JL, Krivanek JA (1970). Strychnine effects on discrimination learning in mice: Effects of dose and time of administration. *Physiol Behav* **5**: 1437–1442.
- Meir Drexler S, Merz CJ, Hamacher-Dang TC, Tegenthoff M, Wolf OT (2015). Effects of Cortisol on Reconsolidation of Reactivated Fear Memories. *Neuropsychopharmacology* doi:10.1038/npp.2015.160.
- Merlo E, Milton AL, Goozée ZY, Theobald DE, Everitt BJ (2014). Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *J Neurosci* **34**: 2422–31.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science (80-)* **160**: 554–555.
- Monfils M-H, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE (2009). Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science (80-)* **324**: 951–955.
- Morris RGM, Inglis J, Ainge J a, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, *et al* (2006). Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval.

Neuron **50**: 479–89.

Nader K, Hardt O (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* **10**: 224–234.

Nader K, Schafe GE, Doux JE Le (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**: 722–6.

Oliveira Alvares L De, 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.

Oliveira Alvares L de, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA (2008). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* **154**: 1648–1655.

Olshavsky ME, Song BJ, Powell DJ, Jones CE, Monfils M-H, Lee HJ (2013). Updating appetitive memory during reconsolidation window: Critical role of cue-directed behavior and amygdala central nucleus. *Front Behav Neurosci* Vol 7 Dec 2013, ArtID 186 **7**: .

Oyarzun JP, Lopez-Barroso D, Fuentemilla L, Cucurell D, Pedraza C, Rodriguez-Fornells A, *et al* (2012). Updating fearful memories with extinction training during reconsolidation: A human study using auditory aversive stimuli. *PLoS ONE* Vol 7(6), Jun 2012, ArtID e38849 **7**: .

Pavlov IP (1927). *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Book **17**: .

Pedroso TR, Jobim PFC, Carvalho LM, Christoff RR, Maurmann N, Reolon GK, *et al* (2013). Inhibition of protein synthesis or mTOR in the basolateral amygdala blocks retrieval-induced memory strengthening. *J Neural Transm* **120**: 1525–1531.

Ploski JE, McIntyre CK (2015a). Emotional modulation of synapses, circuits and

- memory. *Front Behav Neurosci* **9**: 35.
- Ploski JE, McIntyre CK (2015b). Emotional modulation of synapses, circuits and memory. *Front Behav Neurosci Vol 9 Feb 2015, ArtID 35* **9**: .
- Portero-Tresserra M, Marti-Nicolovius M, Guillazo-Blanch G, Boadas-Vaello P, Vale-Martinez A (2013). D-cycloserine in the basolateral amygdala prevents extinction and enhances reconsolidation of odor-reward associative learning in rats. *Neurobiol Learn Mem* **100**: 1–11.
- Quirk GJ, Garcia R, González-lima F (2006). Prefrontal Mechanisms in Extinction of Conditioned Fear. doi:10.1016/j.biopsycho.2006.03.010.
- Quirk GJ, Mueller D (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* **33**: 56–72.
- Radiske A, Rossato JI, Kohler CA, Gonzalez MC, Medina JH, Cammarota M (2015). Requirement for BDNF in the reconsolidation of fear extinction. *J Neurosci* **35**: 6570–6574.
- Rao-Ruiz P, Rotaru DC, Loo RJ Van Der, Mansvelder HD, Stiedl O, Smit AB, et al (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci* **14**: 1302–1308.
- Rescorla R a (2004). Spontaneous recovery. *Learn Mem* **11**: 501–9.
- Robinson MJ, Franklin KB (2010). Reconsolidation of a morphine place preference: impact of the strength and age of memory on disruption by propranolol and midazolam. *Behav Brain Res* **213**: 201–207.
- Rodriguez-Ortiz CJ, Garcia-DeLaTorre P, Benavidez E, Ballesteros MA, Bermudez-Rattoni F (2008). Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 352–9.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2010). Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21801–21805.

- Rothbaum BO, Davis M (2003). Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions. *Ann N Y Acad Sci* **1008**: 112–121.
- Samartgis JR, Schachte L, Hazi A, Crowe SF (2012). Memantine facilitates memory consolidation and reconsolidation in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem* **97**: 380–385.
- Schiller D, Monfils M-H, Raio CM, Johnson DC, Ledoux JE, Phelps E a (2010). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* **463**: 49–53.
- Schneider a M, Sherman W (1968). Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science (80-)* **159**: 219–21.
- Sevenster D, Beckers T, Kindt M (2013). Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science (80-)* **339**: 830–833.
- Sevenster D, Beckers T, Kindt M (2014). Prediction error demarcates the transition from retrieval, to reconsolidation, to new learning. *Learn Mem* **21**: 580–584.
- Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J, *et al* (2013). Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem* **20**: 379–387.
- Soeter M, Kindt M (2015). An Abrupt Transformation of Phobic Behavior After a Post-Retrieval Amnesic Agent. *Biol Psychiatry*
doi:10.1016/j.biopsych.2015.04.006.
- Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM (2012). Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biol Psychiatry* **72**: 25–33.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood M a (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl*

Acad Sci U S A **106**: 9447–52.

Suzuki A, Josselyn S a, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* **24**: 4787–95.

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**: 426–33.

Tronson NC, Taylor JR (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* **8**: 262–75.

Vervliet B, Craske MG, Hermans D (2013). Fear extinction and relapse: state of the art. *Annu Rev Clin Psychol* **9**: 215–48.

Vetere G, Restivo L, Novembre G, Aceti M, Lumaca M, Ammassari-Teule M (2011). Extinction partially reverts structural changes associated with remote fear memory. *Learn Mem* **18**: 554–7.

Villain H, Florian C, Rouillet P (2016). HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. *Sci Rep* **6**: 27015.

Wang S-H, Oliveira Alvares L de, Nader K (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci* **12**: 905–12.

Winters BD, Tucci MC, DaCosta-Furtado M (2009a). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn Mem* **16**: 545–53.

Winters BD, Tucci MC, DaCosta-Furtado M (2009b). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn Mem* **16**: 545–553.

Wood NE, Rosasco ML, Suris AM, Spring JD, Marin MF, Lasko NB, *et al* (2015). Pharmacological blockade of memory reconsolidation in

posttraumatic stress disorder: three negative psychophysiological studies.
Psychiatry Res **225**: 31–39.

Zhao LY, Sun LL, Shi J, Li P, Zhang Y, Lu L (2011). Effects of beta-adrenergic receptor blockade on drug-related memory reconsolidation in abstinent heroin addicts. *Drug Alcohol Depend* **118**: 224–229.