

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ANA PAULA CRESTANI

**INVESTIGANDO OS APRENDIZADOS SUBSEQUENTES:
MECANISMOS PLÁSTICOS E DEPENDÊNCIA TEMPORAL**

Porto Alegre/RS
2018

ANA PAULA CRESTANI

**INVESTIGANDO OS APRENDIZADOS SUBSEQUENTES:
MECANISMOS PLÁSTICOS E DEPENDÊNCIA TEMPORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito final para obtenção do título de doutora.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Orientador no exterior: Prof. Dr. Brian Wiltgen

Porto Alegre/RS
2018

DEDICATÓRIA

As pessoas que sempre me apoiaram, que são meus maiores e melhores exemplos, meus pais.

AGRADECIMENTOS

O chegar até aqui vem acompanhado de muitas pessoas, as quais agradeço imensamente.

Em primeiro lugar, agradeço à minha família. Ao meu pai (**Donato**) por sempre me encorajar a ir atrás do que eu queria, mesmo sabendo que a consequência seria a distância. Por sempre estar disponível para me ajudar e por fazer o impossível para me ver feliz. À minha mãe (**Noimi**) por ser essa mulher tão forte, que abdicou de muitas coisas para poder criar seus filhos da melhor maneira possível. Aos meus irmãos (**Paulo e Carol**), que apesar de terem vindo muito depois de mim, sempre me trouxeram muitas alegrias. À minha avó **Filó** e meu avô **Lino** (*in memoriam*), que são responsáveis por muito do que sou. Ao meu nono **Benó** e minha nona **Nica**, que apesar de estarem mais distantes sempre me trataram com muito amor e carinho. Aos meus tios, principalmente ao tio **Jair** e ao tio **Zé** que são os exemplos que segui para estudar.

Agradeço ao **Rafa**, a pessoa com a qual compartilho minha vida. Nosso amor, a alegria de estarmos juntos e o respeito mútuo me fazem muito feliz.

Agradeço ao lugar que foi minha segunda casa nos últimos quase 10 anos, a **UFRGS**, mais especificamente o **Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação**. Não consigo mensurar tudo que aprendi nesse local, toda a base da cientista que me tornei foi desenvolvida nele.

Agradeço ao meu orientador de TCC, de mestrado e de doutorado, o meu pai científico: **Professor Jorge**. Ainda me surpreendo com todo o seu conhecimento sobre os mais variados assuntos. Acho admirável toda o seu esforço em divulgar ciência e em lutar pelas injustiças. Sempre serei muito grata por todas os conselhos e oportunidades que me deste.

Agradeço ao **Lucas**, pela confiança e por estar sempre disponível a ajudar. O carinho que tenho por você é muito grande, o considero um irmão mais velho, com o qual sempre me aconselhei e no qual muitas vezes me espelhei. Admiro a sua determinação.

Agradeço à pessoa que sempre cuidou de mim, que me adotou como uma filha, a **Dona Zelma**. Adorava chegar cedo no laboratório para poder tomar café e conversar com a senhora. Se essa tese chegou ao fim, foi graças a toda a sua dedicação a esse laboratório e aos animais.

Às pessoas que já não estão mais no laboratório, mas que foram parte dele por muitos anos, amigos que tenho muito carinho: **Flávia, Querusche, Johanna, Fabiana, Josué e Rodrigo**. Aos que fizeram parte por menos tempo, mas aos quais sou grata: **Adriano e Pablo**.

Agradeço também às pessoas que estão no laboratório no presente momento e o tornam um lugar agradável: **Krislei, Fernanda, Stephanie, Kétlyn, Bruno, Mateus, Jadier, Rossana, Mirelle e Ana**.

Às amigas que a Neuro me deu, **Rossana, Bruna e Marina**. Estamos juntas nessa caminhada desde o mestrado. Agradeço principalmente a **Rossana** que nunca mede esforços para ajudar à todos que precisam. É uma amiga como poucas.

Agradeço aos amigos que a Biologia me trouxe e que estiveram presentes em muitos momentos importantes: **Liana, Ivi, Elisa, Charles, Marcus e Thiago**.

Agradeço ao **Professor Brian** pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório e por ter me ensinado muito no ano que lá estive. Agradeço aos colegas do laboratório, principalmente a **Jamie** e a **Anahita**. Da mesma forma agradeço a **Jalina, Yusuke, Kyle** e **Jake** pelo bom convívio. Agradeço por todas as amizades e ensinamentos que o doutorado sanduíche me proporcionou.

Agradeço a todo o ensino que recebi ao longo da minha carreira, sendo sempre em instituições públicas.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento no Brasil e no exterior.

À IBRO e a SfN pelas oportunidades de aperfeiçoamento profissional.

E, finalmente, mas não menos importante, agradeço a todos os animais que proporcionaram responder as perguntas desse estudo.

EPÍGRAFE

*There are many hypotheses in science which are wrong.
That's perfectly all right: it's the aperture to finding out what's right.
Science is a self-correcting process.*

Carl Sagan

RESUMO

A formação de memórias de medo contextuais, como as estudadas no presente trabalho, requer a indução da plasticidade sináptica iniciada pela ativação de receptores transmembrana localizados nos neurônios de estruturas encefálicas como o hipocampo. O fluxo iônico mediado pelos receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) é essencial para ativar vias de sinalização intracelular que darão suporte à formação da memória. No entanto, esses receptores parecem não ser necessários em situações onde os animais passaram por uma experiência prévia similar a que está sendo aprendida. Dessa forma, um aprendizado anterior pode modificar os mecanismos de plasticidade que serão utilizados para codificar uma nova informação, caracterizando um fenômeno de metaplasticidade. Esse fenômeno ocorre quando os animais são pré-expostos ao local onde posteriormente serão submetidos a um aprendizado associativo ou quando são re-submetidos a mesma tarefa comportamental com dicas contextuais/espaciais diferentes. No presente trabalho, investigamos (i) os mecanismos de plasticidade sináptica (receptores) e de plasticidade não-sináptica (excitabilidade neuronal) recrutados para a formação do segundo aprendizado e (ii) se a independência dos NMDARs é mantida quando a memória anterior foi adquirida remotamente.

Os animais utilizados nesse trabalho (camundongos ou ratos) foram expostos a dois aprendizados sequenciais realizados na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC). O intervalo entre os condicionamentos foi de dois dias nos experimentos do Capítulo I e de três ou quarenta dias nos experimentos do Capítulo II. Cada aprendizado ocorreu em uma caixa de condicionamento com características próprias de formato, odor e iluminação (contexto A ou contexto B), sendo que o primeiro aprendizado ocorreu no contexto A e o segundo no contexto B.

Nos experimentos do Capítulo I foram avaliadas no hipocampo dorsal as modificações na excitabilidade neuronal hipocampal induzidas pelo primeiro condicionamento, bem como os receptores envolvidos com a aquisição da memória subsequente e a sobreposição neuronal entre os dois aprendizados. Com a utilização do camundongo transgênico Teg-Tag foi possível identificar os neurônios recrutados para o primeiro aprendizado. Esse animal tem a expressão da proteína fluorescente verde (GFP, do inglês, *green fluorescent protein*) controlada pela ativação do gene *c-fos*, que é fisiologicamente transcrito após a atividade neuronal. Dessa forma, os neurônios ativados pelo aprendizado são marcados com GFP. Através da técnica de *patch clamp* foi observado que os neurônios GFP+ mantiveram a excitabilidade elevada por até dois dias após o treinamento no CAC. Além disso, a identificação dos neurônios recrutados

para o aprendizado subsequente foi realizada através da marcação imunofluorescente da proteína Fos, no seu pico de expressão endógena, noventa minutos após o re-treino. Foi observada uma maior sobreposição neuronal (GFP+, Fos+) quando os animais foram re-treinados no mesmo contexto dois dias após o primeiro treino. Uma sobreposição intermediária (GFP+, Fos+) foi vista quando os animais tiveram o segundo condicionamento no contexto B, sendo ela significativamente maior do que a sobreposição nos animais não re-treinados. Adicionalmente, foi demonstrado que a aquisição do aprendizado subsequente é mediada por receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluRs) ao invés de NMDARs.

No Capítulo II foi investigado se uma memória remota, adquirida há quarenta dias, ainda seria capaz de influenciar nos mecanismos de plasticidade recrutados para aquisição do aprendizado subsequente. A dinâmica da consolidação sistêmica foi considerada nesses experimentos já que a evocação da memória remota passa a depender de estruturas encefálicas neocorticais, sem recrutar a atividade hipocampal. Apesar da evocação da memória remota não requerer a atividade hipocampal, foi observado que a aquisição do aprendizado subsequente a uma memória remota necessita a atividade de pelo menos uma sub-região do hipocampo (dorsal ou ventral). Complementarmente, os resultados indicaram que, quando o intervalo entre os aprendizados é aumentado (de três para quarenta dias), a formação do aprendizado subsequente, que era independente de NMDARs, volta a depender da plasticidade sináptica mediada por esses receptores no hipocampo (dorsal e ventral).

Juntos, nossos resultados sugerem que o primeiro aprendizado causa um aumento da excitabilidade neuronal e modifica a plasticidade sináptica recrutada para o aprendizado subsequente, sendo este último mediado por mGluRs ao invés de NMDARs. Além disso, a metaplasticidade induzida pelo primeiro condicionamento é transiente; quando o intervalo entre as exposições é aumentado, o segundo aprendizado passa a depender novamente da ativação dos NMDARs.

PALAVRAS-CHAVE: aprendizados subsequentes, NMDAR, mGluR, hipocampo, córtex cingulado anterior, metaplasticidade

ABSTRACT

Contextual fear memory formation, like the ones explored in the current work, requires the induction of the synaptic plasticity mediated by the activation of transmembrane receptors that are present in the brain structures as the hippocampus. The ionic flux through the N-methyl-aspartate-D-aspartate is crucial for activation of the intracellular signaling pathways that will support memory formation. However, these receptors are not necessary when animals had a prior similar learning. In this way, a previous learning can modify the plasticity mechanism that will be recruited to encode a new information, featuring a metaplasticity phenomenon. This phenomenon occurs when animals are pre-exposed to an environment where they will learn an associative learning later or when animals are re-exposed to the same behavioral task with distinct contextual/spatial cues. In the present study, we investigated (i) the synaptic plasticity mechanisms (receptors) and the non-synaptic plasticity mechanisms (neuronal excitability) required for the acquisition of the second learning and (ii) whether a subsequent learning that occurs in a remote time-point is still NMDAR-independent.

The animals used in this study (mice or rats) were exposed to two sequential learnings that were performed in the contextual fear conditioning (CFC). The interval between conditionings were two days in the experiments of Chapter I and three or forty days in the experiments of the Chapter II. Each learning was performed in a box with differences on shape, odor and illumination (context A or context B). The first learning occurred in the context A followed by learning on context B.

In the experiments of Chapter I it was evaluated the changes in the hippocampal neuronal excitability induced by the first conditioning, the receptors involved with the acquisition of the subsequent memory and the neuronal overlapping between the two sequential learnings. The Teg-Tag transgenic mouse allowed to identify the neurons activated for the first learning experience. This animal has the GFP expression under control of c-fos promoter that is activated by neuronal activity. It was shown by patch clamp that GFP+ neurons are still more excitable two days after learning. Also, the identification of neurons recruited for the subsequent learning was made through immunofluorescent staining of the Fos protein in its peak of endogenous expression, ninety minutes after learning. A greater overlapping (GFP+, Fos+) was observed when animals were retrained in the same context two days after first training. An intermediate overlapping was observed when animals were conditioned in the context B and this expression was significantly higher when compared to animals that were not

retrained in either context. Additionally, it was shown that acquisition of the subsequent learning is mediated by metabotropic glutamate receptors (mGluRs) instead of NMDARs

In the Chapter II it was investigated whether a remote memory, acquired forty days earlier, is still able to influence in the synaptic plasticity mechanisms recruited for the acquisition of the subsequent learning. Systems consolidation dynamics was considered in these experiments because memory retrieval of a remote memory depends on neocortical brain regions, it not requires hippocampal activity. It was confirmed that hippocampus is not necessary for remote memory retrieval, however at least one longitudinal division of the hippocampus (dorsal or ventral) is essential for learning following a prior remote memory. Moreover, the results indicate that acquisition of the second learning is once again mediated by NMDARs in the hippocampus when the interval between learnings is extended from three to forty days.

Altogether, our results suggest that the first learning lead to an increase in the neuronal excitability and modify the synaptic plasticity mechanism recruited for following learning, mGluR are required instead of NMDAR. Furthermore, the metaplasticity induced by first conditioning is transient; the second learning once again requires NMDARs activation when the interval between learnings is longer.

KEY-WORDS: subsequent learning, NMDAR, mGluR, hippocampus, anterior cingulate cortex, metaplasticity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vias de sinalização envolvidas com a formação da memória.....	18
Figura 2 – Imagem representativa da marcação imunofluorescente da proteína Fos no corpo celular de neurônios da camada piramidal de CA1.....	19
Figura 3 – Dinâmica da consolidação sistêmica da memória.....	20
Figura 4 – Representação da atividade hipocampal durante a evocação de uma memória recente (a), remota (b) ou em um teste de discriminação contextual 25 dias após a aquisição da memória.....	22
Figura 5 – Estruturas encefálicas envolvidas com a formação da memória de medo.....	24
Figura 6 – Desenho esquemático representando o eixo longitudinal do hipocampo e o circuito trissináptico hipocampal.....	25
Figura 7 – Quadro esquemático representado os tipos de receptores glutamatérgicos, suas subunidades e vias de sinalização.....	27
Figura 8 – Representação esquemática de como a metaplasticidade influencia a indução da plasticidade sináptica subsequente e como diferentes fatores atuam no momento de indução da plasticidade sináptica.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPAR	a-amino-3-hydroxy- 5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
AP5	(2R)-amino-5-phosphonopentanoate
BLA	basolateral amygdala
CA	do grego, Cornu Ammonis
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CaM	calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ /CaM-dependent kinases
CE	central amygdala
CFC	contextual fear conditioning
CI-AMPAR	calcium impermeable AMPAR
CP-AMPAR	calcium permeable AMPAR
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein
CS	conditioned stimulus
DAG	diacylglycerol
DG	dentate gyrus
ERK	extracellular-signal-regulated-kinase
Gi	proteína G inibitória
Gq	proteínas G estimulatória
HFS	high frequency stimulation
IEG	immediate early genes
iGluRs	ionotropic glutamate receptors
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
KAR	kainate receptor
LFS	low frequency stimulation
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
mGluRs	metabotropic glutamate receptors
MTT	multiples traces theory
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
PKC	protein kinase C
PLC	fosfolipase C
SCT	standard consolidation theory
STDP	spike-timing dependent plasticity
TGRA	temporally-graded retrograde amnesia
US	unconditioned stimulus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Memória.....	15
1.1.1. Definição e classificação.....	15
1.1.2. Formação da memória.....	16
1.1.3. Consolidação da memória.....	17
1.1.4. Consolidação sistêmica.....	19
1.1.5. Memória de medo	22
1.2. Anatomia e circuitaria hipocampal	24
1.3. Receptores glutamatérgicos	26
1.4. Plasticidade Hebbiana.....	28
1.5. Plasticidade homeostática e metaplasticidade	29
1.6. Aquisição de memórias independentes de NMDARs.....	31
1.6.1. Capítulo I	33
1.6.2. Capítulo II	33
2. OBJETIVOS GERAIS.....	34
2.1. Objetivos específicos do capítulo I.....	34
2.2. Objetivos específicos do capítulo II.....	35
3. CAPÍTULO I	36
4. CAPÍTULO II	37
5. DISCUSSÃO GERAL	38
5.1. Quais seriam os receptores candidatos a mediar a plasticidade sináptica no lugar dos NMDARs?	39
5.1.1. Subunidades dos NMDAR.....	43
5.2. Importância da excitabilidade neuronal para formação da memória	43
5.2.1. Sobreposição neuronal	45
5.3. Consolidação sistêmica da memória.....	46
5.3.1. Papel do hipocampo ventral e do córtex cingulado anterior na consolidação sistêmica.....	47
5.4. Estruturas envolvidas com a formação do aprendizado subsequente a uma memória remota	47
5.5. Papel dos NMDARs no aprendizado subsequente a uma memória remota.....	49
5.5.1. Reconsolidação	50
5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6. CONCLUSÕES	52
6.1. Capítulo I	52
6.2. Capítulo II	53

7. PERSPECTIVAS.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9. APÊNDICE.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória

1.1.1. Definição e classificação

Num sentido amplo, a memória pode ser definida como a capacidade de armazenar e acessar futuramente as informações. Semon foi o cientista que definiu a existência desses dois aspectos básicos da memória, ainda no início do século XX. Apesar de já se discutir naquela época a existência do 'traço da memória', a maioria dos estudiosos focavam sobre o processo de aprendizado e armazenamento, mas não sobre o lembrar (evocar). Nesse sentido, a teoria de Semon foi inovadora. Ele postulava a existência do engrama e da ecfória (do inglês, *ecphory*). Enquanto o engrama compreenderia o substrato fisiológico onde a informação é armazenada, a ecfória seria relativa ao processo de evocação, onde o engrama sairia do seu estado latente. Dessa forma, a memória emergiria da interação entre o que foi armazenado (engrama) e as dicas que levariam ao processo de evocação (ecfória). Apesar desses termos terem sido cunhados por Semon, a popularização do termo engrama foi impulsionada pelos trabalhos de Lashley. Em busca de tentar compreender onde a memória estava armazenada, Lashley concluiu que ela encontrava-se difusa por todo o encéfalo, já que o aumento da extensão das lesões encefálicas em roedores causava prejuízos proporcionalmente maiores, independentemente de onde as lesões fossem realizadas (Josselyn *et al*, 2015a).

Nessa mesma época, os neurocirurgiões Penfield e Rasmussen obtiveram as primeiras evidências de que memórias poderiam estar localizadas em regiões específicas. Eles observaram, em procedimentos pré-cirúrgicos realizados para determinar a região geradora das crises epiléticas, que estimulações elétricas aplicadas no lobo temporal eram suficientes para induzir a recordação de memórias vívidas. Um estudo de caso especialmente importante para determinar a necessidade do lobo temporal na formação e evocação das memórias, foi o do paciente Henry Molaison (H.M.). Ele desenvolveu epilepsia refratária a medicamentos após um acidente na infância e suas crises intensificaram-se ao longo dos anos, levando os médicos (Scoville e Milner) a optarem pela ressecção bilateral da região geradora das crises, que incluiu o hipocampo e áreas adjacentes do lobo temporal medial. Depois da cirurgia, o paciente apresentou melhora do quadro clínico, mas como efeito colateral foi observado um grande prejuízo na formação de novas memórias (amnésia anterógrada), além de amnésia retrógrada para memórias recentes, mantendo-se apenas as memórias de procedimentos.

A observação de que a ressecção de diferentes estruturas encefálicas prejudicava memórias de diferentes modalidades, foi uma das responsáveis pelo desenvolvimento de uma classificação para os diferentes tipos de memória. Na classificação, são levadas em consideração principalmente (i) a natureza das informações que as memórias codificam e (ii) o tempo que elas perduram.

Quanto à natureza das informações, as memórias são usualmente classificadas em (i) explícitas ou declarativas e (ii) implícitas ou procedurais. As memórias explícitas são facilmente formadas, mas também facilmente esquecidas; são conscientemente lembradas e, em humanos, declaradas verbalmente. Já as memórias implícitas requerem uma formação gradual, mas dificilmente são esquecidas; elas são consideradas difíceis de declarar, já que são relacionadas a habilidades motoras ou hábitos. Memórias da categoria explícita são dependentes de estruturas como o hipocampo e o neocórtex. Já memórias implícitas requerem a atividade de estruturas como o cerebelo e os núcleos da base (Kandel *et al*, 2014). Importante ressaltar que, apesar da classificação facilitar o estudo e o entendimento, uma memória pode possuir tanto componentes explícitos como implícitos, recrutando a atividade conjunta das estruturas encefálicas subjacentes a cada tipo de memória.

Quanto ao tempo, algumas memórias adquiridas podem ser momentâneas, enquanto outras podem perdurar décadas (Dudai and Morris, 2013; Kandel *et al*, 2014; Katche *et al*, 2013). Um dos principais fatores modulatórios da durabilidade da memória é o caráter emocional atribuído a situação que o animal está vivenciando. Dependendo da relevância inferida, a probabilidade desse evento ser armazenado no sistema nervoso vai variar, podendo ou não estabelecer um traço de memória e, se estabelecido, o traço pode ser efêmero ou duradouro (Ploski and McIntyre, 2015). A memória de trabalho é o tipo menos durável, persistindo apenas de segundos a minutos. A memória de curta duração dura de minutos a horas. Já as memórias de longa duração chegam a persistir por várias horas, dias ou anos. Genericamente, a memória de trabalho pode ser sustentada por estruturas como o córtex pré-frontal, já memórias de curta e de longa duração podem ser mantidas pelo hipocampo (Kandel *et al*, 2000).

1.1.2. Formação da memória

A formação da memória costuma ser dividida em duas fases. A aquisição, em que as informações consideradas relevantes são codificadas pelo sistema nervoso central, e a

consolidação, onde o traço da memória passa por um processo de estabilização, ficando resistente a interferências. Os mecanismos moleculares subjacentes às diferentes fases da memória são distintos e muitos deles foram estudados através de manipulações farmacológicas em variados momentos entre o treino (aprendizado) e o teste (evocação). Diz-se que um fármaco interfere na aquisição quando ele é administrado antes do aprendizado, afetando ambas as memórias de curta e longa duração. Quando o fármaco é administrado antes ou após o treino e não tem efeito na memória de curta duração, interferindo apenas na de longa, é dito que ele está agindo sob a consolidação da memória (Johansen *et al*, 2011).

1.1.3. Consolidação da memória

O termo consolidação foi cunhado por Muller and Pilzecker no final do século XVIII. A consolidação costuma ser dividida em sináptica e sistêmica. A primeira estabiliza as conexões dos circuitos locais (Dudai, 2004; Kandel and Pittenger, 1999) ao passo que a última é um processo de reorganização gradual das regiões encefálicas que sustentam a memória (Dash *et al*, 2004; Debiec *et al*, 2002; Frankland and Bontempi, 2005; Nadel and Moscovitch, 1997).

Acredita-se que a janela da consolidação sináptica dure cerca de 6 horas (Izquierdo *et al*, 2006; De Oliveira Alvares *et al*, 2008), podendo ser modificada por fatores como aversividade (Casagrande *et al*, 2018). Após o término da consolidação sináptica, a memória deixa de ser suscetível a interferências e é dita consolidada. Uma série de mecanismos moleculares e celulares, como ativação de segundos mensageiros, expressão gênica, síntese proteica e remodelamento sináptico são desencadeados pela consolidação sináptica (Johansen *et al*, 2011). Muitos desses mecanismos são dependentes da ativação de receptores NMDA (do inglês, *N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDAR) e são semelhantes aos observados durante o fenômeno de potenciação de longa duração (LTP, do inglês, *long-term potentiation*) (Kandel *et al*, 2014), que será melhor explicado adiante.

Os NMDARs são considerados detectores de coincidência porque são ativados quando existe atividade pré-sináptica juntamente com despolarização pós-sináptica. A abertura deles permite a entrada de cálcio, este atua como segundo mensageiro de diversas vias de sinalização intracelular importantes para a plasticidade sináptica e para a formação da memória (Malenka and Nicoll, 1999). O aumento do cálcio intracelular leva a fosforilação da CaMKII (do inglês, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) (Kandel, 2012), que pode alterar o tráfego de

receptores AMPA (do inglês, *a-amino-3-hydroxy- 5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPAR) nos espinhos dendríticos, além de induzir a fosforilação de subunidades específicas desse receptor, levando ao aumento a força sináptica (Malinow and Malenka, 2002). O aumento do Ca^{2+} e/ou a ativação da CaMKII induz a atividade de cinases como a PKA (do inglês, *protein kinase A*), PKC (do inglês, *protein kinase C*) e MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*). A MAPK pode ser ativada direta ou indiretamente pela PKA, PKC e CaMKII (Kandel, 2012; Kandel *et al*, 2000). Outra cinase que parece ser muito importante para a persistência da memória é a PKM ξ (do inglês, *protein kinase M zeta*), uma isoforma da PKC. Ela é responsável por manter as subunidades GluA2 do AMPAR na sinapse. Essas subunidades influenciam a permeabilidade do AMPAR, quando elas estão presentes o receptor é impermeável ao Ca^{2+} , sendo esse o possível motivo pelo qual as memórias ficam mais estáveis e persistem por mais tempo (Sacktor, 2008). Diversos estudos têm demonstrado que a síntese de RNA e de proteínas também são muito importantes para a formação da memória de longa duração (Davis and Squire, 1984; Hernandez and Abel, 2008; McGaugh, 2000). Igualmente importantes são os fatores de transcrição, como o CREB (do inglês, *cAMP responsive element binding protein*). O CREB pode ser fosforilado por todas as cinases supracitas, promovendo a transcrição de genes dependentes de CRE (do inglês, *cAMP responsive element*) que estão relacionados à plasticidade (Alberini, 2009) (**Figura 1**).

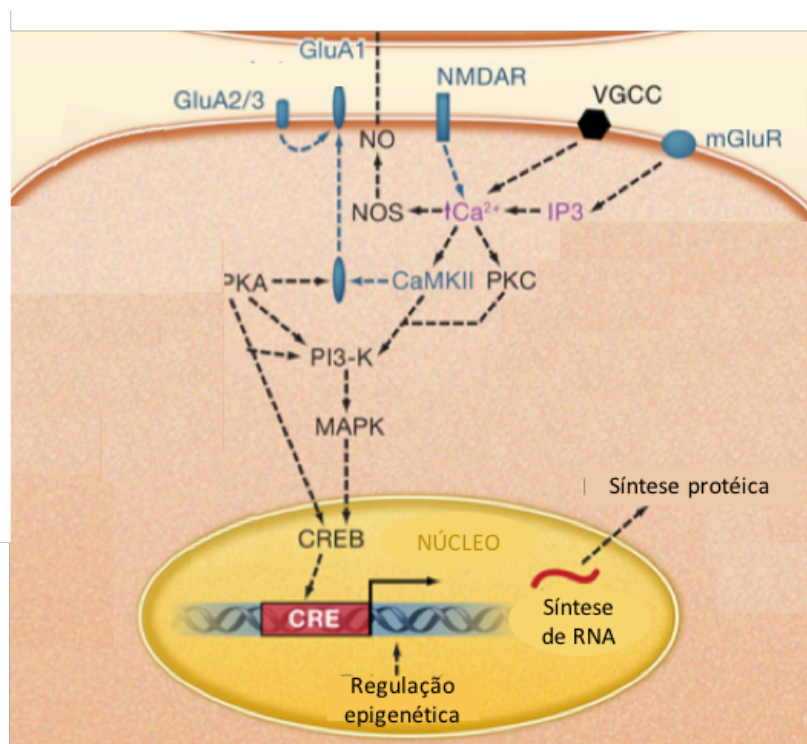


Figura 1 – Vias de sinalização envolvidas com a formação da memória. Modificada de Johansen et al., 2011.

Genes de expressão imediata

Em resposta à atividade sináptica e, conseqüente, atividade neuronal, alguns genes são rapidamente ativados, os chamados genes de expressão imediata (do inglês, *immediate early genes*, IEG). A expressão deles tem um pico em torno de trinta a sessenta minutos após o aprendizado e é reduzida aproximadamente aos cento e vinte minutos (Cullinan et al, 1995). Esses genes podem ser induzidos por cAMP (do inglês, *cycli adenosine monophosphate*) e Ca^{2+} , por exemplo. O mediador chave no controle da expressão dos IEGs é o CREB, ele medeia a ativação transcricional do sítio CRE que está presente na região promotora de quase todos os genes de expressão imediata, incluindo *c-fos*, BDNF, *egr-1* (ou *zif268*), *homer1a/ves11s* e *Arc* (Okuno, 2011). Tanto o mRNA quanto a proteína, essa última com pico de expressão entre sessenta e noventa minutos após o aprendizado (Zangenehpour and Chaudhuri, 2002), são comumente usados como correlatos de atividade neuronal recente (Guzowski *et al*, 2001). No presente trabalho, a marcação imunofluorescente da proteína Fos foi utilizada para quantificar os neurônios recentemente ativados (**Figura 2**).

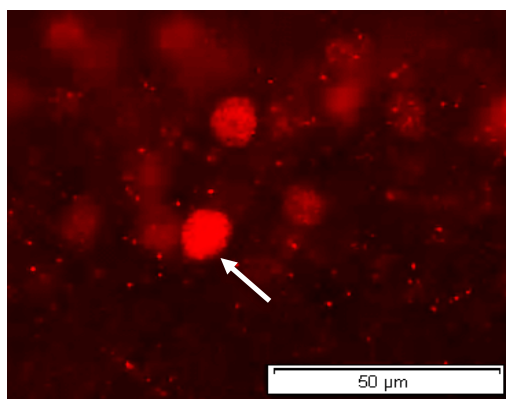


Figura 2 – Imagem representativa da marcação imunofluorescente da proteína Fos no corpo celular de neurônios da camada piramidal de CA1. A seta indica um corpo celular com a marcação bem evidente.

Além das modificações moleculares, a formação da memória também pode causar modificações estruturais, como alterações na densidade e morfologia dos espinhos dendríticos (Kitanishi *et al*, 2009; Matsuzaki *et al*, 2004; Sanders *et al*, 2012), que não serão aprofundadas aqui.

1.1.4. Consolidação sistêmica

Algumas teorias têm sido propostas para tentar explicar a reorganização das regiões encefálicas que sustentam a memória. A teoria padrão da consolidação sistêmica (do inglês,

standard consolidation theory, SCT) foi a primeira a surgir. Ela é embasada principalmente na observação de pacientes que após sofrerem algum dano cerebral apresentavam amnésia retrógrada para eventos recentes (do inglês, *temporally-graded retrograde amnesia*, TGRA) (Kritchevsky and Squire, 1989). A SCT prediz que as memórias se tornam independentes do hipocampo ao longo do tempo (Squire and Alvarez, 1995; Squire and Zola, 1998). Durante o aprendizado aconteceriam modificações sinápticas rápidas no hipocampo e modificações lentas no neocórtex. A reativação dos circuitos hipocampais fortaleceria as conexões hipocampo-corticais e, com o passar do tempo, as conexões cortico-corticais passariam a sustentar a memória (McClelland *et al*, 1995; Squire and Alvarez, 1995). Essa teoria também obteve bastante sustentação em estudos com modelos animais, onde lesões ou inativação hipocampal causavam amnésia retrógrada apenas para eventos recentes (Barry *et al*, 2016; Broadbent and Clark, 2013; Kim and Fanselow, 1992; Sierra *et al*, 2017; Tayler and Wiltgen, 2013). Dessa forma, segundo a SCT, o hipocampo agiria como um local de armazenamento temporário da memória, sendo as regiões neocorticais o repositório final (**Figura 3**).

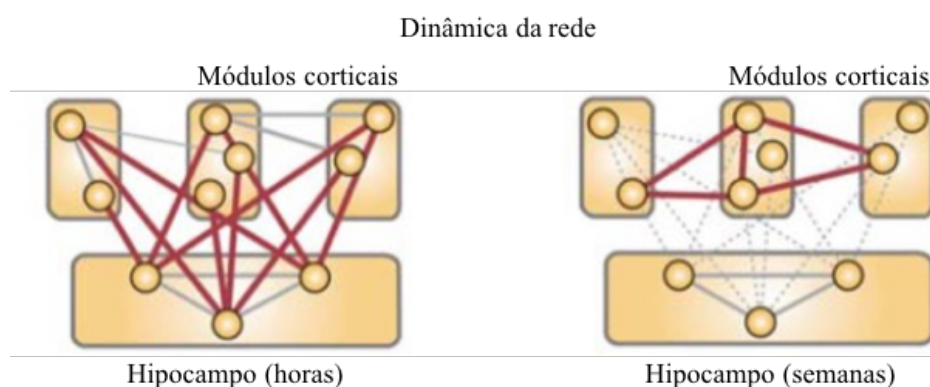


Figura 3 – Dinâmica da consolidação sistêmica da memória. Adaptada de Frankland & Bontempi, 2005.

Uma ideia diferente foi proposta por Nadel and Moscovitch (1997), chamada de teoria dos múltiplos traços (do inglês, *multiple traces theory*, MTT). A MTT diferencia as memórias em episódicas (detalhadas) ou semânticas (generalizadas), postulando que as memórias episódicas são sempre dependentes do hipocampo. Então, o grau de envolvimento hipocampal não seria determinado pela idade da memória, mas sim pelo tipo da memória que está sendo avaliado (semântica ou episódica) e pela extensão da lesão hipocampal. A ideia da extensão é embasada em estudos com pacientes que apresentam amnésia retrógrada, onde lesões maiores ocasionam déficits mais pronunciados de memória. Do ponto de vista dessa teoria, lesões hipocampais incompletas afetam preferencialmente memórias recentes porque elas são mais

fracas (menos estáveis), já lesões completas levam a eliminação de ambas as memórias recentes e remotas (Nadel and Moscovitch, 1997).

Recentemente, baseado na natureza qualitativa da memória, Winocur propôs uma nova teoria, a da transformação da memória (Winocur *et al*, 2007). Ela sugere que a modificação das estruturas que suportam a memória ao longo do tempo é acompanhada por modificações correspondentes na qualidade da memória. Dessa forma, a independência hipocampal faria com que uma memória detalhada se tornasse generalizada e dependente de estruturas corticais (Winocur and Moscovitch, 2011).

A discussão entre essas teorias ainda é atual e todas elas possuem evidências experimentais que as sustentam. Numerosos estudos em modelos animais têm demonstrado o papel temporário do hipocampo na evocação da memória. Como ilustrado na figura, Kim and Fanselow, 1992 demonstraram que lesões hipocampais causavam déficit na evocação da memória quando o teste era realizado poucos dias (1, 7 e 14) após o aprendizado, mas não quando era realizado em períodos mais remotos (28 dias). Outros estudos que lesionaram ou inativaram farmacologicamente o hipocampo, utilizando diferentes tarefas comportamentais, também demonstraram esse mesmo gradiente temporal. A evocação da memória era inicialmente dependente do hipocampo e com o passar do tempo tornava-se dependente de estruturas corticais (Anagnostaras *et al*, 1999; Haubrich *et al*, 2016; de Oliveira Alvares *et al*, 2012; Pedraza *et al*, 2017a; Sierra *et al*, 2017; Tayler and Wiltgen, 2013).

As estruturas envolvidas com evocação de memórias recentes e remotas também foram avaliadas através da marcação de genes de expressão imediata (Frankland, 2004; Maviel, 2004) ou medidas de atividade metabólica (Bontempi *et al*, 1999) em estudos com roedores. Como pode ser visualizado na **Figura 4**, o hipocampo está mais ativo (cores vermelha e amarela) quando a memória é evocada 5 dias após a aquisição (Figura 4a), estando menos ativo quando uma memória remota (25 dias após) é evocada (Figura 4b); o hipocampo volta a ser mais ativado quando um teste de discriminação contextual é realizado em um período remoto (Figura 4c) (Bontempi *et al*, 1999). Isso reforça a ideia que memórias recentes (Figura 4a) e ricas em detalhes (Figura 4c) dependem do hipocampo para serem evocadas. Adicionalmente, foi demonstrado que anormalidades dos mecanismos de plasticidade do córtex pré-frontal prejudicam a reorganização estrutural da memória, prejudicando a consolidação sistêmica (Frankland *et al*, 2001; Hayashi *et al*, 2004) .

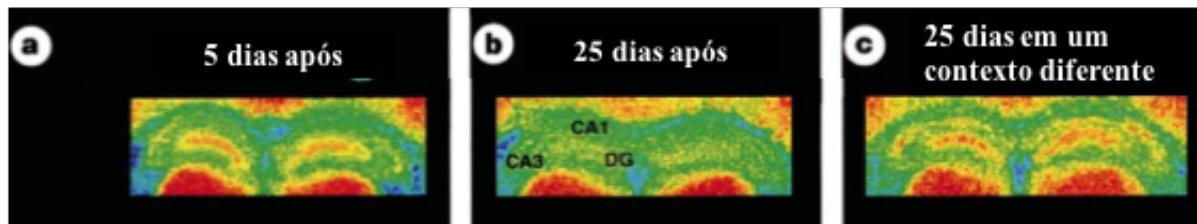


Figura 4 – Representação da atividade hipocampal durante a evocação de uma memória recente (a), remota (b) ou um teste de discriminação contextual 25 dias após a aquisição da memória. As cores vermelha e amarela representam áreas com maior ativação e as cores azul e verde representam regiões que estão sendo menos ativadas. Significado das abreviaturas: CA1: região 1 do *Cornu Ammonis* hipocampal; CA3: região 3 do *Cornu Ammonis* hipocampal; DG: giro denteado. Figura adaptada de Bontempi et al., 1999

Por outro lado, alguns estudos sugerem que o hipocampo continua sendo recrutado para a evocação de memórias remotas (Broadbent and Clark, 2013; Lehman and Malmberg, 2013) e espaciais (Clark *et al*, 2005; Martin *et al*, 2005; Winocur, 1984; Winocur *et al*, 2005). Também ainda está sob discussão se o grau de aversividade da memória alteraria a dinâmica (isto é, velocidade) com que uma memória se torna independente do hipocampo (Lehman and Malmberg, 2013; Pedraza *et al*, 2017b).

É importante ressaltar que o tipo de memória (contextual ou não) que está sendo avaliado possivelmente influencia o recrutamento do hipocampo. Dessa forma, a teoria da transformação parece se encaixar melhor nos resultados divergentes obtidos até agora. Memórias contextualmente ricas sempre requereriam o hipocampo para serem evocadas, ao passo que memórias com poucos detalhes seriam dependentes de estruturas corticais (Winocur *et al*, 2007; Winocur and Moscovitch, 2011).

Importante mencionar também que durante períodos de repouso e sono é observado a reativação (do inglês, *replay*) dos circuitos neuronais recrutado para o aprendizado. A interferência dessas reativações causa tanto déficits na consolidação sináptica quanto na sistêmica, sugerindo que elas são necessárias para os processos de consolidação (Foster and Wilson, 2006; Nádasdy *et al*, 1999; Wilson and McNaughton, 1994).

1.1.5. Memória de medo

Dentre as diferentes memórias (contextuais, espaciais, de procedimento, etc), a memória de medo é o tipo mais bem estudado. A indução da formação de uma memória de medo é realizada experimentalmente utilizando-se uma tarefa comportamental que envolve um

estímulo aversivo bastante pronunciado, como um choque. A principal vantagem da utilização desse tipo de tarefas é a formação de uma memória duradoura com apenas uma sessão de condicionamento (Curzon *et al*, 2009). Quanto ao tipo de condicionamento, podem ser utilizados tanto o (i) clássico, como o (ii) instrumental. No condicionamento clássico, o animal aprende a associar um estímulo considerado neutro, o estímulo condicionado (do inglês, *conditioned stimulus*, CS), com outro estímulo, aversivo ou apetitivo, que por si só gera uma resposta comportamental, chamado de estímulo incondicionado (do inglês, *unconditioned stimulus*, US). Quando novamente exposto ao CS, o animal gera uma resposta condicionada a esse estímulo, que só é expressa na presença dele. Já no condicionamento instrumental, o animal aprende a reforçar ou inibir um comportamento pela associação dele à um US (Izquierdo *et al*, 2016).

As tarefas comportamentais a que os animais são usualmente expostos durante os experimentos possuem graus diferentes de aversividade. Algumas delas podem gerar ansiedade e estresse, mas não necessariamente medo. O simples fato de um animal ser exposto a um ambiente novo, como na habituação ao campo aberto, pode causar neofobia e, conseqüentemente, um certo grau de ansiedade. Quando são expostos pela primeira vez ao labirinto aquático, além da neofobia, a água também pode atuar como um estímulo estressor, aumentando assim o grau de aversividade da tarefa. Nesse mesmo *continuum*, tarefas onde um choque elétrico é aplicado nas patas do animal, aumentam ainda mais o grau de aversividade, desencadeando respostas características do comportamento de medo, como a imobilidade ou congelamento (do inglês, *freezing*) (LeDoux, 2014) .

A formação do aprendizado de medo envolve uma circuitaria complexa, requerendo a atividade conjunta de diversas estruturas encefálicas. Na figura 5, está representado, de forma geral, o circuito envolvido na formação da memória de medo de um condicionamento clássico. O hipocampo dorsal, a amígdala basolateral (BLA) e lateral (LA) são essenciais para a codificação e armazenamento das memórias de medo, sendo muito importante as conexões bidirecionais entre essas estruturas (PITKÄNEN *et al*, 2006). A principal forma de entrada e de saída de informações do hipocampo acontece através do córtex entorrinal. Este, por sua vez, manda projeções para outras regiões corticais que estão envolvidas nos mecanismos de controle da atividade do hipocampo e da amígdala; dentre elas ressaltam-se algumas subáreas do córtex medial pré-frontal, como: o córtex cingulado anterior, o córtex pré-límbico e o córtex infralímbico. No complexo amigdalóide, ou amígdala, as informações processadas na BLA são enviadas para a amígdala central (CE), que é um dos núcleos de saída dessa estrutura encefálica

(Izquierdo *et al.*, 2016). A CE projeta-se (i) para o córtex medial pré-frontal, envolvido com a formação da memória, (ii) para os núcleos do hipotálamo lateral, que são encarregados pelo componente simpático da resposta de medo, e (iii) para a substância cinzenta periaquedutal, que é responsável pela resposta comportamental de imobilidade (LeDoux, 2007).

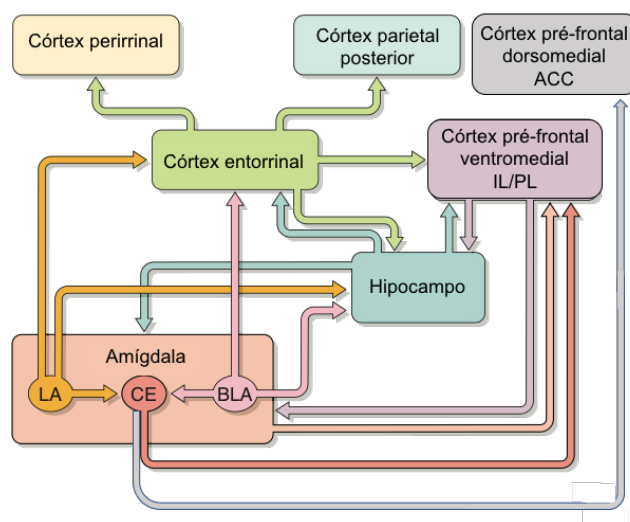


Figura 5 – Estruturas encefálicas envolvidas com a formação da memória de medo. Adaptado de Izquierdo *et al.*, 2016.

Contudo, existem algumas particularidades na circuitaria recrutada dependendo de qual estímulo é utilizado como condicionado. O hipocampo é principalmente recrutado no CAC, ao passo que na tarefa de condicionamento aversivo à dica (do inglês, *cue fear conditioning*, onde uma luz ou som é associado ao contexto) a LA parece ser essencial para a associação entre o CS e o US (Curzon *et al.*, 2009).

Nesse trabalho utilizamos unicamente a tarefa de CAC, explorando essencialmente os mecanismos de plasticidade recrutados para a formação da memória.

1.2. Anatomia e circuitaria hipocampal

Ao longo do eixo longitudinal hipocampal (ou eixo ântero-posterior) são encontradas diferenças na conectividade com outras estruturas, expressão gênica e funcionalidade (Strange *et al.*, 2014) (**Figura 5**, esquerda). O hipocampo dorsal, interliga-se principalmente com regiões encefálicas associadas com cognição, ao passo que o hipocampo ventral está mais associado a regiões que contribuem para as reações emocionais (Fanselow and Dong, 2010). Além disso, a região intermediária, entre o hipocampo dorsal e ventral, também pode ser diferenciada das

outras regiões. Estudos anatômicos e de expressão gênica (Thompson *et al*, 2008) sugerem que o hipocampo intermediário é funcionalmente mais parecido com o hipocampo dorsal (Ferbinteanu *et al*, 2006; Rudy and Matus-Amat, 2005). Alguns autores inclusive sugerem que experimentos farmacológicos demonstrando funções cognitivas similares entre o hipocampo dorsal e ventral podem ter atingido parte do hipocampo intermediário ao invés do ventral (Fanselow and Dong, 2010).

Apesar das diferenças funcionais entre o hipocampo dorsal, intermediário e ventral, a circuitaria trissináptica é encontrada ao longo de todo o eixo ântero-posterior. O circuito trissináptico hipocampal (**Figura 6**, direita) foi descrito, por volta de 1900, por Ramón y Cajal. De forma simplificada, os axônios de neurônios do EC entram no giro denteado (DG, do inglês, *dentate gyrus*) através da via perfurante, fazendo sinapse nas células granulares do DG, sendo essa considerada a primeira sinapse do circuito. Na sequência, os axônios das células granulares, chamados de fibras musgosas, fazem sinapses com as células piramidais da região CA3 (CA, do grego, *Cornu Ammonis*) do hipocampo (segunda sinapse). Esses neurônios projetam seus axônios através da colateral de Schaffer para as células piramidais da região CA1 (terceira sinapse). Os axônios de CA1 deixam o hipocampo e projetam-se principalmente para o subículo (Brady *et al*, 2012). É importante ressaltar que apesar de todas as sinapses supracitadas serem glutamatérgicas, entre as fibras musgosas e CA3 ocorre um tipo de plasticidade que é independente da ativação dos NMDARs, sendo o aumento da eficácia sináptica causado tanto por alterações pré-sinápticas quanto pós-sinápticas (Nicoll and Malenka, 1995). Dessa forma, pode ocorrer tanto plasticidade Hebbiana quanto não Hebbiana na sinapse entre as fibras musgosas e CA3 (Urban and Barrionuevo, 1996).

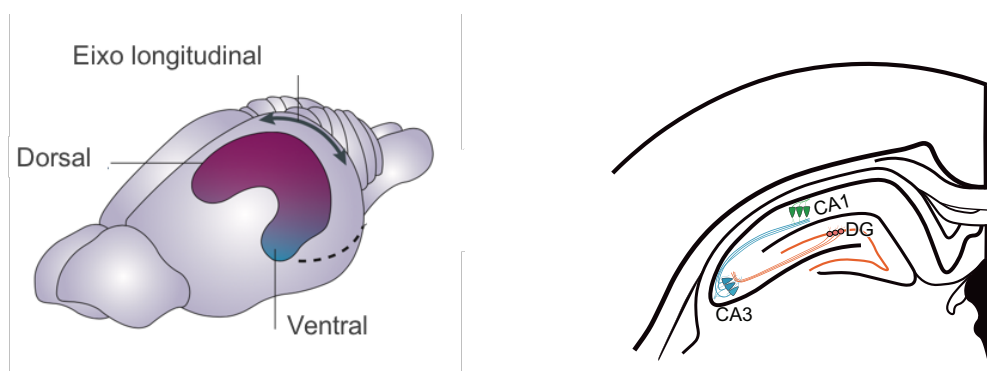


Figura 6 – Desenho esquemático representando o eixo longitudinal do hipocampo (esquerda) e o circuito trissináptico hipocampal (direita). Imagem à esquerda adaptada de Strange et al., 2014 e imagem à direita retirada de Izquierdo et al., 2016.

1.3. Receptores glutamatérgicos

A ação do glutamato ocorre através da sua ligação aos receptores glutamatérgicos, que dividem-se em ionotrópicos (do inglês, *ionotropic glutamate receptors*, iGluRs) e metabotrópicos (do inglês, *metabotropic glutamate receptors*, mGluRs). Classicamente, os iGluRs são canais iônicos, ao passo que os mGluRs são acoplados à proteína G.

Os iGluRs são tetraméricos, isto é, são formados pela junção de 4 subunidades individuais. A heterogeneidade das combinações de subunidades proporciona diferenças na funcionalidade dos receptores. Os iGluRs são divididos em três famílias: AMPAR, NMDAR e KAR (do inglês, *kainate receptor*). A importância dos receptores AMPA e NMDA são bem elucidadas na formação de memórias e nos fenômenos de plasticidade sináptica Hebbiana (Brown *et al*, 2010; Tse *et al*, 2011; Voglis and Tavernarakis, 2006). A ligação do glutamato nos receptores causa primeiramente a abertura dos AMPAR, permitindo a entrada de cátions que despolarizam parcialmente a membrana. Essa despolarização parcial também é responsável pela saída do íon Mg^{2+} que bloqueia o poro do receptor NMDA permitindo então a sua abertura, o que aumenta ainda mais a permeabilidade de cátions. A entrada do cálcio, principalmente pelos NMDARs, desencadeia a ativação de diversas vias de sinalização intracelular que estão envolvidas com os fenômenos plásticos que foram melhor detalhadas anteriormente (Kandel *et al*, 2000).

Os AMPARs são compostos por subunidade classificadas como GluA1-GluA4 (**Figura 6**). Eles normalmente são impermeáveis ao cálcio (do inglês, *calcium impermeable AMPAR*, CI-AMPA). Contudo, receptores que não contém a subunidade GluA2, passam a ser permeáveis (do inglês, *calcium permeable AMPAR*, CP-AMPA). Os CP-AMPA são expressos transientemente nos estados iniciais da plasticidade sináptica (Plant *et al*, 2006), sendo importantes para a indução desse tipo de plasticidade (Clem and Hugarir, 2010). Depois, eles são substituídos pelos CI-AMPA, que são importantes para a manutenção da plasticidade sináptica (Man, 2011).

Os receptores NMDA são compostos por subunidades que podem ser dos tipos GluN1, GluN2 e GluN3, sendo a GluN1 constitutiva. A subunidade GluN2 pode ser subdividida em A, B, C ou D e a subunidade GluN3 em A e B, como pode ser visto na figura 6 (Brady *et al*, 2012; Paoletti *et al*, 2013). Os NMDARs possuem pelo menos seis sítios de ligantes endógenos, sendo que o glutamato se liga na subunidade GluN2 e os co-agonistas (p.ex. glicina) nas subunidades GluN1 e GluN3 (Matt and Hell, 2014; Baez *et al.*, 2018). Para causar a inativação dos

NMDARs, no presente estudo foi utilizado o AP5 (do inglês, *(2R)-amino-5-phosphonopentanoate*) que é uma fármaco ligante do mesmo sítio de ligação do glutamato, sendo, portanto, classificado como um antagonista competitivo do NMDAR.

Ionotrópicos			Metapotróticos		
NMDA	AMPA	Kainato	Grupo I	Grupo II	Grupo III
GluN1	GluA1	GluK1	mGlu1	mGlu2	mGlu4
	GluA2	GluK2	mGlu5	mGlu3	mGlu6
GluN2A	GluA3	GluK3			mGlu7
GluN2B					mGlu8
GluN2C		GluK4			
GluN2D		GluK5			
GluN3A			↑ IP3	↓ cAMP	cAMP
GluN3B			↑ Ca ²⁺		
Permeáveis a íons			Sistema de segundos mensageiros		

Figura 7 – Quadro esquemático representado os tipos de receptores glutamatérgicos, suas subunidades e vias de sinalização. Adaptado de Brady et al., 2012.

Os KARs possuem subunidades GluK1-GluK5 (**Figura 6**). Apesar de existirem estudos sobre o seu tráfego nos espinhos dendríticos (Coussen, 2009) e de já ter sido demonstrada a importância deles em fenômenos de plasticidade sináptica (Bortolotto *et al*, 1999; Petrovic *et al*, 2017), os KARs são os receptores ionotrópicos glutamatérgicos que tem sua função menos esclarecida.

Os mGluRs são divididos em grupo I, II e III. Os mGluRs do grupo I (mGluR1 e mGluR5) ativam proteínas G estimulatórias (Gq) iniciando vias de sinalização que envolvem fosfolipase C/inositol 1,4,5 trifosfato/diacilglicerol (do inglês, *phospholipase C*, PLC; *inositol 1,4,5-triphosphate*, IP3; *diacylglycerol*, DAG). O aumento dos níveis de cálcio intracelular, pode ativar CaM (do inglês, *calmodulin*), CaMK (do inglês, *Ca²⁺/CaM-dependent kinases*) e vias de sinalização subsequentes que são importantes para memória e para a LTP. Receptores dos grupos II e III reduzem os níveis de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), por sinalizarem através de uma proteína G inibitória (Gi). Grupo II engloba os receptores mGluR2 e mGluR3, ao passo que o grupo III inclui os mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (Willard and Koochekpour, 2013).

1.4. Plasticidade Hebbiana

Uma das primeiras ideias de como uma experiência comportamental causava alterações nos neurônios foi proposta por Ramón y Cajal, ainda no século XIX. Ele predisse que as conexões (depois identificadas como sinapses) entre os axônios e as protusões (espinhos dendríticos) eram modificadas pela experiência (Josselyn *et al*, 2015b). Essas ideias foram aperfeiçoadas por Hebb, que postulou que atividade coincidente entre o neurônio pré-sináptico e o pós-sináptico fortaleceria a conexão sináptica entre eles (Morris, 1999). Dessa forma, o fortalecimento das conexões sinápticas poderia ser responsável pela formação de conjuntos de neurônios que estariam associados e seriam responsáveis, por exemplo, pelo aprendizado e pela conseqüentemente evocação da memória (Josselyn *et al*, 2015b). Atualmente, denomina-se plasticidade Hebbiana a atividade coordenada entre o neurônio pré-sináptico e pós-sináptico.

Em suporte a teoria de Hebb, Bliss e Lomo (1973) descobriram a LTP, que é assim denominada devido ao aumento duradouro da eficácia sináptica entre o neurônio pré-sináptico e pós-sináptico. O aumento da eficácia sináptica induzido pela ativação dos NMDARs é inicialmente sustentado pela fosforilação e inserção de AMPARs. Posteriormente, a ativação de vias de sinalização intracelular leva a indução de síntese de proteínas necessárias para a manutenção da potenciação. Contrapondo o aumento da eficácia sináptica, também pode ser observada a diminuição, chamada de depressão de longa duração (LTD, do inglês, *long-term depression*) (Kandel *et al*, 2000). Existem diferentes protocolos para indução da LTP ou LTD, que vão depender da sinapse que está sendo estudada e das influências extrínsecas (nível de inibição sináptica, neuromoduladores, hormônios, etc) que podem modular a facilidade com que a plasticidade sináptica será desencadeada (Abraham and Williams, 2008). De forma geral, a estimulação elétrica de alta frequência nos axônios das diferentes regiões hipocâmpais (DG, CA3, CA1) gera um aumento da eficácia sináptica (LTP), ao passo que protocolos de baixa frequência geram diminuição da força sináptica nas sinapses dessa mesma estrutura (Bear and Malenka, 1994; Malenka and Bear, 2004). Por exemplo, para a indução da LTP nas células piramidais de CA1 costuma-se utilizar estimulação de alta frequência (HFS, do inglês, *high frequency stimulation*; estimulação contínua de 100 Hz por 1 segundo) ou estimulação *burst* (4 pulsos de 100 Hz repetidos a cada 200ms). Já para a indução de LTD nessas mesmas células utiliza-se estimulação de baixa frequência (LFS, do inglês, *low frequency stimulation*; 1-3 Hz) por um período prolongado (10-15 minutos) (Bliss and Cooke, 2011; Malenka and Bear, 2004).

Além destes, existem protocolos de indução que prezam pela relação temporal entre o disparo do neurônio pré-sináptico e a despolarização do neurônio pós-sináptico, denominado *plasticidade dependente do tempo de disparo* (STDP, do inglês, *spike-timing dependent plasticity*). Esses são considerados os protocolos que mais se aproximam dos fenômenos plásticos que provavelmente ocorrem fisiologicamente. Quando o estímulo pré-sináptico é realizado antes do pós-sináptico e o tempo entre os estímulos é curto, é observado aumento da força sináptica. Por outro lado, quando a atividade do neurônio pós-sináptico ocorre antes do pré-sináptico, é observada uma diminuição da força sináptica (Buonomano and Carvalho, 2010).

Desde que estudos farmacológicos mostraram a necessidade de NMDAR para a formação de memórias dependentes de hipocampo (Morris et al., 1986) e que trabalhos eletrofisiológicos demonstraram o recrutamento do mesmo receptor para a indução de LTP na via das colaterais de Schaffer para CA1, tem-se tentado demonstrar um elo direto entre o aprendizado e o aumento da força sináptica. Dessa forma, tem sido proposto que as alterações na força sináptica atuam como um dos possíveis substratos neurobiológicos para o armazenamento de informações (Tonegawa *et al*, 2015).

O estudo de Nabavi et al., 2014 foi um dos que tentou evidenciar uma relação causal entre memória e alterações na força sináptica. Nesse trabalho, ratos associaram o choque nas patas com a estimulação optogenética da amígdala lateral. Posteriormente, quando uma LTP foi optogeneticamente induzida, os animais evocaram a memória de medo; por outro lado a indução de uma LTD prejudicou a evocação (Nabavi *et al*, 2014). Contudo, esse trabalho não demonstrou que a plasticidade sináptica foi induzida especificamente nas células recrutadas para a formação da memória. Um trabalho do grupo do Tonegawa complementou esse estudo citado anteriormente, demonstrando que o aprendizado causa um aumento da força sináptica (isto é, a ativação do neurônio pré-sináptico causa um aumento no potencial excitatório pós-sináptico) especificamente nas células do giro denteado do hipocampo que foram recrutadas para o aprendizado (Ryan *et al*, 2015).

1.5. Plasticidade homeostática e metaplasticidade

Mudanças plásticas causam alterações no número e na força das sinapses, fazendo-se necessário o uso de mecanismos de estabilização, ou mecanismos homeostáticos, para manter a atividade neuronal dentro de uma faixa fisiológica (Turrigiano, 2012). Modelos

computacionais predizem que sem algum mecanismo de estabilização do peso sináptico (isto é, eficácia com que um neurônio se comunica com o outro) ou das frequências de disparos de potenciais de ação, a atividade sináptica ficaria descontrolada (Keck *et al*, 2017). Dessa forma, os mecanismos homeostáticos são de extrema importância para o controle e manutenção da atividade encefálica como um todo. Para um mecanismo de plasticidade ser considerado homeostático ele deve regular determinado parâmetro dentro de um valor estabelecido como 'normal' (Turrigiano, 2012). Dentre os principais mecanismos de estabilização homeostática, estão: (i) escalonamento sináptico, (ii) controle da inibição sináptica, (iii) modulação dos espinhos dendríticos, e (iv) alteração do limiar de indução da plasticidade sináptica causada por atividade sináptica prévia (Keck *et al*, 2017).

Não apenas a plasticidade sináptica pode mediar o aprendizado. Mecanismos de plasticidade homeostática, como a metaplasticidade, também podem dar suporte ao aprendizado. Denominamos metaplasticidade quando a indução da plasticidade sináptica é alterada por modificações plásticas anteriores (**Figura 8**). O prefixo 'meta', do grego 'além' ou 'acima', é usado para indicar uma forma de plasticidade sináptica de alta ordem, a plasticidade da plasticidade sináptica (Abraham and Bear, 1996). Uma atividade desencadeadora de metaplasticidade pode modificar a sinapse de forma que o limiar de indução (ou outras características da plasticidade: intensidade, direção, ocorrência ou não) de plasticidades sinápticas posteriores seja alterado. Neste trabalho avaliamos se a metaplasticidade induzida pelo aprendizado alterou a excitabilidade neuronal.

Alguns trabalhos prévios demonstraram que a excitabilidade neuronal pode ser mantida aumentada por até 5 dias após o aprendizado em neurônios piramidais de CA1 (Moyer *et al*, 1996). Sugere-se que a hiperexcitabilidade seja mediada pelo aumento da PKC (do inglês, *protein kinase C*) e da atividade de ERK1 e ERK2 (do inglês, *extracellular-signal-regulated-kinase 1 e 2*) (Cohen-Matsliah *et al*, 2007). Além disso, aumento dos níveis de CREB tornam os neurônios mais excitáveis e propícios para serem recrutados para o aprendizado associativo (Yiu *et al*, 2014; Zhou *et al*, 2009).

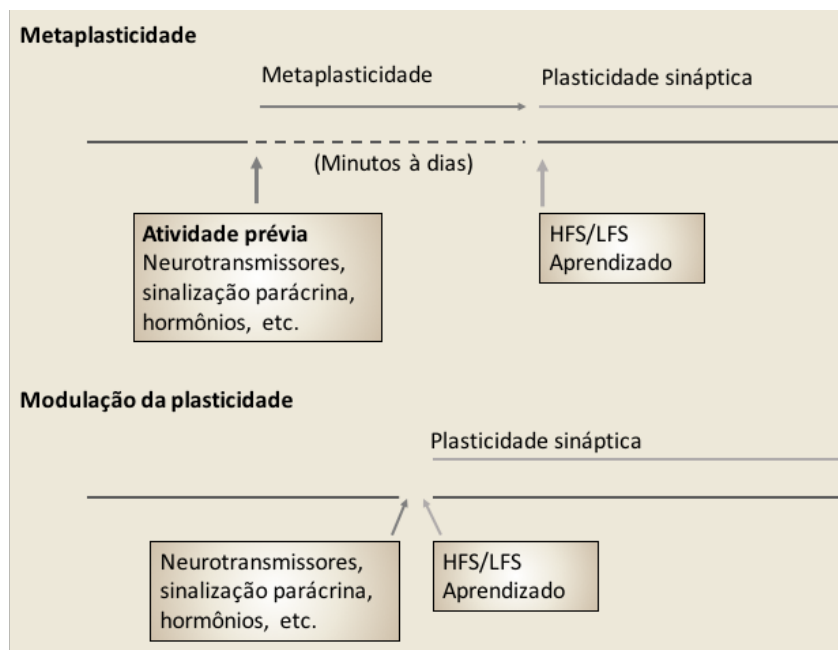


Figura 8 – Representação esquemática de como a metaplasticidade influencia a indução da plasticidade sináptica subsequente (acima) e como diferentes fatores atuam no momento de indução da plasticidade sináptica (abaixo). Adaptado de Abraham, 2008.

1.6. Aquisição de memórias independentes de NMDARs

As informações contidas nessa subseção foram adaptadas do artigo de revisão publicado pela autora, intitulado: “Can Previous Learning Alter Future Plasticity Mechanisms?”. Por ele conter informações aquém das abordadas nessa tese, encontram-se resumidas a seguir apenas as informações consideradas mais relevantes. O artigo completo encontra-se no apêndice.

A importância dos NMDARs na formação de memórias tem sido demonstrada por vários estudos em diferentes tarefas comportamentais (Alagband and Marshall, 2013; Cain *et al*, 1996; Fanselow *et al*, 1994; Faust, 2013; Kim *et al*, 1991; Morris, 1989; Morris *et al*, 1986; Vianna *et al*, 2001; Young *et al*, 1994). Contudo, em algumas situações, o aprendizado subsequente ocorre mesmo com o bloqueio desses receptores (Bannerman *et al*, 1995; Sanders & Fanselow, 2003; Roesler *et al*, 1998; Tayler *et al*, 2011; Wiltgen *et al*, 2010; 2011). A primeira demonstração desse fenômeno foi realizada pelo grupo do Morris em um clássico experimento realizado no labirinto aquático, que ele mesmo desenvolveu. O experimento ficou conhecido como *downstairs-usptairs* porque os animais foram expostos a dois labirintos aquáticos, um localizado em uma sala *downstairs* e outro em uma sala *upstairs*, salas essas que possuíam diferentes dicas contextuais. Foi observado que animais que já haviam aprendido a

tarefa previamente, não necessitavam os NMDARs para o aprendizado posterior (Bannerman et al., 1995). Contemporaneamente, Saucier & Cain (1995) demonstraram que a familiaridade com a tarefa era suficiente para tornar o próximo aprendizado independente dos NMDARs. A presença desse fenômeno também foi evidenciada na formação de memórias aversivas. Roesler et al (1998) mostraram que a pré-exposição ou o pré-treino na esquiava inibitória preveniam o efeito amnésico do antagonista dos NMDARs (APV). Em concordância, outros trabalhos utilizando o condicionamento aversivo contextual indicam que os NMDARs não são recrutados quando os animais possuem uma experiência prévia nessa mesma tarefa (Hardt et al., 2009; Sander & Fanselow, 2003; Tayler et al., 2011). Assim, sugere-se que uma experiência prévia pode modificar a forma como o próximo aprendizado será adquirido, caracterizando um fenômeno de metaplasticidade. Dessa maneira, a aquisição do aprendizado subsequente seria mediada por diferentes mecanismos de plasticidade, sem a necessidade dos NMDARs.

Alguns trabalhos têm sugerido que os CP-AMPARs poderiam mediar a plasticidade sináptica dos aprendizados independentes de NMDARs (Wiltgen et al, 2010; Clem et al, 2008). Contudo, essa questão não está muito clara na literatura e outros receptores podem ter um papel tão ou mais importante do que os CP-AMPARs. Além disso, outros estudos têm sugerido que o aprendizado prévio na mesma tarefa possa modificar a estrutura encefálica envolvida com a formação do aprendizado subsequente (Cammarota et al., 2005; de Hoz & Martin, 2014; Wang et al., 2012). Dessa forma, para um aprendizado ser independente de NMDAR ele deve atender a dois critérios principais (i) acontecer na mesma tarefa comportamental ou no mesmo contexto do que o aprendizado prévio e (ii) ser mediado pela mesma estrutura encefálica utilizada para a aquisição do primeiro aprendizado. Se os aprendizados são muito diferentes entre si, como o aprendizado do labirinto aquático seguido pelo CAC, os NMDARs ainda são recrutados (Wiltgen et al., 2011). Se os aprendizados não requerem a mesma estrutura encefálica, não existe a possibilidade de inferir algo sobre como a metaplasticidade induzida pelo primeiro aprendizado influencia no aprendizado subsequente. Sendo assim, o melhor modelo para explicar como a metaplasticidade induzida pela primeira experiência influencia no aprendizado seguinte seria através da reutilização dos mesmos neurônios, observando-se uma sobreposição entre as populações neuronais recrutadas para ambos os aprendizados. Além disso, não se sabe ao certo por quanto tempo a metaplasticidade consegue influenciar no próximo aprendizado, apesar de já ter sido observados que ele pode ocorrer de forma independente dos NMDARs até trinta dias após a aquisição da memória anterior (Wiltgen et al, 2011).

Dessa forma, ainda é elusivo de que forma e por quanto tempo a metaplasticidade induzida pelo primeiro aprendizado influencia na aquisição do aprendizado subsequente. No presente trabalho, buscamos responder essas perguntas. Sendo nossas hipóteses as seguintes:

1.6.1. Capítulo I

A metaplasticidade induzida pelo primeiro aprendizado aumenta a excitabilidade intrínseca dos neurônios favorecendo a codificação de novas memórias via ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR).

1.6.2. Capítulo II

Aprendizados muito afastados temporalmente (memória remota) *não* são mais influenciados pelos mecanismos metaplasticidade induzidos pelo primeiro aprendizado.

2. OBJETIVOS GERAIS

Determinar (i) de que forma e (ii) por quanto tempo os mecanismos de metaplasticidade, induzidos pelo primeiro aprendizado influenciam em um aprendizado subsequente recente ou remoto.

2.1. Objetivos específicos do capítulo I

2.1.1. Verificar se o aprendizado da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto causa um aumento da excitabilidade intrínseca, que dura pelo menos dois dias, nos neurônios recrutados para o aprendizado.

2.1.2. Avaliar se os neurônios recrutados para o primeiro aprendizado são mais propensos a serem utilizados para o segundo aprendizado.

2.1.3. Verificar se o primeiro aprendizado é mediado por NMDARs.

2.1.4. Avaliar se o aprendizado subsequente é independente dos NMDARs nas presentes condições experimentais.

2.1.5. Determinar se os mGluRs do tipo I são necessários para a formação do primeiro aprendizado.

2.1.6. Verificar se os mGluRs do tipo I são recrutados para o aprendizado subsequente.

2.2. Objetivos específicos do capítulo II

2.2.1. Avaliar se a memória remota pode ser evocada quando ambos hipocampo dorsal e ventral são inativados.

2.2.2. Determinar se a inativação do córtex cingulado anterior prejudica a formação de um aprendizado subsequente a uma memória que já foi consolidada sistemicamente.

2.2.3. Verificar se a inativação do hipocampo dorsal prejudica a formação do aprendizado subsequente a uma memória remota.

2.2.4. Avaliar se o aprendizado subsequente a uma memória é prejudicado pela inativação do hipocampo ventral.

2.2.5. Determinar se a inativação concomitante do hipocampo dorsal e ventral causa um déficit na formação do aprendizado subsequente a uma memória remota.

2.2.6. Verificar se as pré-exposições modificam o mecanismo de plasticidade sináptica que vai ser recrutado para o primeiro aprendizado.

2.2.7. Avaliar se a metaplasticidade induzida pelo primeiro aprendizado ainda influencia no aprendizado subsequente quando o intervalo entre eles é aumentado para quarenta dias.

3. CAPÍTULO I

Artigo científico intitulado: *Metaplasticity contributes to memory formation in the hippocampus* — em revisão na revista *Neuropsychopharmacology* desde 16 de fevereiro de 2018.

TITLE PAGE

METAPLASTICITY CONTRIBUTES TO MEMORY FORMATION IN THE HIPPOCAMPUS

Running title: Metaplasticity and memory

Ana P. Crestani^{1*}

Jamie N. Krueger^{2*}

Eden V. Barragan²

Yuki Nakazawa³

Sonya E. Nemes⁴

Jorge A. Quillfeldt⁵

John A. Gray^{3, 6}

Brian J. Wiltgen^{3, 7}

*authors contributed equally to this study

¹Neuroscience Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul

²Neuroscience Graduate Program, University of California, Davis

³Center for Neuroscience, University of California, Davis

⁴Department of Neurobiology, Physiology and Behavior, University of California, Davis

⁵Department of Biophysics: Federal University of Rio Grande do Sul

⁶Department of Neurology: University of California, Davis

⁷Department of Psychology: University of California Davis

Corresponding author:

Brian J. Wiltgen

Department of Psychology and the Center for Neuroscience

1544 Newton Court Road

Davis, CA 95618

Phone: (434) 466-1727

e-mail: bjwiltgen@ucdavis.edu

Abstract

Prior learning can modify the plasticity mechanisms that are used to encode new information. For example, NMDA receptor (NMDAR) activation is typically required for new spatial and contextual learning in the hippocampus. However, once animals have acquired this information, they can learn new tasks even when NMDARs are blocked. This finding suggests that behavioral training alters cellular plasticity mechanisms such that NMDARs are not required for subsequent learning. The mechanisms that mediate this change are currently unknown. To address this issue, we tested the idea that changes in intrinsic excitability (induced by learning) facilitate the encoding of new memories via metabotropic glutamate receptor (mGluR) activation. Consistent with this hypothesis, hippocampal neurons exhibited increases in intrinsic excitability after learning that lasted for several days. This increase was selective and only observed in neurons that were activated by the learning event. When animals were trained on a new task during this period, excitable neurons were reactivated and memory formation required the activation of mGluRs instead of NMDARs. These data suggest that increases in intrinsic excitability may serve as a metaplastic mechanism for memory formation.

METAPLASTICITY CONTRIBUTES TO MEMORY FORMATION IN THE HIPPOCAMPUS

Crestani, Krueger*, Barragan, Nakazawa, Nemes, Quillfeldt Gray & Wiltgen*
UC Davis, Department of Psychology, Department of Neurology, Center for Neuroscience

INTRODUCTION

The way we learn is influenced by our past. Previous experiences can impede new learning as in the case of proactive interference (Bouton, 1993; Winocur, 1984). They can also enhance learning by providing a schema into which new information can be rapidly incorporated (Tse *et al*, 2007, 2011). While these phenomena are well established at the psychological level, much less is known about the impact of experience on the cellular mechanisms of learning and memory. This is true, in part, because experiments are done with laboratory animals that have little to no real-world experience. It is possible that these naïve animals encode information using different mechanisms than more experienced subjects. If so, contemporary ideas about memory may be limited to a restricted set of conditions that rarely exist in nature. The current experiments examined this possibility by studying learning mechanisms in animals with prior behavioral experience.

Experience is known to influence the role of NMDA receptors (NMDARs) in learning and memory. For example, rats with no experience in the water maze are severely impaired when NMDARs are blocked in the hippocampus during training. This same manipulation has no effect, however, if animals are pre-trained on the task (Saucier and Cain, 1995). This is true even when pre-training occurs in a different maze with a distinct set of spatial cues (Bannerman *et al*, 1995). Similar effects have been observed for context fear conditioning and olfactory learning (Quinlan *et al*, 2004). In each case, initial learning requires NMDAR activation while subsequent learning does not.

While it is known that prior experience alters the substrates of memory, it is unclear how this occurs. One possibility is that learning induces non-synaptic changes (like increases in intrinsic excitability) that alter the way neurons encode subsequent information (Cai *et al*, 2016a; Chandra and Barkai, 2017). Increased excitability has been observed in the hippocampus after learning and can last for several days depending on the salience of the initial experience (Moyer *et al*, 1996; Saar and Barkai, 2003; Chandra and Barkai, 2017). If an animal acquires new information during this period, it could be rapidly encoded by excitable neurons via NMDAR independent plasticity mechanisms (Quinlan *et al*, 2004; Chandra and Barkai, 2017). To examine this idea, we tagged hippocampal neurons that were activated by context fear conditioning and determined if they were more excitable than non-tagged cells two days later. We also determined if tagged cells were reactivated when animals encoded a second memory two days after the first.

Some forms of hippocampal long-term potentiation (LTP) do not require NMDAR activation. These include mossy fiber LTP in CA3 and high frequency LTP (200 Hz) in CA1. Interestingly, in both cases, synaptic strengthening requires the activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) (Nicoll and Schmitz, 2005; Wang *et al*, 2016). Consequently, we determined if mGluRs contribute to NMDAR-independent learning. To do this, mice underwent fear conditioning in two distinct contexts in sequence (A followed by B). Our previous work showed that memory for context A requires NMDAR activation while memory for context B does not. To examine the role of mGluRs, we infused the group I/II antagonist MCPG into the hippocampus prior to learning in A or B.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Male B6/129 F1 hybrid mice, 8-11 weeks old, weighing 20–35 g (Taconic) were used for drug microinfusion experiments. Reactivation and electrophysiology experiments were performed using Tet-Tag transgenic mice. These mice express H2B-GFP under the control of the c-Fos promoter. In these mice, activation of the c-Fos promoter during learning leads to the expression of H2B-GFP in active neurons (Reijmers and Mayford, 2009). For reactivation and electrophysiology experiments, mice were removed from doxycycline (40mg/kg) for two days prior to fear conditioning. Immediately following training, animals were put on high doxycycline (1 g/kg) for 1 day, then returned to low doxycycline for the remainder of the experiment. Mice were single housed in plastic cages under a 12 h light/dark cycle and at constant temperature of 24 ± 1 °C, with water and food *ad libitum*. Behavioral tests and recordings were performed during the light phase of the cycle. All experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health guidelines and were approved by the UC Davis Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Electrophysiology: For whole-cell recordings, 8 to 9 week old TetTag mice were anesthetized with isoflurane and transcardially perfused with ice-cold carbogen (95% O₂/5% CO₂)-bubbled NMDG-based cutting solution (Ting *et al*, 2014) containing (in mM): 93 NMDG, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 30 NaHCO₃, 20 HEPES, 25 glucose, 5 sodium ascorbate, 2 thiourea, 3 sodium pyruvate, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂ (titrated to pH 7.3-7.4 with concentrated HCl; osmolarity of 300-310 mOsm). Acute transverse slices (300 μm) of dorsal hippocampus were cut on a Leica VT1200 vibratome (Buffalo Grove, IL) in the ice-cold and oxygenated NMDG cutting solution described above, then transferred to an incubation chamber containing the same NMDG cutting solution for 15 min at 34°C. Before recording, slices were recovered for at least 45 min then stored submerged for up to 5 h in room temperature oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 119 NaCl, 26.2 NaHCO₃, 11 glucose, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂ and 1.3 MgSO₄. Whole cell current clamp recordings were obtained from CA1 pyramidal neurons under visual guidance (DIC/infrared optics). GFP⁺ neurons were identified by epifluorescence microscopy. For all the recordings, borosilicate glass pipettes were fabricated with resistances of 4 to 6 MΩ. Pipettes were filled with the following intracellular solution (in mM): 135 K⁺ gluconate, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.6 EGTA, 4 NaATP, 0.4 NaGTP, pH 7.3, 290 mOsm. Recordings were collected with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices), filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and data analyzed using pClamp 10 software (Molecular Devices). Series resistance was monitored and cells in which series resistance varied by more than 20% during a recording were discarded. Frequency-current relationships for evoked firing were determined by injecting 500 ms current steps with amplitudes increasing by 20 pA, from 60-180 pA from the resting potential. Liquid junction potentials were not corrected.

Stereotaxic surgery: Mice were anesthetized with isoflurane and mounted in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Guide cannulae (22 gauge; Plastics One, Roanoke, VA) were inserted bilaterally into the dorsal hippocampus (anteriorposterior [AP] –2.0 mm from bregma, mediolateral [ML] \pm 1.5 mm, dorsoventral [DV] –1.0 mm). The cannulae were affixed to the skull using C&B Metabond and a dental acrylic headcap.

Behavioral procedure: Prior to contextual fear conditioning, mice were handled two minutes a day for 6-7 days. The chamber used for fear conditioning in these experiments was described previously (Nakazawa *et al*, 2016; Tanaka *et al*, 2014). The chamber consisted of a stainless steel grid floor and side walls, as well as a Plexiglass door. Overhead LED lighting provided

broad spectrum or near infrared light, and a scanning charge coupled device video camera (Med Associates) captured animals' movement during the training/testing sessions.

Mice underwent fear conditioning in two contexts: context A followed by context B. Different visual, auditory and olfactory cues were used to maximize distinction between contexts.

Context A had a single grid floor with visible lights and a fan turned on. Prior to conditioning, the chamber was cleaned with 70% ethanol. **Context B** had a black plastic triangular tent inserted inside the chamber, red lights on with no visible lights and no fan. The single grid floor was replaced with a staggered grid floor and the chamber was cleaned with Saniwipes (Nice-Pak Products, Inc.).

The conditioning sessions were separated by 2 days. Memory was tested 1 day after training by returning mice to the conditioning context (A or B) for 5 min and measuring the freezing response. During training, mice were allowed to explore the conditioning context (A or B) for 3 minutes prior to the delivery of three 0.4mA/2s footshocks with an inter-trial interval of 30 sec. The animals remained 30 additional seconds after the final shock, for a total of 276 seconds in the training context. During testing, mice were returned to the training chamber for 5 minutes (300sec). The automated Video Freeze System (Med Associates) was used to quantify freezing, as described previously (Anagnostaras et al., 2010).

Microinfusion: Fifteen minutes prior to training (in context A or context B), bilateral infusions of 0.5 μ L (0.1 μ L/min) were administered using 10 μ L Hamilton syringes controlled by a two-syringe micropump (Harvard Apparatus). The 28-gauge injection cannula projected an additional 1 mm from the tip of the guide cannula into the target region. Animals moved freely in an empty cage during the infusion procedure. The injectors were left in place for 2 additional minutes following infusion to allow drug diffusion. Mice were returned to their homecages until testing.

Drugs: APV or RS-MCPG (both from Tocris Bioscience) were used to block NMDAR and mGluR, respectively. The NMDAR antagonist APV (2.5 μ g/ μ l) and mGluR antagonist MCPG (1 μ M) were dissolved in sterile saline. Saline served as the vehicle.

Histology: Histological verification of cannulae placements was performed at the end of behavioral testing. Mice were perfused transcardially with ice-cold PBS (10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl) followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were post-fixed in 4% PFA for 24-h prior to sectioning. Coronal sections (40 μ m) were cut on a vibratome and mounted on glass microscope slides. After drying, the sections were stained with cresyl violet to identify neuronal cell bodies. Cannulae placements were verified by visual inspection of the stained sections reconstructed on the mouse brain atlas (Dong, 2008).

Immunohistochemistry: Immunohistochemistry for c-Fos was performed at the end of behavioral testing. Coronal sections (40 μ m, dorsal hippocampus) were washed three times in 1x PBS (10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl) before blocking buffer incubation and after all the antibodies and counterstaining steps. Slices were then blocked in donkey blocking buffer (DBB, 1mL donkey serum, 100 μ L Triton-X, 50mL 1x PBS) for 15 minutes. Slices were placed overnight at 4°C in 1:1000 rabbit anti c-Fos (Millipore) in DBB. Following first incubation, slices were placed in 1:500 donkey anti-rabbit biotinylated IGG (Jackson) for 1 hour and then placed in 1:500 CY5 (Fisher) for 45 minutes. Incubation in 1:10000 DAPI for 10 minutes was performed as a counterstain. Slices were washed three times in 1x PBS and mounted onto Superfrost slides (Fisher). Slides were coverslipped with Vectashield antifade mounting media (Vector Labs).

Microscopy and Cell Counting: Slides were scanned using an Olympus Slide Scanner (Olympus). Images were cropped to proximal CA1 of the dorsal hippocampus. Cell counts were performed on three slices (6 hemispheres) from each animal. ImageJ was used to measure number of cells using volumetric analysis (Object Counter 3D) in the sample. GFP and c-Fos + cells were counted using the multi-point tool.

Statistical Analyses: Evoked firing rates were analyzed using two-way ANOVA correcting for multiple comparisons with Sidak's correction. Resting membrane potential was analyzed using a two-tailed unpaired *t* test. Statistical significance for analyses was set *a priori* at $p < 0.05$. All data presented as mean \pm SEM. Freezing differences between groups were analyzed with two-way repeated-measures ANOVAs and/or two-tailed unpaired *t* tests. Reactivation (GFP + c-Fos) differences were analyzed with unpaired *t*-tests.

RESULTS

Hippocampal neurons become more excitable after context fear learning

To determine if learning increases excitability, we patched and recorded from CA1 neurons after context fear conditioning. The long-lasting fluorescent protein H2B-GFP was used to identify cells that were active during training. Expression of this protein was controlled by the c-Fos promoter and suppressed by doxycycline as previously described (Nakazawa *et al*, 2016; Tanaka *et al*, 2014). Doxycycline chow was removed two days prior to fear conditioning (to permit tagging) and reintroduced immediately after learning. Two days later, GFP positive and GFP negative cells were patched in CA1 and excitability was examined. We found a significant increase in intrinsic excitability (slope of the spike frequency versus injected current curve) in GFP+ cells compared with neighboring control neurons (GFP-) (Figure 1A) (two-way repeated measures ANOVA with injected current \times cell: $F_{6,90} = 4.55$, $p < .05$). This increase was not accompanied by a change in the resting membrane potential (Figure 1B) (-63.8 ± 1.2 mV for control and -64.1 ± 1.0 mV for GFP+, $p > .05$). Therefore, as predicted from previous work, hippocampus-dependent learning increased the excitability of CA1 neurons for several days.

Relearning activates excitable hippocampal neurons

Once CA1 neurons become excitable, we predict they are reactivated when the animal learns something new. To test this idea, we fear conditioned mice in context A followed two days later by training in context B (AB). Excitable cells were labeled with H2B-GFP during learning in A and activity in B was indexed via endogenous c-Fos expression. Reactivation was calculated as the percentage of H2B-GFP+ cells that co-expressed c-Fos. For comparison, we trained two additional groups of mice. The first was fear conditioned in context A twice (AA) and the second was conditioned in context A followed by no additional training (A) (Figure 2A). As expected, mice trained in context B froze less during the baseline period than those retrained in context A ($t_{(6)} = 2.48$, $p < .05$). This result indicates that fear of A does not generalize to context B. However, after the shocks were administered, mice froze an equivalent amount in both environments (Figure 2B) ($t_{(6)} = 0.35$, $p > .05$). Ninety-minutes after the second training session, mice were sacrificed and immunohistochemistry for c-Fos was performed.

Consistent with previous findings, CA1 neurons were more likely to be reactivated (co-express GFP and c-Fos) in the AA group compared to the AB group ($t_{(6)} = 3.93$, $p < .05$) (Ramirez *et al*, 2013; Tayler *et al*, 2011). Nonetheless, the percentage of reactivated neurons was quite similar whether the mice were retrained in A (26%) or B (19%). In addition, reactivation in context A ($t_{(7)} = 10.24$, $p < .05$) and context B ($t_{(7)} = 7.07$, $p < .05$) was significantly higher than that observed

in the A alone control group (4%), which did not undergo retraining (Figure 2C). Together, these results demonstrate that excitable neurons are reactivated when animals undergo a second learning experience.

Initial learning requires NMDARs but relearning does not

We hypothesize that excitable hippocampal neurons are able to encode new information without NMDARs. To test this idea, we fear conditioned mice in context A followed 2 days later by retraining in context B. One group received APV infusions into the dorsal hippocampus before learning in A but no infusions prior to training in B. A second group received no infusions before training in A and APV infusions prior to training in B. Memory was assessed 1 day after each training session by placing the mice back into the context and measuring freezing (Anagnostaras, 2010). Consistent with previous work, mice that received APV prior to training in context A showed impaired memory in that environment relative to saline controls (two-way repeated measures ANOVA, drug effect, $F_{(1,15)} = 8.76, p < .05$). When these same animals were subsequently trained in context B with no infusions, memory was similar in both groups (two-way repeated measures ANOVA, $F_{(1,15)} = 0.63, p > .05$) (Figure 3A). Separate groups of mice were trained in context A with no infusions. Not surprisingly, these animals showed equivalent levels of freezing in this environment (two-way repeated measures ANOVA, $F_{(1,15)} = 0.04, p > .05$). When the same mice were subsequently trained in context B, infusions of APV did not impair memory (two-way repeated measures ANOVA, $F_{(1,15)} = 0.08, p > .05$) (Figure 3B). This result demonstrates that relearning can occur in the absence of NMDAR activation. Importantly, as in our reactivation experiment, mice did not simply generalize their fear across contexts. In both groups, freezing levels were low in context B during the baseline period and increased after the shocks were administered (two-way repeated measures ANOVA, period effect, $F_{(1,15)} = 71.92, p < .05$).

NMDAR-independent learning is mediated by mGluRs

Previous studies found that mGluRs can mediate LTP when NMDARs are blocked (Clem *et al*, 2008; Wang *et al*, 2016). In the hippocampus, this type of plasticity is observed when cells are strongly excited (Wang *et al*, 2010). One possibility, therefore, is that excitable neurons reactivated in context B undergo synaptic strengthening via mGluR activation. To test this idea, mice underwent the same protocol as in the previous experiment except that the mGluR antagonist MCPG was infused into the hippocampus before training in context A or context B. Infusions of MCPG prior to learning in A had no effect on memory (two-way repeated measures ANOVA, $F_{(1,8)} = 2.812, p > .05$). This suggests that mGluR activation is not required for initial context learning. When the same mice were trained in context B with no infusions, memory was also similar (two-way repeated measures ANOVA, $F_{(1,8)} = 1.306, p > .05$) (Figure 3C). To determine if mGluRs are required for relearning, separate animals were trained in context A with no infusions and then given infusions of MCPG prior to conditioning in context B. Memory for A (where no infusions were given) was similar in both groups (two-way repeated measures ANOVA, $F_{(1,19)} = 1.267, p > .05$). However, when the same mice were retrained in context B, blockade of mGluRs with MCPG significantly impaired memory (two-way repeated measures ANOVA, drug effect, $F_{(1,19)} = 12.29, p < .05$) (Figure 3D). Together, our data suggest that initial learning requires NMDARs while relearning is dependent on the activation of mGluRs.

DISCUSSION

The biological basis of memory has been thoroughly characterized in the hippocampus (Elgersma and Silva, 1999; Morris, Davis, & Butcher, 1990). It is thought that memories are formed via activation of post-synaptic NMDARs, which increase calcium influx and initiate intracellular events that lead to gene expression and synaptic strengthening. Our data suggest

this model is incomplete. NMDARs are not always required for memory, they are only needed when animals have no prior experience with the behavioral task. If prior training is given, then new spatial and contextual memories can be formed in the presence of NMDAR antagonists (Bannerman *et al*, 1995; Quinlan *et al*, 2004; Tayler *et al*, 2011; Wiltgen *et al*, 2011). It should be noted that for NMDAR-independent learning to occur, prior training has to be on the same (or a similar) task. If animals are trained in the water maze, for example, subsequent context fear learning still requires NMDAR activation (Wiltgen *et al*, 2011).

To conclude that hippocampal NMDARs are not required for memory, several conditions must be met. First, animals have to form a new memory during the training session and not simply generalize from previous experiences. This was true in the current study as baseline freezing in context B (a measure of generalization) was very low. Mice froze significantly more in context A, which indicates that they could distinguish between the conditioning environments (Figure 2B). Similarly, in the Morris watermaze, experienced animals are able to form new spatial memories in the presence of NMDAR antagonists even when the room, platform location and distal cues are altered (Bannerman *et al*, 1995). A second condition is that NMDAR-independent memories must depend on the hippocampus. If the second learning event is encoded by a different brain region, then blocking NMDARs in the hippocampus tells you nothing about their requirement for memory. To address this possibility, lesions of the hippocampus have been made following fear conditioning in two different contexts or after animals learned to navigate in two distinct watermazes. In each case, NMDAR-dependent and NMDAR-independent memories were equally impaired by hippocampus damage (Bannerman *et al*, 1995; Tayler *et al*, 2011). These data suggest that prior experience alters plasticity such that new memories can be formed in the absence of NMDAR activation.

Changes in the plasticity mechanisms underlying memory are not unique to the hippocampus or spatial/contextual learning. Similar effects have been observed in the piriform cortex during an olfactory discrimination task. In this paradigm, the encoding of novel odor-reward pairs initially requires NMDAR activation. However, after several days of training, rats can learn new odor-reward pairs in the presence of NMDAR antagonists. This shift in plasticity is accompanied by an increase in the intrinsic excitability of neurons in the piriform cortex and a change in post-synaptic NMDAR subunit composition (increased NR2A and reduced NR2B) (Quinlan *et al*, 2004). Based on these data, we hypothesized that NMDAR-independent context fear conditioning would also be correlated with an increase in the intrinsic excitability of hippocampal neurons. To test this idea, we labeled active CA1 neurons during conditioning with the long-lasting fluorescent protein H2B-GFP. Two days later, whole cell recordings were conducted and revealed that the intrinsic excitability of tagged neurons was significantly elevated compared to non-labeled cells (Figure 1A). In addition, a large number of excitable CA1 neurons (19%) were reactivated when the mice were trained in a new context. This number was only slightly lower than that observed when mice were trained in the same context twice (26%) and significantly higher than reactivation in homecage controls (4%) (Figure 2C). We suggest, therefore, that NMDAR-independent learning is mediated by the activation of excitable hippocampal neurons. To test this idea directly, follow-up studies will need to block increases in excitability or prevent the reactivation of excitable cells and show that NMDAR-independent learning is eliminated.

The finding that plasticity is induced by NMDARs and refined by other mechanisms has also been observed in the barrel cortex. In this case, activation of NMDARs is required to initiate plasticity following whisker trimming, but not for additional changes in synaptic strength that occur hours to days later. Instead, these latter changes are mediated by the activation of mGluRs (Clem, Celikel, & Barth, 2008). If mice are trained on a whisker discrimination task during this latter phase, learning is blocked by the administration of an mGluR antagonist but is

not affected by an NMDAR antagonist. We determined if a similar process occurs in the hippocampus after context fear learning. As expected, context conditioning in naïve animals was blocked by the NMDAR antagonist APV. However, if the mice were trained in two contexts, learning about the second environment was not affected by APV but instead by infusions of the mGluR antagonist MCPG. This result suggests that metaplastic changes in the hippocampus (induced by learning) may be similar to those observed in the barrel cortex. Follow-up experiments are needed to determine if the induction of LTP on excitable hippocampal neurons is also dependent on mGluRs but not NMDARs.

Finally, it should be mentioned that context fear memories can also be formed in the ventral hippocampus (Wang *et al*, 2012). It is possible, therefore, that animals use this mechanism to learn when APV is infused into the dorsal hippocampus. However, we and others have shown that systemic injections of NMDAR antagonists (which affect the entire hippocampus) do not prevent context fear learning in pre-trained animals (Tayler *et al*, 2011; Wiltgen *et al*, 2010, 2011). Moreover, selective lesions of the dorsal hippocampus produce dense amnesia for both NMDAR-dependent and NMDAR-independent context fear memories (Tayler *et al*, 2011). In addition, the current MCPG data indicates that plasticity mechanisms in the dorsal hippocampus are engaged during NMDAR-independent learning and are required for memory formation. Nonetheless, future studies will need to look closely at the contribution of the ventral hippocampus and clarify the plasticity mechanisms that are required in that region.

In summary, our data suggest that NMDARs are not always required for memory formation. These receptors appear to be selectively engaged when an animal learns a behavioral task for the first time. Once learning has occurred, new memories can be formed on the same task (or a similar one) via the activation of mGluRs. We hypothesize that mGluR-mediated plasticity occurs on excitable hippocampal neurons that were active during the original learning experience.

Acknowledgments

These experiments were supported by a Whitehall Foundation Research Grant to B.J.W. and a CNPq/Brazil graduate fellowship to A.P.C “SWE Process: 202250/2015-6”

Funding and Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 *Hippocampal neurons become more excitable after context fear learning*

(A) Action potential firing rates evoked by depolarizing current injection from GFP⁺ and control CA1 pyramidal neurons recorded from TetTag mice after fear conditioning. Data represent mean \pm SEM. A two-way repeated measures ANOVA (group \times current step) had a significant effect of group. The GFP⁺ group (n=9 cells, 4 animals) had a higher firing rate per current injection than the control (GFP⁻) group (n=8 cells, 5 animals). Right, sample traces from GFP⁺ (gray) and control (other gray) neurons with a 100 pA current injection (scale bars: 250 msec, 20 mV) **(B)** Resting membrane potential is unchanged between control (mean, -63.8 ± 1.2 mV) and GFP⁺ (mean, -64.1 ± 1.0 mV) neurons. Error bars represent SEM. Significance values were set at $p < .05$ (*), $.01$ (**), $.001$ (***), and $.0001$ (****).

Figure 2 *Relearning activates excitable hippocampal neurons*

(A) Experimental design. Animals were trained and active neurons tagged with GFP in context A, then retrained in A, B, or not retrained (\emptyset) (n = 4, 4, 5), and tissue stained for c-Fos expression. **(B)** Percent freezing in the retraining context (white: A, gray: B) during the three-minute baseline (BL) and the final minute post-shock. Low baseline freezing in context B indicates that mice were able to discriminate between contexts. **(C)** Reactivation of neurons when retrained in A (white) B (gray) or no retraining (black), as measured by percent of GFP neurons expressing c-Fos. Reactivation in A was significantly higher than reactivation in B, and reactivation in A or B was significantly higher than reactivation with no retraining. Error bars represent SEM. Significance values were set at $p < .05$ (*).

Figure 3: *Initial learning requires NMDARs while subsequent learning is mediated by mGluRs*

Mice were fear conditioned in context A followed by training in context B 3 days later. The NMDAR antagonist APV or the group I/II mGluR antagonist MCPG was infused into the dorsal hippocampus 15 minutes prior to training in context A or context B. **(A)** APV impaired learning when infused prior to training in context A and no subsequent deficit was observed when these mice were trained in context B (n = 8 saline, 9 APV). **(B)** APV infusion prior to training in context B had no effect in memory encoding (n = 8 saline, 9 APV). **(C)** MCPG did not cause a memory deficit when infused prior to training in context A and mice were able to learn subsequent conditioning in context B (n = 5 saline, 5 MCPG). **(D)** Mice previously conditioned in context A demonstrated a memory impairment when MCPG was infused preceding training in context B (n = 14 saline, 7 MCPG). Low baseline freezing levels in context B indicate that mice were able to discriminate between contexts. Error bars represent SEM. Significance values were set at $p < .05$ (*).

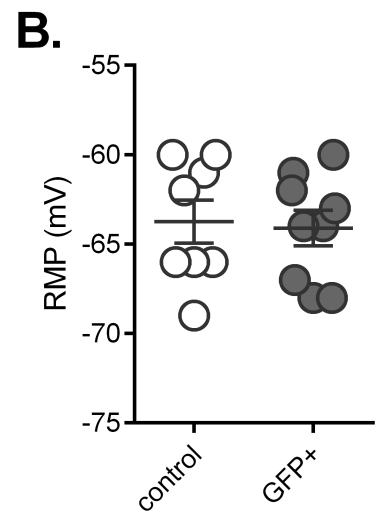
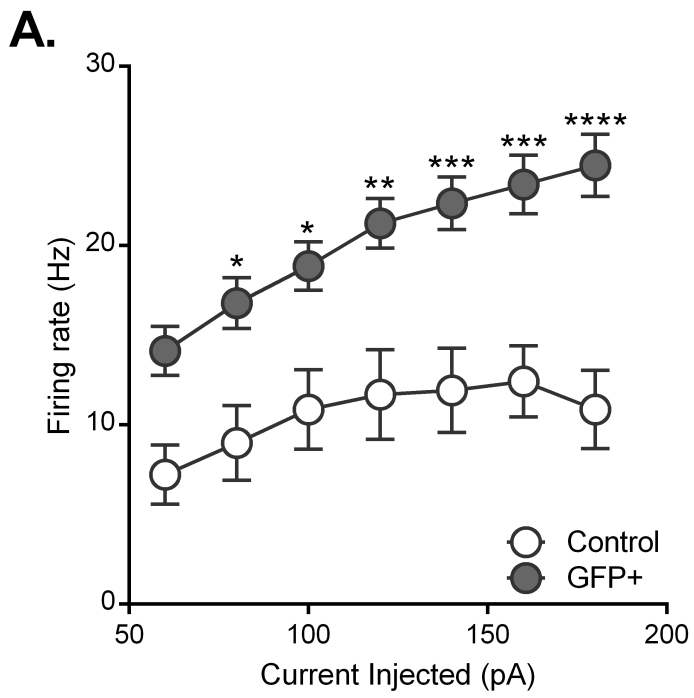
Supplemental figures

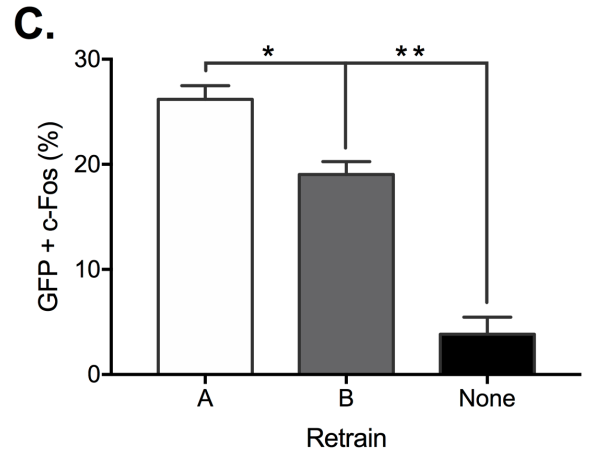
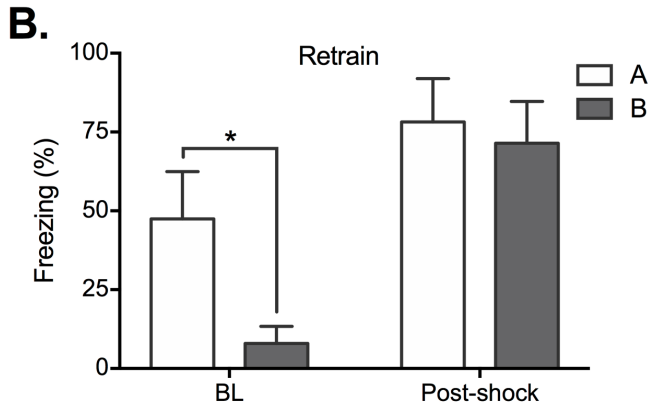
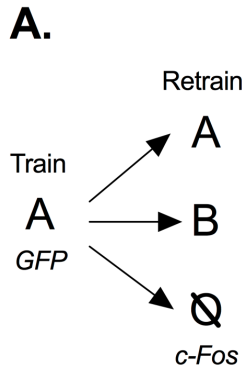
Illustration of injection cannula placements in the dorsal hippocampus. Placements represented are from all mice included in the final analysis. Mice that received the same drug infusion were combined in the same image. **(A):** saline (N = 35), **(B):** APV (N = 18), **(C):** MCPG (N = 12). Atlas templates were adapted from "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates", G Paxinos and KBJ Franklin (Academic Press).

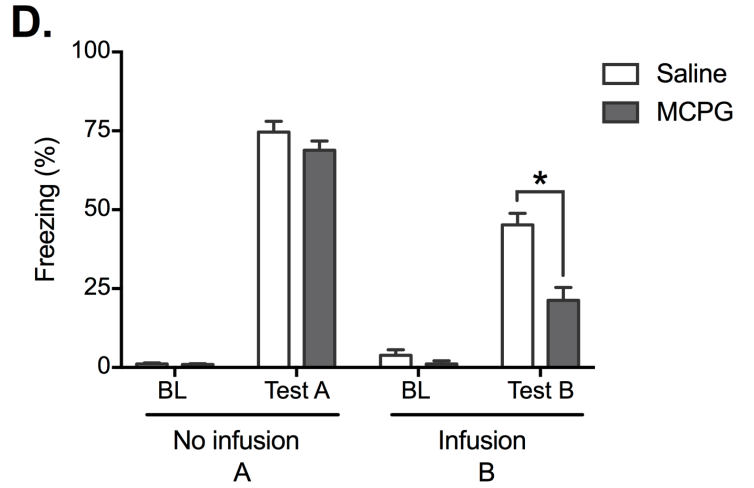
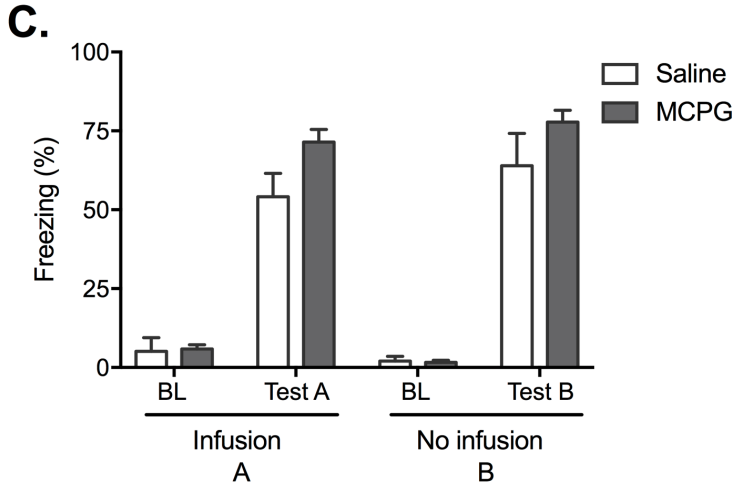
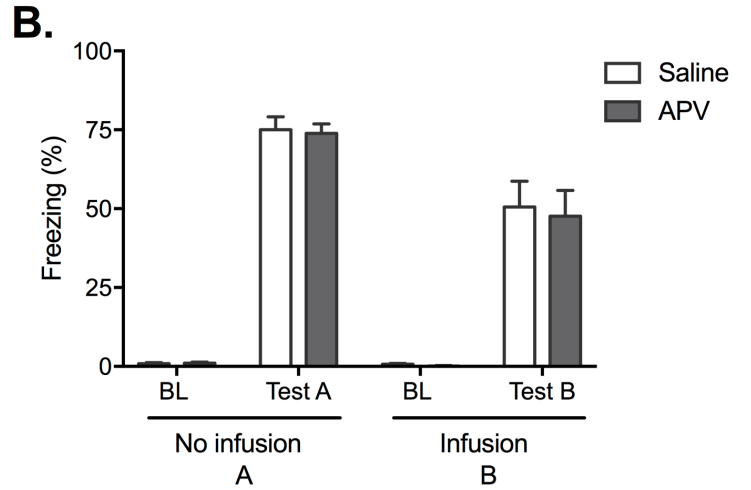
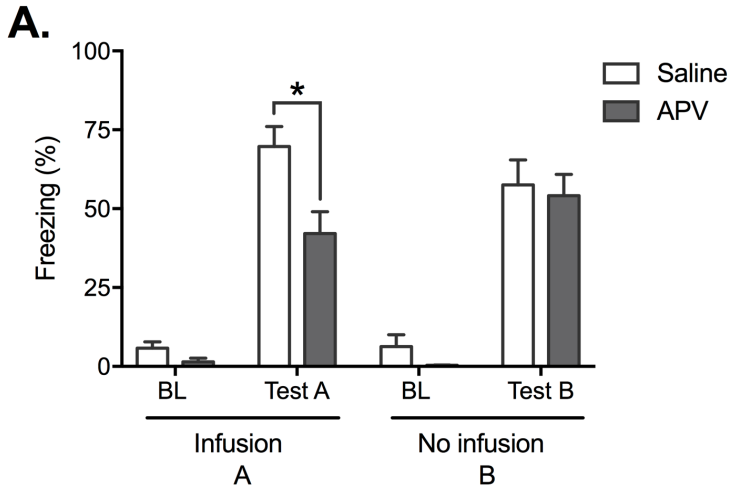
References

- Anagnostaras SG (2010). Automated assessment of Pavlovian conditioned freezing and shock reactivity in mice using the VideoFreeze system. *Front Behav Neurosci* **4**: .
- Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RGM (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* **378**: 182–186.
- Bouton ME (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of pavlovian learning. *Psychol Bull* **114**: 80–99.
- Cai DJ, Aharoni D, Shuman T, Shobe J, Biane J, Song W, *et al* (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature* **534**: 115–118.
- Clem RL, Celike T, Barth AL (2008). Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science (80-)* **319**: 101–104.
- Elgersma Y, Silva a J (1999). Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* **9**: 209–213.
- Morris, R. G., Davis, S., & Butcher, S. P. (1990). Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **329**(1253): :187-204.
- Moyer JR, Thompson LT, Disterhoft JF (1996). Trace eyeblink conditioning increases CA1 excitability in a transient and learning-specific manner. *J Neurosci* **16**: 5536–5546.
- Nakazawa Y, Pevzner A, Tanaka KZ, Wiltgen BJ (2016). Memory retrieval along the proximodistal axis of CA1. *Hippocampus* **26**: 1140–1148.
- Nicoll RA, Schmitz D (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* **6**: 863–876.
- Quinlan EM, Lebel D, Brosh I, Barkai E (2004). A Molecular Mechanism for Stabilization of Learning-Induced Synaptic Modifications. *Neuron* **41**: 185–192.
- Ramirez S, Liu X, Lin P-A, Suh J, Pignatelli M, Redondo RL, *et al* (2013). Creating a false memory in the hippocampus. *Sci (New York, NY)* **341**: 387–391.
- Reijmers LG, Mayford M (2009). Genetic control of active neural circuits. *Front Mol Neurosci* **2**: 1–8.
- Saar D, Barkai E (2003). Long-term modifications in intrinsic neuronal properties and rule learning in rats. *Eur J Neurosci* **17**: 2727–2734.
- Saucier D, Cain DP (1995). Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature* **378**: 186–189.
- Tanaka KZ, Pevzner A, Hamidi AB, Nakazawa Y, Graham J, Wiltgen BJ (2014). Cortical Representations Are Reinstated by the Hippocampus during Memory Retrieval. *Neuron* **84**: 347–354.
- Taylor KK, Lowry E, Tanaka K, Levy B, Reijmers L, Mayford M, *et al* (2011). Characterization of NMDAR-Independent Learning in the Hippocampus. *Front Behav Neurosci* **5**: 1–12.
- Ting JT, Daigle TL, Chen Q, Feng G (2014). Acute brain slice methods for adult and aging animals: Application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. *Methods Mol Biol* **1183**: 221–242.
- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, *et al* (2007). Schemas and Memory Consolidation. *Science (80-)* **316**: 76–82.
- Tse D, Takeuchi T, Kakeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, *et al* (2011). Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex. *Science (80-)* **333**: 891–895.
- Wang H, Ardiles AO, Yang S, Tran T, Posada-Duque R, Valdivia G, *et al* (2016). Metabotropic Glutamate Receptors Induce a Form of LTP Controlled by Translation and Arc Signaling in the Hippocampus. *J Neurosci* **36**: 1723–1729.
- Wang S-H, Redondo RL, Morris RGM (2010). Relevance of synaptic tagging and capture to the

- persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19537–42.
- Wang SH, Finnie PSB, Hardt O, Nader K (2012). Dorsal hippocampus is necessary for novel learning but sufficient for subsequent similar learning. *Hippocampus* **22**: 2157–2170.
- Wiltgen BJ, Royle GA, Gray EE, Abdipranoto A, Thangthaeng N, Jacobs N, *et al* (2010). A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One* **5**: .
- Wiltgen BJ, Wood AN, Levy B (2011). The cellular mechanisms of memory are modified by experience. *Learn Mem* **18**: 747–750.
- Winocur G (1984). The effects of retroactive and proactive interference on learning and memory in old and young rats. *Dev Psychobiol* **17**: 537–545.

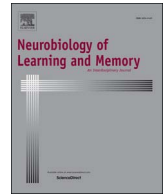






4. CAPÍTULO II

Artigo científico intitulado: *Hippocampal plasticity mechanisms mediating experience-dependent learning change over time* — publicado em 2018 na revista *Neurobiology of Learning and Memory*, 150:56-63.



Hippocampal plasticity mechanisms mediating experience-dependent learning change over time

Ana Paula Crestani^{a,b}, Rodrigo Ordoñez Sierra^{a,b}, Adriano Machado^{a,b}, Josué Haubrich^{a,b},
Krislei Martin Scienza^{a,b}, Lucas de Oliveira Alvares^{b,c}, Jorge Alberto Quillfeldt^{a,b,*}

^a Psychobiology and Neurocomputation Lab, Biophysics Department, Bioscience Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

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

^c Neurobiology of Memory Lab, Biophysics Department, Bioscience Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Experience-dependent learning
Systems-level consolidation
NMDA receptor
Hippocampus
Anterior cingulate cortex

ABSTRACT

The requirement of NMDA receptor (NMDAR) activity for memory formation is well described. However, the plasticity mechanisms for memory can be modified by experience, such that a future similar learning becomes independent of NMDARs. This effect has often been reported in learning events conducted with a few days interval. In this work, we asked whether the NMDAR-independency is permanent or the brain regions and plasticity mechanisms of experience-dependent learning may change over time. Considering that contextual memories undergo a gradual reorganization over time, becoming progressively independent from the hippocampus and dependent upon cortical regions, we investigated the brain regions mediating a new related learning conducted at a remote time-point, when the first memory was already cortically established. First, we demonstrated that anterior cingulate cortex was not able to support a learning subsequent to a previous systems-level consolidated memory; it did require at least one functional subregion of the hippocampus (ventral or dorsal). Moreover, after replicating findings showing that a few days interval between trainings induces a NMDAR-independent learning, we managed to show that a learning following a longer interval once again becomes dependent on NMDARs in the hippocampus. These findings suggest that while the previous memory grows independent from the hippocampus over time, an experience-dependent learning following a systems-consolidated memory once again engages the hippocampus and a NMDAR-dependent plasticity mechanism.

1. Introduction

Decades of research have led to significant advances in our understanding of the brain mechanisms underlying learning and memory. However, this knowledge was built almost exclusively on experimental models employing *naïve animals*, who typically undergo a single learning experience in their whole life. This is problematic since in real-life situations we are continuously forming new memories, which may involve important neurobiological adaptations that are poorly understood. Consistent evidence begins to emerge from a handful of studies pointing to a decisive role of previous experiences in how subsequent learning is encoded (for review see Crestani & Quillfeldt, 2016).

Memories and synapses are dynamic in nature and capable of strengthening and weakening depending on behavioral tasks and stimulation protocols (Dudek & Bear, 1993; Kealy & Commins, 2010). It is well established that memory consolidation involves NMDAR-mediated synaptic plasticity (Cercato et al., 2014; Fanselow & Kim, 1994; Huerta,

Sun, Wilson, & Tonegawa, 2000; Inglis, Martin, & Morris, 2013; Kim, DeCola, Landeira-Fernandez, & Fanselow, 1991; Morris et al., 1986, 2013; Morris, 1989; Shimizu, 2000; Tsien, Huerta, & Tonegawa, 1996). However, synapses are capable of metaplasticity, whereby prior exposure (either behavioral or electrophysiological) can alter the plasticity of synapses (Bienenstock & Munro, 1982). In other words, prior experience may cause modifications in the plasticity mechanisms that will then support a following learning. If animals have previously learned a task, the subsequent memory acquisition of a similar task will not depend on NMDAR recruitment. This phenomenon was demonstrated in different hippocampus-dependent behavioral tasks, such as the water maze (Bannerman, Good, Butcher, Ramsay, & Morris, 1995; Saucier & Cain, 1995; Saucier, Hargreaves, Boon, Vanderwolf, & Cain, 1996), contextual fear conditioning (Caramanos & Shapiro, 1994; Inglis et al., 2013; Sanders & Fanselow, 2003; Taylor et al., 2011; Wiltgen et al., 2010, 2011) and inhibitory avoidance (Cammarota, Bevilaqua, Köhler, Medina, & Izquierdo, 2005; Roesler et al., 1998). Furthermore,

* Corresponding author at: Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (Psychobiology and Neurocomputation Lab), Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail address: quillfe@ufrgs.br (J.A. Quillfeldt).

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.02.020>

Received 18 August 2017; Received in revised form 2 January 2018; Accepted 19 February 2018

Available online 01 March 2018

1074-7427/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

it was shown that NMDAR-independent learning only occurs when animals are subsequently trained in the same task (Wiltgen, Wood, & Levy, 2011), requiring at least a certain degree of similarity between contexts (Tayler et al., 2011). Behavioral protocols used to evince and study NMDAR-independent learning usually have an interval of a few days between subsequent trainings. To this day, however, longer intervals have not been evaluated.

Another phenomenon that may take place with longer training-test intervals is systems consolidation, in which memories undergo a gradual brain reorganization over time (Frankland & Bontempi, 2005). With the assistance of activity-related genes (c-fos, Arc or Zif268, see Barry et al., 2016 for differences between them) or metabolic imaging activity ($[^{14}\text{C}]2\text{-deoxyglucose}$), it was shown that over intervals of several weeks, memory retrieval depends progressively less on the hippocampus while, in parallel, an increasing engagement of the cortical areas takes place (Bontempi, Laurent-Demir, Destrade, & Jaffard, 1999; Frankland, Bontempi, Talkton, Kaczmarek, & Silva, 2004; Kitamura et al., 2017; Maviel, 2004). Evidence points to the anterior cingulate cortex (ACC) as a repository of remote memories necessary to support their retrieval in a later moment (Bontempi et al., 1999; Cain, Saucier, Hall, Hargreaves, & Boon, 1996; Ding, Teixeira, & Frankland, 2008; Frankland, 2004; Haubrich et al., 2016; Kitamura et al., 2017; Lopez et al., 2012; Maviel, 2004; Teixeira, Pomedli, Maei, Kee, & Frankland, 2006; Weible, Rowland, Monaghan, Wolfgang, & Kentros, 2012). Despite the wealth of studies demonstrating the dependence of remote memories on the ACC, it remains unclear whether this area is also required to support the acquisition of a similar learning experience at a remote time point.

Thus, our main aim here was to investigate whether a hippocampus-independent remote memory can affect the acquisition of a subsequent memory, checking for the neuroanatomical and neurochemical changes verified. In the first experiment, we analyzed whether the retrieval of remote memory was effectively independent from the hippocampus, while in the second one, we investigated the ACC and HPC engagement in the encoding of a learning event subsequent to a memory already consolidated at the systems-level. Finally, we evaluated the plasticity mechanisms that mediate this experience-dependent learning by testing NMDAR dependence or independence either at a recent (3-day), or a remote (40-day) time point.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing 250–350 g from our University breeding colony (CREAL/UFRGS) were used. Animals were housed in plastic cages, five per cage, under a 12 h light/dark cycle and at constant temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$, with water and food ad libitum. All experiments were conducted in accordance to local animal care guidelines (Brazilian Federal Law 11,794/2008) and approved by the Ethics in the Use of Experimental Animals Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA, Project UFRGS #28,277).

2.2. Behavioral procedure - contextual fear conditioning (CFC)

To create a learning event subsequent to a previous memory, rats underwent fear conditioning in context A followed by context B.

All experiments (with the exception of Experiment 1A) consisted of pre-exposure to the grid floors (day 1 and 2), training in context A (day 3), test in context A (day 4), training in context B (day 6 or day 43) and test in context B (day 7 or 44) – as described in detail below (see also figures schematics).

For the *recent memory* condition, training in context B was conducted 3 days after training in context A while in the *remote memory* condition, context B training was conducted 40 days later. Testing was always performed one day following training.

Each conditioning chamber was placed in a different room with constant fan background noise. All chambers consisted of the same grid floor: parallel 0.1 cm caliber stainless copper bars spaced 1.0 cm apart and were cleaned with 70% ethanol. The chamber where animals were *pre-exposed* was a rectangular beige Plexiglas box ($20 \times 50 \times 22$ cm). *Context A* was a square white Plexiglas box ($22 \times 22 \times 25$ cm) while *context B* consisted of a circular polyvinyl chloride box with black and white vertical stripes (diameter: 25 cm, height: 22 cm) and vanilla scent was added to the room; some drops of scent were put in a cotton inside a petri dish that was in a bench near to where animals were conditioned. The only similarity between context A and B was the grid floor.

Animals were pre-exposed to the grid floor for 10 min each day for two days prior to the contextual fear conditioning training which took place on day 3. During the training session, animals were habituated to the context (A or B) for a 3-min baseline period, and then received two 2-s, 0.5 mA footshocks separated by a 30-s interval. They were kept in the conditioning environment for an additional 30-s before they were returned to their homecage. Test sessions consisted of measuring the animal's freezing response during a 4 min re-exposure to the previously trained context.

During the training and test sessions freezing behavior was recorded by stopwatch minute by minute by an experienced observer, blind to the treatment groups. Freezing behavior was defined as the absence of all movements except those related to breathing, and expressed as percentage of total session time.

In the experiment 1A (Experiment 1A), rats were re-tested in context A 40 days after training, rather than trained in context B. This experiment was performed to evaluate whether in our protocol remote memory retrieval was hippocampus-independent.

2.3. Stereotaxic surgery and cannulation

Animals were anesthetized with a ketamine and xylazine association (75 and 10 mg/kg, respectively) infused intraperitoneally. Guide cannulae (22 gauge) were implanted bilaterally at dHPC, vHPC or ACC positioned just 1.0 mm above the target brain region (according to Paxinos & Watson, 1998). Cannulae were positioned at the following coordinates with respect to Bregma (mm): $-4.0 \text{ A/P}, \pm 3.0 \text{ M/L}, -1.6 \text{ D/V}$ (from brain surface) for CA1 region of the dHPC; $-6.0 \text{ A/P}, \pm 5.0 \text{ M/L}, -6.5 \text{ D/V}$, for CA1 region of the vHPC; $+2.7 \text{ A/P}, \pm 0.5 \text{ M/L}, -1.5 \text{ D/V}$, for ACC. Rats were allowed to recover for 6–7 days prior to behavioral testing. Animals were injected three times subcutaneously with antibiotic (tylosin – 1 mg/kg) and anti-inflammatory drug (meloxicam - 1.5ml/kg), once immediately preceding the surgery and again once daily, for two days following the surgery.

2.4. Drugs and infusion

Fifteen minutes prior to re-test on context A (Experiment 1A), training on context A (Experiment 2A) or training on context B (all others experiments, also including Experiment 2A) drugs (muscimol or AP5) or vehicle were infused into the target region with a 27 gauge injection cannula. Bilateral infusions were administered simultaneously using a two-syringe micropump. In 4-cannulae experiments, one side of a brain region (e.g., right dHPC) was infused simultaneously with the contralateral side of the other brain area (left ACC), and vice versa. The injectors were left in place for 30 s after the end of the infusion to allow for diffusion. The rats were then returned to their homecage until testing.

Muscimol (Sigma-Aldrich), a GABA_A receptor agonist, was dissolved in a phosphate-buffered saline (PBS) solution to a concentration of $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ and it, or its vehicle, was infused into the target brain region at a slow rate ($20 \mu\text{l}/\text{h}$) in a volume of $0.5 \mu\text{l}/\text{hemisphere}$, 15 min prior to CFC training in context B. The muscimol infusion was used to suppress neuronal firing, thereby temporarily inactivating brain regions of interest.

AP5 (Sigma-Aldrich), an NMDAR antagonist, was diluted in phosphate-buffered saline solution to a concentration of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and it, or its vehicle, was infused locally into the target brain region at a slow rate (20 $\mu\text{l}/\text{h}$) in a volume of 1.0 $\mu\text{l}/\text{hemisphere}$, 15 min prior to CFC training in context A or B.

2.5. Histology

Following the completion of the behavioral experiments, cannulae placements were verified by injecting 0.5 or 1 μl (the same volume of the drug infused) of methylene blue through the guide cannula. The brains were dissected and fixed in 10% formaldehyde in order to verify cannulae placement under low magnification ($4\times$). If the dye was not observed in the proper place, behavioral data from that rat was excluded from analyses. Cannula placements for each experiment are represented in the [supplementary material](#).

2.6. Statistical analysis

After checking for normality (Kolmogorov-Smirnov Test), data was analyzed by a 2×2 mixed-model ANOVA considering as a repeated measure (within measure) only one of the factors, i.e. the context/time that animals were tested (context A vs. context B). The group factor (veh vs. drug) was considered a between measure. Student-Newman-Keuls was used as a post hoc test and significance was set to $P < 0.05$, using Statistica version 7.

3. Results

3.1. Previously acquired, cortically dependent remote memory does not support the acquisition of a similar learning experience

Hippocampal dependency of memory retrieval is usually tested by dorsal hippocampus inhibition (Anagnostaras, Maren, & Fanselow, 1999; Frankland, 2004; Kim & Fanselow, 1992; Maviel, 2004), despite the fact that some have proposed a potential regional compensation within the hippocampus, between dorsal and ventral division when inactivations are performed separately (de Hoz & Martin, 2014; Keinath et al., 2014; Wang, Finnie, Hardt, & Nader, 2012). In light of this possibility, we first tested whether retrieval of remote memory is independent of the entire hippocampus (dHPC + vHPC) infusing the GABA_A agonist muscimol directly into hippocampus. Animals were trained in context A and tested in the same context 40 days later (see Materials and Methods for details). A 2×2 mixed-model ANOVA showed that inactivation of dHPC + vHPC before testing at a remote time point did not impair memory retrieval. No significant effects of drug ($F_{(1,12)} = 0.0442$, $P = 0.8370$) or time * drug interaction were observed ($F_{(1,12)} = 0.0000$, $P = 0.9960$) (Fig. 1A), indicating that remote memory retrieval does not depend on hippocampal activity. Also, a significant effect of time was observed ($F_{(1,12)} = 25.3357$, $P = 0.0002$), such freezing response was lower at a remote time point when compared to one day after training, suggesting that the memory had weakened over time. The lower freezing levels displayed in the 1A experiment seems to be just a local spurious effect – probably due to the immobilization procedure needed for the drug infusion – since in retest session (data not shown) where no previous immobilization was necessary, freezing response was much higher remaining similar to that observed 24 h after training. Also, animals that were directly exposed to the same footshocks ($4 \times 0.5 \text{ mA}/1\text{s}$) before immediate removal were not able to establish a contextual association, demonstrating no freezing expression (data not shown).

Since previous works demonstrated that the retrieval of remote memories is often supported by ACC (Haubrich et al., 2016; Frankland, 2004; Maviel, 2004), we chose to evaluate whether the ACC would also be able to support the acquisition of a learning event subsequent to a memory previously consolidated at the systems level. To this end,

animals were infused with GABA_A agonist muscimol directly into ACC before the second training. Two-factor mixed design ANOVA revealed no effect of context ($F_{(1,14)} = 1.3877$, $P = 0.2584$), drug ($F_{(1,14)} = 0.1971$, $P = 0.6638$) or context * drug interaction ($F_{(1,14)} = 1.2268$, $P = 0.2867$) (Fig. 1B).

Considering that the inactivation of the ACC did not impair acquisition of subsequent learning, we next tested whether hippocampus would once again be required for subsequent contextual fear conditioning. First, dorsal (dHPC) or ventral hippocampus (vHPC) requirement were evaluated separately. After that, simultaneous inactivation of both areas (dHPC + vHPC) was performed to avoid a possible compensatory effect that could occur between both hippocampal subregions (de Hoz & Martin, 2014; Wang et al., 2012). Two-factor mixed design ANOVA revealed that dHPC inactivation did not cause memory impairment. There was no effect of context ($F_{(1,14)} = 0.1776$, $P = 0.6798$), drug ($F_{(1,14)} = 0.020$, $P = 0.8886$) or context * drug interaction ($F_{(1,14)} = 0.5443$, $P = 0.4728$) (Fig. 1C) were observed. Likewise, vHPC inactivation did not cause memory impairment; Two-factor mixed design ANOVA revealed no significant effect of context ($F_{(1,17)} = 0.1299$, $P = 0.7229$), drug ($F_{(1,17)} = 2.3763$, $P = 0.1415$) or context * drug interaction ($F_{(1,17)} = 0.3814$, $P = 0.5450$) (Fig. 1D). However, 2×2 mixed-model ANOVA revealed that inhibition of the entire hippocampus (dHPC + vHPC) caused a significant effect of context * drug interaction ($F_{(1,17)} = 5.7585$, $P = 0.02814$). Newman-Keuls post-hoc analysis showed that the MUS group demonstrated a learning impairment when compared to the VEH group in context B ($P = 0.0120$) (Fig. 1E).

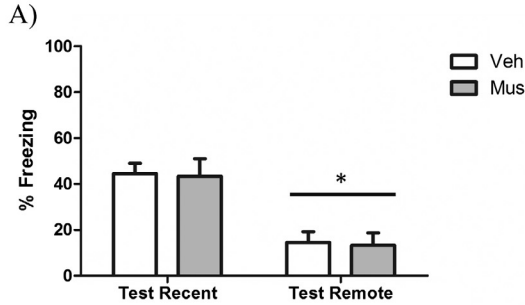
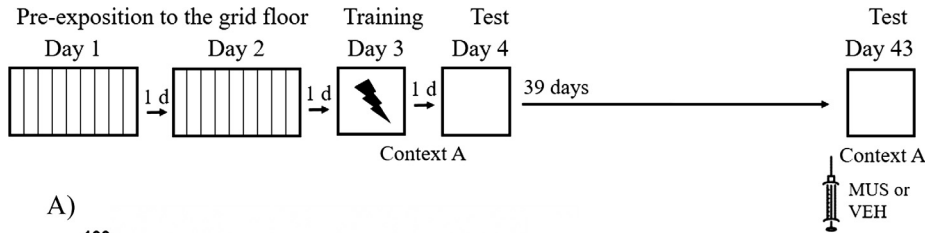
Therefore, our results collectively demonstrate that only the inactivation of the entire hippocampus (Fig. 1E) was able to impair the encoding of a learning event subsequent to a similar memory previously consolidated at systems level (Fig. 1A). In contrast, inactivation of just the dorsal (Fig. 1C) or the ventral (Fig. 1D) HPC, or of the ACC (Fig. 1B), did not impair memory retrieval. These results suggest that at least one hippocampal subregion is required for acquisition of an experience-dependent learning following a previously acquired, systems-consolidated memory.

3.2. Hippocampal synaptic plasticity induced by the first learning has a time-dependent influence on the experience-dependent learning

Since the hippocampus seems to be required for learning subsequent to a systems consolidated memory, we then investigated whether hippocampal plasticity induced by the first experience could still influence the subsequent learning at a remote time point. Our prediction was that the plasticity mechanisms would “reset”, since the older memory is already independent of hippocampus. In the last experiment we demonstrated that at least one hippocampal subregion is reengaged for the acquisition of the subsequent learning. Thus, if the hippocampus is again required to memory encoding, it is possible that a resetting of plasticity mechanisms would also occur. For comparison, an experience-dependent learning experiment was performed at a recent (3 days) or remote (40 days) time point relative to the previously formed memory.

In both experiments animals were simultaneously infused with the NMDAR-antagonist AP5 into both the dHPC and vHPC before the second fear conditioning session. In the 3-day interval, two-factor mixed design ANOVA revealed a significant effect of context * drug interaction ($F_{(1,13)} = 14.6454$, $P = 0.0021$). In this experiment, Newman-Keuls post-hoc analysis indicated that subsequent conditioning in context B was not reduced for NMDAR-antagonist AP5 ($P = 0.8269$), suggesting that learning subsequent to a previously consolidated recent memory remains independent from NMDARs (Fig. 2A). Additionally, AP5 impaired the learning of the first training ($P = 0.0370$), an effect that was not affected by pre-exposures to the grid floor. This result confirms the already established idea that first-time learning requires NMDAR while similar, subsequent learning does not (Bannerman et al.,

I. Retrieval of remote memory



II. Brain structures recruited for acquisition of a learning subsequent to a remote memory

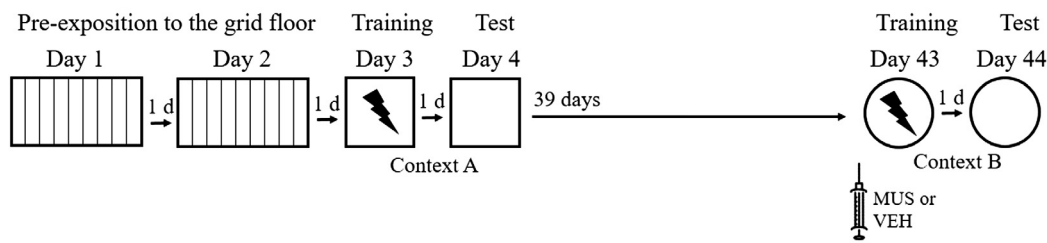
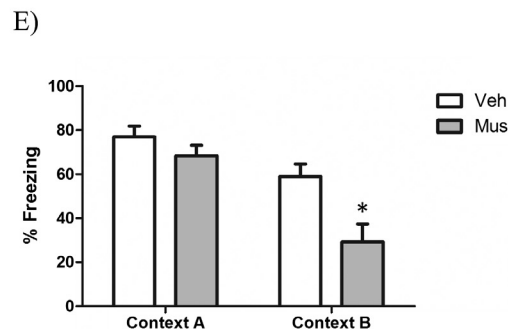
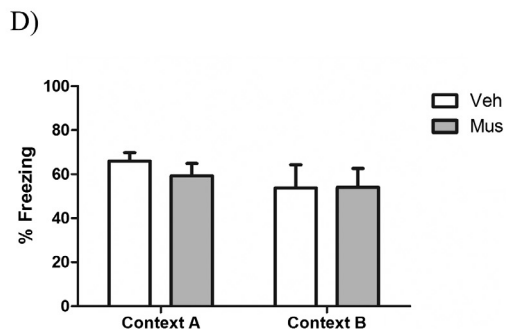
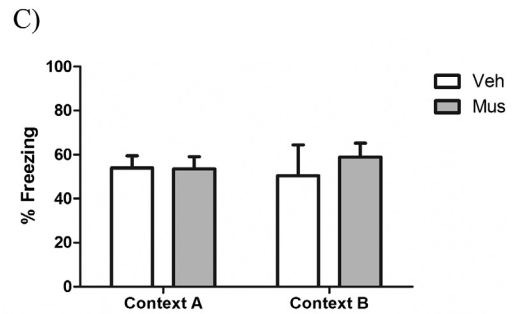
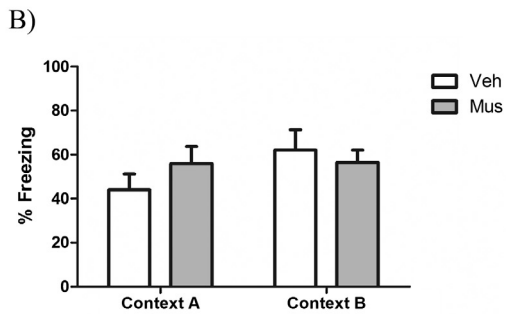


Fig. 1B. ACC
 Fig. 1C. dHPC
 Fig. 1D. vHPC
 Fig. 1E. dHPC + vHPC



(caption on next page)

1995; Tayler et al., 2011; Wiltgen et al., 2011; Wang et al., 2012).

In contrast, at the 40-day interval, two-factor mixed design ANOVA demonstrated a significant *context * drug* interaction ($F_{(1,14)} = 12.8449$,

$P = 0.0029$), and Newman-Keuls *post-hoc* analysis showed that the AP5 group had a learning impairment when compared to the VEH group in *context B* ($P = 0.0368$), confirming that learning subsequent to a

Fig. 1. Acquisition of an experience-dependent learning after systems consolidation of a previous memory requires the hippocampus and does not recruit the ACC. (I and II) Experimental design. Rats were pre-exposed to the grid floor (day 1 and day 2) for 10 min, fear conditioned in context A (day 3) and tested in the same context (day 4). In the first experiment, animals were then re-tested on context A 40 days after training. In all the following experiments, rats were trained on context B 40 days after training on context A. Vehicle or muscimol (GABA_A agonist) was infused bilaterally into target regions immediately prior to training in context B. Contextual fear memory (% freezing) was assessed 24 h after each training session. (A) Retrieval of remote memory is independent of the entire hippocampus (N = 7, 7). (B) Pharmacological inactivation of ACC using muscimol did not impair subsequent, experience-dependent learning when animals have a previously systems-consolidated, remote memory (N = 7, 9). Encoding of a learning subsequent to a memory previously consolidated at the systems-level is impaired only when the entire hippocampus (E), N = 9, 10, but not when just its dorsal (C), N = 7, 9 or ventral longitudinal (D), N = 9, 10 divisions, are inactivated. Data represented as percent of freezing time during test session and expressed as mean \pm S.E.M. (*) Significantly different from the respective control group ($P < 0.05$; effect of groups, two-factor mixed design ANOVA).

remote memory once again requires NMDAR in the hippocampus (Fig. 2B).

4. Discussion

Our results indicate that learning subsequent to a systems-level consolidated, remote memory (Fig. 1A) is not supported by ACC (Fig. 1B) and requires at least one functional subregion of the hippocampus (ventral or dorsal – Fig. 1C, D and E). Additionally, synaptic plasticity induced by the first learning has a time-dependent influence on the experience-dependent learning. It is NMDAR-independent when experience-dependent learning occurs at a recent time point (Fig. 2A) and becomes once again dependent on NMDAR when it occurs at a remote time point (Fig. 2B).

Contextual aversive memories are known to depend on the dorsal hippocampus which plays a critical role in processing cognitive maps (Bird & Burgess, 2008; Cohen, 2015; Moscovitch et al., 2005; Martin & Clark, 2007; Nadel, Hupbach, Gomez, & Newman-Smith, 2012). However, representation of the environment loses details over time, a phenomenon termed memory generalization, which has also been correlated with systems consolidation (Winocur, Moscovitch, & Sekeres, 2007). Hence, the hippocampus has a time-dependent role in memory retrieval that parallels the progressive take over of cortical areas (Anagnostaras et al., 1999; Frankland, 2004; Kim & Fanselow, 1992; Maviel, 2004), and the consequent increase in memory generalization (De Oliveira Alvares et al., 2013; Moscovitch, Nadel, Winocur, Gilboa, & Rosenbaum, 2006; Wang, Teixeira, Wheeler, & Frankland, 2009). In some situations, hippocampal neurons may still be involved in the recall of remote memories especially those with episodic details (Frankland & Bontempi, 2005).

Nevertheless, research on systems consolidation usually targets the dorsal division of the hippocampus precluding wider conclusions involving other subregions such as the ventral hippocampus (Anagnostaras et al., 1999; Frankland, 2004; Kim & Fanselow, 1992; Maviel, 2004; Teixeira et al., 2006). Although dHPC and vHPC have slightly different circuitries, projecting to different brain regions (Bannerman et al., 1999; Biedenkapp & Rudy, 2008; Hunsaker, Fieldsted, Rosenberg, & Kesner, 2008; Jankord et al., 2011; Padilla-Coreano et al., 2016; Phillips & LeDoux, 1992; Richmond et al., 1999; Zhang, Bast, Xu, & Feldon, 2014), there are indications that one hippocampal subregion may compensate for the other when the other happens to be inactivated (de Hoz & Martin, 2014; Keinath et al., 2014; Wang et al., 2012).

In this work, we inactivated both dHPC and vHPC to determine whether remote memory retrieval is independent of the entire hippocampus. Our data demonstrates that whole hippocampus inactivation does not impair remote memory retrieval, supporting the standard model of systems consolidation (Fig. 1A). This is in accordance with

whether remote memory retrieval is independent of the entire hippocampus. Our data demonstrates that whole hippocampus inactivation does not impair remote memory retrieval, supporting the standard model of systems consolidation (Fig. 1A). This is in accordance with

NMDAR recruitment for a learning subsequent to a *recent* vs a *remote* memory

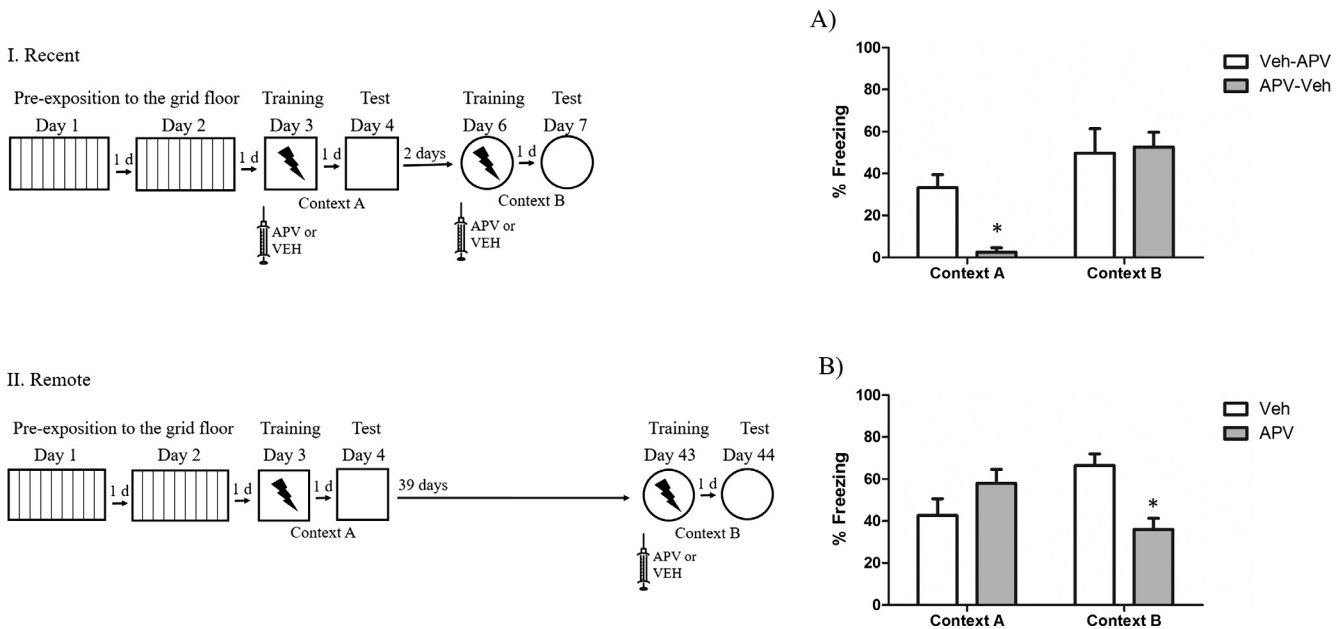


Fig. 2. Learning subsequent to a recently consolidated memory is NMDAR-independent, while learning subsequent to a remote, systems-level consolidated memory once again requires NMDAR in the hippocampus. (I and II) Experimental design. Rats were pre-exposed to the grid floor (day 1 and day 2) for 10 min, fear conditioned in context A (day 3) and tested in the same context (day 4). Animals were then trained on context B (day 6) to evaluate the influence of recent memory on subsequent learning plasticity. Vehicle or APV (NMDAR antagonist) was infused bilaterally into target regions immediately prior to training in context A and B. For remote memory, animals were trained on context B 40 days after training in context A. Vehicle or APV was infused bilaterally into target regions immediately prior to training in B. Contextual fear memory (% freezing) was assessed 24 h after each training session. (A) In a recent time point, first-time learning is impaired by NMDAR antagonist and subsequent, experience-dependent learning is not (N = 7, 8). (B) In a remote time point, subsequent learning is impaired by NMDAR-blockade (N = 9, 7). Data represented as percent of freezing time during test session and expressed as mean \pm S.E.M. (*) Significantly different from the respective control group ($P < 0.05$; effect of groups, two-factor mixed design ANOVA).

Varela et al. (2016), that has elegantly demonstrated, using a chemical-genetic tool, that retrieval of a remote memory does not require hippocampal activity (Varela et al., 2016).

However, it is important to point that hippocampus disengagement for remote memory retrieval observed in our study and in the others mentioned above can be due to the slow action of the pharmacological interventions here used, which could allow for other brain areas to compensate. A faster (optogenetic) hippocampal inactivation was shown to impair a remote memory retrieval because other areas cannot compensate quickly enough for the sudden loss of the hippocampal signal (Goshen et al., 2011).

We also addressed the question of whether a cortically-established remote memory could provide support for the acquisition of a subsequent similar learning. Despite the importance of the ACC for a successful remote memory retrieval (Ding et al., 2008; Haubrich et al., 2016; Maviel, 2004; Teixeira et al., 2006), our findings demonstrate that the ACC does not play an essential role in the acquisition of a subsequent, remote learning (Fig. 1B). In accordance to our results, Tse et al. (2007, 2011) has shown that a *schema* of the prior learning persists in the cortex regardless of its inability to support subsequent learnings without the concomitant activity of the hippocampus. They also demonstrated that systems consolidation might be accelerated when the animals already possess a cortical *schema* (Tse et al., 2007, 2011). Likewise, previous studies from our laboratory have shown that systems consolidation may be accelerated by learning of novel tasks (Haubrich et al., 2016), by stress and increased shock intensity (Pedraza et al., 2016) and even by a subsequent learning experience (Pedraza, Sierra, Crestani, Quillfeldt, & de Oliveira, 2017).

Furthermore, since animals were trained twice, with a long period of time between trainings, we tried to overcome the fear generalization phenomenon by pre-exposing them to the grid floor in a different context. The grid floor was considered a relevant contextual cue since the animals received footshocks through the floor. Baseline freezing before the training sessions was measured and compared to the measurements obtained in the two successive trainings in order to evaluate fear generalization. However, grid floor pre-exposition did not reduce fear generalization (data not shown). It is also important to consider that the pre-exposure could modify subsequent learning, thus interacting with the more recent learning (Biedenkapp & Rudy, 2007; Roesler et al., 1998). To check whether this was the case, we infused AP5 into the animals previously exposed to the grid floor before the first contextual fear conditioning. Usually, NMDAR blocking is known to induce a severe impairment of memory consolidation in several behavioral tasks (Cercato et al., 2014; Fanselow & Kim, 1994; Faust, 2013; Kim et al., 1991; Morris, 1989; Young, Bohenek, & Fanselow, 1994), as well as in electrophysiological studies (Morris et al., 1986; Tsien et al., 1996). We have also observed a learning impairment when NMDAR was blocked before the first conditioning (Fig. 2A). However, in our experiment, the pre-exposure to the grid floor did not influence the plasticity mechanism originally required for first-time learning (Fig. 2A), which was still dependent on NMDAR. Other studies have demonstrated that pre-exposure to a highly similar context (Tayler et al., 2011) or to the very same context (Roesler et al., 1998) induces a learning that is independent of NMDAR. In our experiments, pre-exposure to the grid floor was performed in a different box, and thus probably not similar enough to induce a modification in the synaptic plasticity mechanisms. Thus, our findings reinforce the idea that first-time learning is dependent on NMDAR and that exposure to a context different from that used in the training session is not sufficient to induce a modification in the plasticity mechanism. Additionally, situations in which the animals have learned a different, yet also hippocampal-dependent task, such as the water maze, they are not able to engage NMDAR independency (Wiltgen et al., 2011).

In our hands, inhibition of NMDARs did not cause a reduction in the performance of the animals in the subsequent, experience-dependent learning at a recent time point (Fig. 2A). While this result differs from

Wang et al., 2012, it is in agreement with studies suggesting that a prior learning alters subsequent plasticity mechanisms (Bannerman et al., 1995; Hardt, Wang, & Nader, 2009; Roesler et al., 1998; Sanders & Fanselow, 2003; Tayler et al., 2011; Wiltgen et al., 2011). Wang et al. (2012) suggested that a previous learning experience may modify how the hippocampus processes subsequent similar learning. They demonstrated the requirement of dorsal hippocampus for first-time learning while subsequent learning (in a recent time point) could be acquired and consolidated by either dorsal or ventral hippocampus. Interestingly, they have shown that subsequent learning was also impaired by a NMDAR blocker, suggesting that prior experiences does not cause a modification of the plasticity mechanisms underlying subsequent learning (Wang et al., 2012). These contrasting findings may be mainly due to differences in protocol: we have employed a lower shock intensity and a shorter interval between successive trainings, and our animals were pre-exposed twice to the grid floor. Considering that a dose-dependent effect of APV has been observed (Inglis et al., 2013), where higher concentrations cause a reduction of the subsequent learning, one could expect that a protocol with lower-shock intensity would be more sensitive to the NMDAR antagonist. Here, we have employed a lower-shock intensity (weaker learning) when compared to Wang et al. (2012), therefore it would be expected that the NMDAR antagonist would also be effective in blocking experience-dependent learning in our experimental design (Fig. 1A). However, we did not observe learning impairment. A higher number of foot-shocks (4 versus 1) could compensate the lower-shock intensity that we have used. Thus, we speculate that the metaplasticity mechanism induced by first learning possibly reduces NMDAR-dependence, while not completely removing its requirement. In this way, a dose-dependent effect is likely to be observed, where higher APV concentrations could potentially cause a reduction of subsequent learning, as demonstrated by Inglis et al. (2013). In our experiments, subsequent learning was not affected by APV when it occurs at a recent time-point after the first learning. However, memory was not impaired by the NMDAR antagonist when subsequent learning occurred at a remote time-point.

Moreover, Wiltgen et al. (2011) has suggested that the first conditioning results in a long-lasting (15 and 30 days after first training) modification of the cellular mechanisms underlying the encoding of new information. However, in that case, the NMDAR antagonist was infused systemically, preventing us from knowing which specific brain region(s) mediated the observed effects (Wiltgen et al., 2011). In the present experiments, rats were infused with an NMDAR antagonist directly into the targeted brain region, indicating that learning subsequent to a systems-level consolidated, remote memory becomes once again dependent upon NMDARs in the entire hippocampus (Fig. 2B), which suggests that the plasticity mechanisms supporting this learning were somehow “reset” in the hippocampus.

5. Conclusions

As a whole, our results have shown that (i) at least one longitudinal division of the hippocampus is necessary to encode a learning subsequent to a systems-level consolidated, remote memory, and (ii) in this region, it becomes once again dependent upon NMDARs. In our view, this suggests that the gradual decrease of hippocampal dependency, a characteristic of the systems consolidation process, may somehow involve a “reset” of the hippocampal molecular mechanisms behind the subsequent learning. By investigating the plastic changes that take place in sequential learning scenarios, we are better poised to understand the complex neurobiological nature of memory dynamics in real-life, natural conditions.

Funding and disclosure

This research was supported by fellowships and grants from the CNPq (MCT), CAPES (MEC) and, FAPERGS (Bolsa PROBIC and Edital

001/2013 PQG). The authors report no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank Ms. Anahita Bahiyih Hamidi and Ms. Fernanda Nogueira Lotz Alves for their assistance in the English review of this article and Mrs. Zelma Regina Vasconcelos de Almeida for her resourceful and always kind technical assistance.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2018.02.020>.

References

- Anagnostaras, S. G., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: Within-subjects examination. *Journal of Neuroscience*, *19*, 1106–1114.
- Bannerman, D. M., Good, M. A., Butcher, S. P., Ramsay, M., & Morris, R. G. M. (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature*, *378*, 182–186.
- Bannerman, D. M., Yee, B. K., Good, M. A., Heupel, M. J., Iversen, S. D., & Rawlins, J. N. P. (1999). Double dissociation of function within the hippocampus: A comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behavioral Neuroscience*, *113*, 1170–1188.
- Barry, D. N., Coogan, A. N., & Commins, S. (Feb 2016). The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes *Zif268*, *c-Fos* and *Arc*. *Neurobiology of Learning and Memory*, *128*, 46–55.
- Biedenkapp, J. C., & Rudy, J. W. (2007). Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: Implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. *Learning & Memory*, *14*(3), 200–203.
- Biedenkapp, J. C., & Rudy, J. W. (2008). Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: Role of ventral subiculum and amygdala. *Learning & Memory*, *16*, 38–45.
- Bird, C. M., & Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*, 182–194.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., & Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*, *400*, 671–675.
- Cain, D. P., Saucier, D., Hall, J., Hargreaves, E. L., & Boon, F. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: Contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behavioral Neuroscience*, *110*, 86–102.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Köhler, C., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Learning twice is different from learning once and from learning more. *Neuroscience*, *132*, 273–279.
- Caramanos, Z., & Shapiro, M. L. (1994). Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: Memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behavioral Neuroscience*, *108*, 30–43.
- Cercato, M. C., Coletti, N., Snitcofsky, M., Aguirre, A. I., Kornisiuk, E. E., Baez, M. V., & Jerusalinsky, D. A. (2014). Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *Journal of Physiology - Paris*, *108*, 263–269.
- Cohen, N. J. (2015). Navigating life. *Hippocampus*, *25*, 704–708.
- Cooper, E. L., Bienenstock, L. N., & Munro, P. W. (1982). Theory for the development of neuron selectivity: Orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *Journal of Neuroscience*, *2*, 32–48.
- Crestani, A. P., & Quillfeldt, J. A. (2016). Can previous learning alter future plasticity mechanisms? *Behav Neurosci*, *130*, 1–5 (Internet).
- de Hoz, L., & Martin, S. J. (2014). Double dissociation between the contributions of the septal and temporal hippocampus to spatial learning: The role of prior experience. *Hippocampus*, *24*, 990–1005.
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, *244*, 42–48.
- Ding, H. K., Teixeira, C. M., & Frankland, P. W. (2008). Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *15*, 290–293.
- Dudek, S., & Bear, M. (1993). Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *13*(1993), 2910–2918.
- Fanselow, M. S., & Kim, J. J. (1994). Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D, L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behavioral Neuroscience*, *108*, 210–212.
- Faust, T. (2013). Dynamic NMDAR-mediated properties of place cells during the object place memory task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*.
- Frankland, P. W. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, *304*, 881–883.
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(2), 119–130.
- Frankland, P. W., Bontempi, B., Talkton, L. E., Kaczmarek, L., & Silva, A. J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, *304*, 881–883.
- Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*, *147*, 678–689.
- Hardt, O., Wang, S. H., & Nader, K. (2009). Storage or retrieval deficit: The yin and yang of amnesia. *Learning & Memory*, *16*, 224–230.
- Haubrich, J., Cassini, L. F., Diehl, F., Santana, F., Fürstenau de Oliveira, L., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2016). Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus*, *26*, 924–932.
- Huerta, P. T., Sun, L. D., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2000). Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, *25*, 473–480.
- Hunsaker, M. R., Fieldsted, P. M., Rosenberg, J. S., & Kesner, R. P. (2008). Dissociating the roles of dorsal and ventral CA1 for the temporal processing of spatial locations, visual objects, and odors. *Behavioral Neuroscience*, *122*, 643–650.
- Inglis, J., Martin, S. J., & Morris, R. G. M. (2013). Upstairs/downstairs revisited: Spatial pretraining-induced rescue of normal spatial learning during selective blockade of hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors. *European Journal of Neuroscience*, *37*, 718–727.
- Jankord, R., Solomon, M. B., Albertz, J., Flak, J. N., Zhang, R., & Herman, J. P. (2011). Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology*, *152*, 629–638.
- Kealy, J., & Commins, S. (2010). Frequency-dependent changes in synaptic plasticity and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the CA1 to perirhinal cortex projection. *Brain Research*, *1326*, 51–61.
- Keinath, A. T., Wang, M. E., Wann, E. G., Yuan, R. K., Dudman, J. T., & Muzzio, I. A. (2014). Precise spatial coding is preserved along the longitudinal hippocampal axis. *Hippocampus*, *24*, 1533–1548.
- Kim, J. J., DeCola, J. P., Landeira-Fernandez, J., & Fanselow, M. S. (1991). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *105*, 126–133.
- Kim, J., & Fanselow, M. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, *256*, 675–677.
- Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., ... Tonegawa, S. (2017). Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, *356*, 73–78.
- Lopez, J., Herbeaux, K., Cosquer, B., Engeln, M., Muller, C., Lazarus, C., ... de Vasconcelos, A. P. (2012). Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus*, *22*, 827–841.
- Martin, S. J., & Clark, R. E. (2007). The rodent hippocampus and spatial memory: From synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*, 401–431.
- Maviel, T. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*, *305*, 96–99.
- Morris, R. G. (1989). Synaptic plasticity and learning: Selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Journal of Neuroscience*, *9*, 3040–3057.
- Morris, R. G. R., Anderson, E., Lynch, G. S. G., Baudry, M., Anderson, A., & Baudry, B. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, *319*, 774–776.
- Morris, R. G. M., Steele, R. J., Bell, J. E., & Martin, S. J. (2013). N-methyl-d-aspartate receptors, learning and memory: Chronic intraventricular infusion of the NMDA receptor antagonist d-AP5 interacts directly with the neural mechanisms of spatial learning. *European Journal of Neuroscience*, *37*, 700–717.
- Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A., & Rosenbaum, R. S. (2006). The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*, 179–190.
- Moscovitch, M., Rosenbaum, R. S., Gilboa, A., Addis, D. R., Westmacott, R., Grady, C., ... Nadel, L. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: A unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy*, *207*, 35–66.
- Nadel, L., Hupbach, A., Gomez, R., & Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*, 1640–1645.
- Padilla-Coreano, N., Bolkan, S. S., Pierce, G. M., Blackman, D. R., Hardin, W. D., Garcia-Garcia, A. L., ... Gordon, J. A. (2016). Direct ventral hippocampal-prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. *Neuron*, *89*, 857–866.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.
- Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Boos, F. Z., Haubrich, J., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2016). The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*, *26*, 362–371.
- Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Crestani, A. P., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2017). Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: Implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus*, *27*, 518–528.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *106*, 274–285.
- Richmond, M. A., Yee, B. K., Pouzet, B., Veenman, L., Rawlins, J. N. P., Feldon, J., & Bannerman, D. M. (1999). Dissociating context and space within the hippocampus:

- Effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behavioral Neuroscience*, *113*, 1189–1203.
- Roesler, R., Vianna, M., Sant' Anna, M. K., Kuyven, C. R., Krueel, A. V. S., Quevedo, J., & Ferreira, M. B. C. (1998). Intra-hippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: Protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *69*, 87–91.
- Sanders, M. J., & Fanselow, M. S. (2003). Pre-training prevents context fear conditioning deficits produced by hippocampal NMDA receptor blockade. *Neurobiology of Learning and Memory*, *80*, 123–129.
- Saucier, D., & Cain, D. P. (1995). Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature*, *378*, 186–189.
- Saucier, D., Hargreaves, E. L., Boon, F., Vanderwolf, C. H., & Cain, D. P. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: Nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behavioral Neuroscience*, *110*, 103–116.
- Shimizu, E. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, *290*, 1170–1174.
- Taylor, K. K., Lowry, E., Tanaka, K., Levy, B., Reijmers, L., Mayford, M., & Wiltgen, B. J. (2011). Characterization of NMDAR-independent learning in the hippocampus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*, 1–12.
- Teixeira, C. M., Pomedli, S. R., Maei, H. R., Kee, N., & Frankland, P. W. (2006). Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *Journal of Neuroscience*, *26*, 7555–7564.
- Tse, D., Langston, R. F., Kakeyama, M., Bethus, I., Spooner, P. A., Wood, E. R., ... Morris, R. G. M. (2007). Schemas and memory consolidation. *Science*, *316*, 76–82.
- Tse, D., Takeuchi, T., Kakeyama, M., Kajii, Y., Okuno, H., Tohyama, C., Bitto, H., & Morris, R. G. M. (2011). Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science (80-)*, *333*, 891–895.
- Tsien, J., Huerta, P., & Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, *87*, 1327–1338.
- Varela, C., Weiss, S., Meyer, R., Halassa, M., Biedenkapp, J., Wilson, M. A., ... Bendor, D. (2016). Tracking the time-dependent role of the hippocampus in memory recall using DREADDs. *PLoS One*, *11*, e0154374.
- Wang, S. H., Finnie, P. S. B., Hardt, O., & Nader, K. (2012). Dorsal hippocampus is necessary for novel learning but sufficient for subsequent similar learning. *Hippocampus*, *22*, 2157–2170.
- Wang, S.-H., Teixeira, C. M., Wheeler, A. L., & Frankland, P. W. (2009). The precision of remote context memories does not require the hippocampus. *Nature Neuroscience*, *12*, 253–255.
- Weible, A. P., Rowland, D. C., Monaghan, C. K., Wolfgang, N. T., & Kentros, C. G. (2012). Neural correlates of long-term object memory in the mouse anterior cingulate cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*, 5598–5608.
- Wiltgen, B. J., Royle, G. A., Gray, E. E., Abdipranoto, A., Thangthaeng, N., Jacobs, N., ... Vissel, B. (2010). A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One*, *5*.
- Wiltgen, B. J., Wood, A. N., & Levy, B. (2011). The cellular mechanisms of memory are modified by experience. *Learning & Memory*, *18*, 747–750.
- Winocur, G., Moscovitch, M., & Sekeres, M. (2007). Memory consolidation or transformation: Context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neuroscience*, *10*, 555–557 (Internet).
- Young, S. L., Bohenek, D. L., & Fanselow, M. S. (1994). NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: Immunization against amnesia by context preexposure. *Behavioral Neuroscience*, *108*, 19–29.
- Zhang, W. N., Bast, T., Xu, Y., & Feldon, J. (2014). Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: Distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, *262*, 47–56.

5. DISCUSSÃO GERAL

A maior parte do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos com a formação e a evocação da memória é baseada em estudos de pesquisa básica nos quais animais de laboratório são expostos a uma situação experimental controlada. As modificações celulares, moleculares, morfológicas, de interconectividade encefálica, dos padrões de oscilações, entre outras, já foram bastante elucidadas ao longo das últimas décadas (Crestani and Quillfeldt, 2016a). Contudo, muitas questões ainda permanecem em aberto.

Considerando que diariamente somos expostos as mais variadas situações, entender como uma experiência anterior influencia em um aprendizado subsequente nos parece bastante relevante. Esse trabalho tentou esclarecer um pouco como aprendizados subsequentes interagem. No entanto, ainda estamos muito distantes de entender toda a complexidade envolvida com a formação desses aprendizados.

Apesar de inumeráveis estudos terem mostrado a importância dos receptores NMDA na formação das memórias (Alagband and Marshall, 2013; Cain *et al*, 1996; Faust, 2013; Kim *et al*, 1991; Morris, 1989; Morris *et al*, 1986; Young *et al*, 1994), outros têm sugerido que esses receptores não são necessários em algumas situações específicas (Bannerman *et al*, 1995; Roesler *et al*, 1998; Sanders and Fanselow, 2003; Tayler *et al*, 2011; Wiltgen *et al*, 2010, 2011a). De uma forma geral, os critérios requeridos para que o aprendizado subsequente ocorra de forma independente dos NMDARs são: (i) possuir um aprendizado prévio similar ao que está sendo aprendido e (ii) recrutar as mesmas estruturas encefálicas utilizadas para o primeiro aprendizado. Já foi demonstrado que os NMDARs continuam sendo necessários em situações que são aprendidas tarefas diferentes, apesar delas serem dependentes da mesma estrutura encefálica (hipocampo), como labirinto aquático de Morris e CAC (Wiltgen *et al*, 2011b). Foi possível aprender sem a necessidade dos NMDARs apenas em situações nas quais foi realizado uma pré-exposição ao mesmo contexto onde posteriormente os animais passaram por um aprendizado associativo (Roesler *et al*, 1998; Sanders and Fanselow, 2003) ou quando os animais foram ressubmetidos a um re-aprendizado na mesma tarefa comportamental (com dicas espaciais ou contexto diferente) (Bannerman *et al*, 1995; Roesler *et al*, 1998; Sanders and Fanselow, 2003; Tayler *et al*, 2011; Wiltgen *et al*, 2010, 2011a). Como pode ser notado, os resultados apresentados nessa tese atendem a ambos os critérios. Mesmo na situação onde o hipocampo não é mais requerido para evocar a memória (memória remota), ele ainda continua sendo necessário para a formação do segundo aprendizado (**Capítulo II**).

De uma forma resumida, nessa tese estudamos como uma experiência prévia influencia nos mecanismos de plasticidade (sináptica e não-sináptica) recrutados para formação de um aprendizado subsequente. No capítulo I, vimos que o primeiro aprendizado causa um aumento na excitabilidade intrínseca especificamente nos neurônios recrutados para a formação dessa memória. Além disso, os neurônios hiperexcitados foram preferencialmente recrutados para o aprendizado subsequente, o qual foi mediado por mGluR ao invés de NMDAR. No capítulo II, observamos que apesar da evocação da memória remota não requerer a atividade hipocampal, o aprendizado subsequente a uma memória remota necessitou a atividade de pelo menos uma sub-região do hipocampo (dorsal ou ventral). Adicionalmente, quando o intervalo entre os aprendizados foi estendido (de três para quarenta dias), a formação do aprendizado subsequente voltou a necessitar da plasticidade sináptica mediada pelos NMDARs hipocampais (dorsal e ventral).

5.1. Quais seriam os receptores candidatos a mediar a plasticidade sináptica no lugar dos NMDARs?

Apesar de vários trabalhos sugerirem que um aprendizado prévio é capaz de induzir modificações no mecanismo de plasticidade sináptica recrutado para o aprendizado subsequente, não sabíamos qual receptor substituíria o papel dos NMDARs. Alguns estudos anteriores sugeriam que os CP-AMPARs seriam importantes (Clem *et al*, 2008; Wiltgen *et al*, 2010). Contudo, Wiltgen *et al*. 2010, só evidenciaram um prejuízo na formação do segundo aprendizado quando os animais foram infundidos concomitantemente com antagonista dos CP-AMPARs e com antagonista dos NMDARs, sugerindo um papel não tão robusto dos CP-AMPARs. (Wiltgen *et al*. 2010).

Nós mesmos acreditávamos que algum mecanismo que levasse ao aumento direto dos níveis de cálcio, ou seja, um canal que fosse permeável ao cálcio, seria o provável responsável pela aquisição do aprendizado subsequente (Crestani and Quillfeldt, 2016a). Testamos inibidores de diferentes canais, como dos VGCCs (do inglês, *voltage gated calcium channel*) e dos KARs, não obtendo prejuízo na formação da memória com nenhum deles (**Capítulo I, Apêndice: Figura IV e VI**). Com infusão concomitante de antagonista dos VGCCs e dos NMDARs (**Capítulo I, Apêndice: Figura V**) foi observado um déficit no segundo

aprendizado; resultado semelhante ao observado por Wiltgen et al., 2010 com inibição concomitante dos CP-AMPARs e NMDARs. Dessa forma, os resultados sugerem que tanto os canais CP-AMPARs quanto os VGCCs contribuem parcialmente na indução da plasticidade sináptica necessária para o aprendizado subsequente, já que o efeito prejudicial da inibição desses receptores na formação da memória só é observado quando em conjunto com a inibição dos NMDARs.

Interessantemente, o trabalho de Inglis & Morris (2013) demonstrou a existência de um efeito dependente da concentração utilizada do antagonista NMDAR, o APV. Esse trabalho (Inglis et al., 2013) foi uma continuação do estudo pioneiro do grupo do Prof. Morris que identificou o aprendizado independente dos receptores NMDA quando os animais haviam previamente passado pela tarefa de labirinto aquático (Bannerman *et al.*, 1995). Inglis and Morris, 2013 utilizaram diferentes concentrações de APV e observaram que as mais elevadas foram capazes de prejudicar o aprendizado subsequente. Considerando esses resultados, especulamos que o mecanismo de metaplasticidade induzido pelo primeiro aprendizado não seja capaz de tornar o aprendizado subsequente completamente independente dos NMDARs; a necessidade desses receptores é possivelmente apenas reduzida. Isso seria uma explicação plausível para os resultados indicando que a inibição somente dos NMDARs durante a aquisição do aprendizado subsequente não é suficiente para causar déficit de memória, possivelmente necessitando uma concentração mais elevada do APV ou a utilização dele concomitante com outros antagonistas de canais permeáveis a cálcio (por exemplo, VGCC e CP-AMPARs).

Os dados supracitados reforçam a ideia de que a metaplasticidade induzida pelo primeiro aprendizado altera a forma como o aprendizado subsequente será adquirido. Aparentemente, os NMDARs não são mais tão relevantes e outros receptores compensam a atividade anteriormente mediada por eles. A interação entre esses receptores (AMPAR, NMDAR, VGCCs, etc) nos faz pensar sobre as cascatas de sinalização envolvidas e principalmente sobre o denominador comum de todas elas, o cálcio. Nos perguntamos (i) se seria necessária a entrada de uma quantidade ideal de cálcio na célula? (ii) se a via de entrada do cálcio seria relevante? (iii) qual seria a importância dos estoques intracelulares de cálcio? No entanto, essas perguntas são muito amplas e ainda não sabemos as respostas. Especulamos que a maior excitabilidade das células que foram recrutadas para o primeiro aprendizado possa alterar os níveis de cálcio que serão necessários para a aquisição do aprendizado subsequente.

Quanto a via de entrada do cálcio, diversos trabalhos têm sugerido que diferentes respostas intracelulares podem ser desencadeadas dependendo do receptor que está mediando a entrada desse íon (Cho *et al*, 2001; Liu *et al*, 2004; Lohmann and Wong, 2005; Nishiyama *et al*, 2000). Considerando que o aprendizado subsequente é independente de NMDARs, a entrada do cálcio através de outros receptores poderia ser mediada por vias de sinalização distintas. Da mesma forma, a liberação dos estoques intracelulares de cálcio pode ser ativada através de diferentes vias (Baker *et al*, 2013).

Tendo conhecimento que os receptores ionotrópicos acima mencionados (CP-AMPA e VGCC) são parcialmente relevantes para o aprendizado subsequente, os próximos candidatos investigados foram os receptores metabotrópicos de glutamato do tipo I. Eles foram escolhidos baseado em trabalhos que demonstraram algumas formas de indução da LTP mediadas por mGluRs, ao invés dos NMDARs. Esse tipo de plasticidade sináptica foi observado, por exemplo, entre as fibras musgosas e CA3 (Nicoll and Schmitz, 2005) e nas sinapses das colaterais de Schaffer para CA1 (Wang *et al*, 2016), no hipocampo. Além disso, a importância dos mGluR do tipo I já tinha sido demonstrada para a manutenção da plasticidade sináptica independente dos NMDARs no córtex de barril (Clem *et al*, 2008). Juntos, esses estudos apontavam que os mGluRs poderiam ser os mediadores da plasticidade sináptica dos aprendizados independente de NMDARs.

Devido a existência de uma variação muito grande nas concentrações do antagonista dos mGluRs do tipo I (MCPG) utilizadas na literatura (Bianchin *et al*, 1994; Clem *et al*, 2008; Manahan-Vaughan *et al*, 1998; Manahan-Vaughan and Reymann, 1997; Wang *et al*, 2016), testamos o efeito de diferentes concentrações do MCPG na aquisição do aprendizado subsequente (5nM, 1uM, 1mM e 10mM) (**Capítulo I, Apêndice: Figura VII**). Apenas a concentração de 1uM mostrou-se efetiva, prejudicando a aquisição do aprendizado subsequente (**Capítulo I, Figura 3B**). Dessa forma, acreditamos que os mGluRs medeiam a plasticidade sináptica do aprendizado subsequente quando os animais já possuem uma experiência prévia. Interessantemente, o primeiro aprendizado não foi prejudicado por inibidores dos mGluR (**Capítulo I, Figura 3A**).

Diversos estudos anteriores demonstraram o papel dos mGluR do tipo I (mGluR1 e mGluR5) na memória (Riedel and Reymann, 1996; Szapiro *et al*, 2000), alguns deles especificamente durante a aquisição, onde o bloqueio deles causava prejuízo mnemônico (Schröder *et al*, 2008; Schulz *et al*, 2001; Simonyi *et al*, 2007, 2010). Contudo, aqui, a utilização

do antagonista dos mGluRs do tipo não ocasionou déficits na formação do primeiro aprendizado (**Capítulo I, Figura 3A**). É possível que, assim como observado com o APV, exista um efeito concentração-dependente. A concentração efetiva para inibir o primeiro aprendizado pode ser diferente da concentração necessária para inibir o segundo aprendizado. Como realizamos a curva de concentração apenas para o segundo condicionamento, a falta de efetividade do fármaco durante a aquisição do primeiro aprendizado pode ter sido ocasionada por uma insensibilidade dos mGluRs à concentração utilizada do antagonista.

Algo que nos questionamos é se o aprendizado subsequente só é independente de NMDAR e dependente de mGluR enquanto a excitabilidade intrínseca é mantida aumentada. Se isso for verdade e a excitabilidade intrínseca retornar a valores basais em períodos superiores a dois dias, talvez pudéssemos observar a necessidade dos NMDARs antes dos quarenta dias.

O fato de termos observados um aumento da excitabilidade intrínseca especificamente nos neurônios recrutados para o aprendizado pode explicar porque os inibidores dos NMDARs não prejudicaram a formação do aprendizado subsequente. Se considerarmos que os neurônios utilizados para o aprendizado subsequente são mais excitáveis e que a indução da LTP mediada pelos mGluRs requer estimulações com frequências mais elevadas, a plasticidade sináptica poderia ser induzida sem seus mediadores ‘clássicos’ (NMDARs) nesses neurônios, sendo então mediada por mediadores alternativos, como os mGluRs. Isso estaria de acordo com o recrutamento dos mGluRs quando a atividade neuronal é mais elevada (Wang *et al*, 2016). Nesse caso, em neurônios hiperexcitáveis, a mesma intensidade de estímulo elétrico poderia desencadear a ativação de mGluR ao invés dos NMDAR.

Também é importante ressaltar que os NMDARs e os mGluRs podem estar localizados em agrupamentos (do inglês, *clusters*) e que a interação entre eles poderia ser mediada pela proteína Shank (Tu *et al*, 1999). Dessa forma, a plasticidade sináptica induzida de forma independente dos NMDARs poderia não ser suficiente para inibir a ativação de vias de sinalização intracelulares que são por eles mediadas. Isso porquê a ativação dos mGluRs poderia ativar de maneira indireta as vias de sinalização intracelular mediadas por NMDARs.

5.1.1. Subunidades dos NMDAR

O trabalho de Quilan et al., 2004 demonstrou que os NMDARs são importantes para adquirir a estratégia comportamental na tarefa de discriminação de odores. Mas, uma vez aprendida a estratégia, a associação de novos pares de odor não requer os NMDARs. Essa mudança no mecanismo de plasticidade sináptica também foi acompanhada de modificação na composição das subunidades dos NMDAR. Após o aprendizado, foi observado um aumento das subunidades GluN2A e uma diminuição das GluN2B (Quinlan *et al*, 2004). Outros estudos também têm demonstrado que a modificação transiente da composição das subunidades do NMDARs é importante nas fases iniciais do aprendizado e da indução da LTP (para revisão ver Baez et al., 2018). Dessa forma, seria interessante avaliar a existência de possíveis modificações nas subunidades dos NMDARs envolvidas com o aprendizado subsequente.

5.2. Importância da excitabilidade neuronal para formação da memória

O aumento da força sináptica entre os neurônios é tido com um dos prováveis mecanismos pelo qual as memórias são armazenadas no sistema nervoso central. Considerando que a plasticidade Hebbiana é sinapse-específica e que cada neurônio pode fazer milhares de sinapses, a capacidade de armazenamento de informações em um único neurônio através desse mecanismo de plasticidade sináptica é extremamente grande. Apesar disso, outras formas de plasticidade que agem a nível global, como excitabilidade neuronal, têm-se mostrado importante. A hiperexcitabilidade neuronal facilita a ativação dos neurônios, fazendo com um estímulo de mesma intensidade ative mais facilmente os neurônios mais excitáveis (Lisman *et al*, 2018). Dessa forma, manipulações que aumentam a excitabilidade neuronal como a elevação dos níveis de CREB (Han *et al*, 2007), a alteração da funcionalidade de canais de K^+ (Yiu *et al*, 2014) e ativação dos canais regulados por opsinas (Rogerson *et al*, 2016), facilitam o armazenamento da memória nesses neurônios.

Além disso, o simples fato do animal aprender algo é suficiente para causar um aumento da excitabilidade neuronal. Esse fenômeno tem sido demonstrado em diferentes estruturas encefálicas, no hipocampo (Moyer *et al*, 1996; Oh *et al*, 2003; Thompson *et al*, 1996), córtex piriforme (Saar *et al*, 1998, 2001; Saar and Barkai, 2003) e amígdala (Motanis *et al*, 2014).

Aqui nós demonstramos que o aumento da excitabilidade neuronal induzida pelo aprendizado de uma memória aversiva dura por pelo menos dois dias (**Capítulo I, Figura 1**). O grupo do Dr. Barkai demonstrou que a hiperexcitabilidade pode ser mantida por vários dias após o término do aprendizado de discriminação olfativa (Chandra and Barkai, 2017). É possível que diferentes tarefas e/ou intensidades de treino modulem a excitabilidade por períodos variados, por esse motivo é difícil prever por quanto tempo ela pode ser mantida. Nos casos onde o aumento da excitabilidade foi induzido através da superexpressão de CREB, os neurônios voltaram aos níveis de excitabilidade basal depois de poucas horas (Rashid *et al*, 2016). No entanto, os mecanismos de metaplasticidade costumam ser mais duradouros (Keck *et al*, 2017; Turrigiano, 2012), levando-nos a questionar se o aumento momentâneo do CREB realmente é o responsável pela hiperexcitabilidade mantida por períodos mais prolongados.

Além disso, especulamos que o retorno da excitabilidade para níveis basais pode ser um dos possíveis motivos pelo qual o aprendizado volta a ser dependente de NMDAR. Nos nossos experimentos, quando o intervalo entre os aprendizados foi estendido para quarenta dias, a plasticidade sináptica voltou a ser NMDAR-dependente (**Capítulo II, Figura 2b**). Talvez não seja necessário que a primeira memória já esteja consolidada sistemicamente (independente do hipocampo) para que o mecanismo de metaplasticidade induzido pelo primeiro aprendizado deixe de influenciar no aprendizado subsequente. A avaliação em períodos intermediários, entre três e quarenta dias pode esclarecer melhor por quanto tempo o primeiro aprendizado ainda é capaz de influenciar no mecanismo de plasticidade do segundo aprendizado.

De um modo geral, as principais hipóteses sobre o papel funcional do aumento da excitabilidade neuronal são (i) o armazenamento (alocação) de memórias e (ii) o fortalecimento das conexões entre os neurônios ativados para a consolidação (Lisman *et al*, 2018), que serão melhor discutidas adiante.

No estudo de Cai *et al.*, 2016 foi demonstrado que animais expostos a contextos diferentes em um intervalo de tempo curto (5 horas) acabam associando os dois contextos a um choque imediato aplicado em apenas um deles (24h após pré-exposição aos contextos). Dessa forma, os autores argumentam que a proximidade temporal possibilitou que as memórias fossem ‘ligadas’ uma à outra, fazendo com que o medo fosse expresso em ambos os contextos (Cai *et al*, 2016a). Em uma recente revisão do grupo, os autores sugerem que a ligação entre essas memórias poderia ocorrer devido a maior excitabilidade do conjunto de células recrutadas para o primeiro, sendo essas células mais propensas a serem recrutadas para o aprendizado

subsequente (Lisman *et al*, 2018). De fato, a sobreposição neuronal observada foi maior quando o intervalo entre os eventos era menor, apesar da excitabilidade em si não ter sido avaliada (Cai *et al*, 2016a).

A ideia de que o aumento da excitabilidade favoreceria a associação entre memórias (do inglês, *co-allocation*) foi proposta pelo grupo da Profa. Sheena Josselyn. Eles demonstraram que condicionamento aversivo induz o aumento dos níveis de CREB por pelo menos 6 horas e que memórias aprendidas dentro desse período ficam associadas (Rashid *et al*, 2016). Isso vai de encontro aos resultados obtidos pelo grupo do Prof. Alcino Silva, nos quais memórias aprendidas em períodos próximos utilizam populações neuronais sobrepostas (Cai *et al*, 2016a).

No nosso trabalho observamos que o aprendizado aumenta o nível de excitabilidade neuronal e que os neurônios hiperexcitáveis são preferencialmente recrutados para o segundo aprendizado (**Capítulo I, Figura 1 e 2**), corroborando, assim como os outros estudos (Cai *et al*, 2016a; Rashid *et al*, 2016), para a hipótese 1.

Dessa forma, o armazenamento da memória não seria um evento aleatório, ele aconteceria em populações neuronais específicas, sendo os neurônios hiperexcitáveis um dos prováveis candidatos ao armazenamento (Rogerson *et al*, 2014).

Para não deixar de mencionar, a outra hipótese prediz que o aumento da excitabilidade auxilia na consolidação da memória (Lisman *et al*, 2018). Durante períodos de repouso e sono, os *replays* (reativação do circuito neuronal ativado durante a aquisição) seriam favorecidos pelo aumento da excitabilidade, que por sua vez fortaleceria e estabilizaria as conexões sinápticas, auxiliando na consolidação da memória (Atherton *et al*, 2015; Lisman *et al*, 2018). Contudo, mais evidências experimentais são requeridas para sustentar essa hipótese.

5.2.1. Sobreposição neuronal

Quanto a sobreposição neuronal, como mencionado anteriormente, aprendizados adquiridos temporalmente próximos possuem populações neuronais mais sobrepostas do que aprendizados distantes (Cai *et al*, 2016b; Rashid *et al*, 2016). No nosso caso não avaliamos a interferência da proximidade entre os eventos, utilizamos um intervalo fixo de dois dias. Quando avaliamos a sobreposição neuronal vimos que os neurônios utilizados no primeiro aprendizado são preferencialmente recrutados para o segundo e que uma maior sobreposição neuronal ocorreu entre os contextos idênticos (**Capítulo I, Figura 2**). Animais re-treinados

exatamente na mesma caixa de condicionamento (contexto A) apresentaram uma sobreposição neuronal em torno de 26%, ao passo que animais treinados em outra caixa (contexto B) a sobreposição foi menor (~19%). Dessa forma, as dicas contextuais parecem ser importantes para o recrutamento dos neurônios para o aprendizado subsequente, talvez só o fato dos neurônios estarem mais excitáveis não seja suficiente. Seria interessante avaliar também a sobreposição neuronal quando o intervalo entre os aprendizados é estendido (quarenta dias).

5.3. Consolidação sistêmica da memória

As memórias passam por um processo de reorganização estrutural ao longo do tempo. Acredita-se que memórias detalhadas continuam a recrutar o hipocampo dorsal durante a evocação e memórias generalizadas necessitariam apenas a atividade de estruturas neocorticais. Como resultado do processo de reorganização estrutural, memórias que foram formadas com detalhes, podem tornar-se generalizadas (Anagnostaras *et al*, 1999; Haubrich *et al*, 2016; de Oliveira Alvares *et al*, 2012; Pedraza *et al*, 2017a; Sierra *et al*, 2017; Tayler and Wiltgen, 2013). Experimentalmente, na tarefa de condicionamento aversivo contextual, a generalização costuma ser avaliada através da quantificação das respostas de medo no mesmo contexto onde os animais foram treinados ou em um contexto novo. A memória é dita precisa quando os animais conseguem discriminar esses dois lugares e generalizada quando apresentam medo em ambos, não os diferenciando.

Aqui não avaliamos diretamente a qualidade da memória (precisa ou generalizada), mas trabalhos prévios do nosso laboratório (Haubrich *et al*, 2016; de Oliveira Alvares *et al*, 2012) demonstraram que a memória perde detalhes a partir de trinta dias após a aquisição, sendo, portanto, bem plausível que ela já esteja generalizada com o intervalo utilizado de quarenta dias. Adicionalmente, a quantificação da imobilidade durante o segundo treino, mais especificamente antes dos animais receberem os choques (três minutos basais), pode ser utilizada como uma medida indireta da generalização. Observamos que após o intervalo de quarenta dias os animais apresentam uma resposta de imobilidade basal (antes dos choques) maior quando comparado com o primeiro treino (**Capítulo II; Apêndice: Figura X**). Além disso, não existe diferença na imobilidade basal nos diferentes contextos quando o intervalo entre os treinos é curto (**Capítulo II; Apêndice: Figura XI**). Tendo conhecimento desse processo de generalização, tentamos contorná-lo pré-expondo os animais a um contexto com a

mesma grade por onde iriam receber os choques. Contudo, essas pré-exposições não foram suficientes para reduzir a generalização da memória (**Capítulo II; Apêndice: Figura XII**).

5.3.1. Papel do hipocampo ventral e do córtex cingulado anterior na consolidação sistêmica

Poucos trabalhos têm dado atenção ao hipocampo ventral durante o processo de consolidação sistêmica. Varela et al., 2016 demonstraram que a evocação da memória é possível mesmo quando ambos hipocampo dorsal e ventral são inativados (Varela *et al*, 2016), indicando, assim como os nossos resultados (**Capítulo II, Figuras 1A**), que a evocação de uma memória remota não requer a atividade de ambos hipocampo dorsal e ventral. Apesar disso, Cullen *et al* 2015 demonstraram que a atividade do vHPC e do ACC estão relacionadas a memórias generalizadas e a inibição dessas estruturas faz com que a memória retorne a ser precisa (Cullen *et al*, 2015). Um trabalho recente em humanos demonstrou que existe uma reorganização estrutural intrahipocampal ao longo do tempo. Nessa reorganização memórias recentes recrutam maior ativação do hipocampo ventral e memórias remotas maior ativação do hipocampo dorsal contradizendo muitos resultados em animais que demonstram a necessidade do hipocampo dorsal para a evocação de memórias recentes e precisas (Dandolo and Schwabe, 2018).

O córtex cingulado anterior tem sido a estrutura neocortical mais estudada e um papel crucial nos processos de consolidação sistêmica é desempenhado por ela. Essa estrutura está localizada no córtex pré-frontal dorsomedial e faz sinapses diretamente no hipocampo, podendo controlar a sua atividade. Diversos trabalhos sugerem que o córtex cingulado anterior seria o repositório final de memórias remotas generalizadas, que não dependem mais do hipocampo para ser evocadas (Bontempi *et al*, 1999; Fanselow *et al*, 2004; Kitamura *et al*, 2017).

5.4. Estruturas envolvidas com a formação do aprendizado subsequente a uma memória remota

Tendo conhecimento da reorganização estrutural que as memórias podem sofrer ao longo do tempo, no presente trabalho (**Capítulo II**) nós analisamos se o fato de o animal possuir uma memória remota prévia ainda poderia influenciar (i) nas estruturas que seriam recrutadas para o aprendizado futuro e (ii) no mecanismo de plasticidade que seria utilizado.

Alguns trabalhos têm sugerido que a formação de um esquema é capaz de facilitar o desempenho em tarefas comportamentais. O esquema seria formado por um conjunto de neurônios que representaria um conhecimento genérico. Nesses estudos, os animais foram submetidos a tarefas complexas, que requerem várias sessões de treinamento, e as novas associações foram facilitadas quando os animais tinham o conhecimento prévio de como a tarefa funcionava (Quinlan *et al*, 2004; Tse *et al*, 2007, 2011).

Os clássicos trabalhos de Tse *et al.*, 2007 e 2011 sugerem que os animais formam esquema cortical da tarefa e embora esse esquema não seja capaz de sustentar a aquisição de novas associações, elas se tornam independentes do hipocampo de forma mais acelerada (Tse *et al*, 2007, 2011). Aqui nós fizemos algo parecido, avaliando se uma memória que não depende mais do hipocampo para ser evocada (**Capítulo II, Figura 1A**) ainda recrutaria essa estrutura para a formação de um segundo aprendizado ou se o córtex seria capaz de sustentar o aprendizado subsequente a uma memória remota. Quando inibimos apenas uma região longitudinal do hipocampo (dHPC ou vHPC) (**Capítulo II, Figura 1C e 1D**) ou o ACC (**Capítulo II, Figura 1B**), ou ainda o ACC concomitantemente com a inibição do dHPC (**Capítulo II, Apêndice: Figura XIV**) ou ACC + vHPC (**Capítulo II, Apêndice: Figura XV**), não observamos déficits na aquisição do aprendizado subsequente. Contudo, quando ambas as regiões longitudinais do hipocampo foram inativadas (**Capítulo II, Figura 1E**), o aprendizado subsequente foi prejudicado. Juntos, esses resultados sugerem o córtex não consegue suportar o aprendizado (**Capítulo II, Figura 1B; Apêndice: Figura XIV e XV**) e que a ativação de pelo menos uma das subdivisões longitudinais do hipocampo é necessária para que ocorra a aquisição adequada da memória subsequente.

Esses dados corroboram estudos que mostram um papel compensatório entre a região dorsal e ventral do hipocampo (Keinath *et al*, 2014). Já tinha sido demonstrado que o aprendizado espacial (de Hoz and Martin, 2014) ou contextual (Wang *et al*, 2012) pode ser mediado pelo hipocampo ventral quando os animais possuem uma experiência prévia. No nosso caso, quando apenas uma das regiões longitudinais é inibida, a região funcional consegue compensar, fazendo com que os animais aprendam normalmente o aprendizado subsequente (**Capítulo II, Figura 1C, 1D, Apêndice: Figuras XIV e XV**). Nossos resultados preliminares de imunofluorescência sugerem que ambas as regiões dorsal e ventral do hipocampo, bem como o ACC, estão sendo ativados (marcação de *egr-1*) (**Capítulo II, Apêndice: Figuras XVI**) após

o aprendizado subsequente a uma memória remota, sustentando nossos resultados farmacológicos (**Apêndice: Figuras XIV e XVI**).

Algo interessante que não exploramos nesse trabalho, é a qualidade da memória aprendida com a participação do hipocampo dorsal *versus* hipocampo ventral. No hipocampo existem as células de lugar (do inglês, *place cells*) que são ativadas quando o animal está em um determinado local, contribuindo para a formação do mapa espacial. A dimensão espacial codificada por essas células varia ao longo do eixo longitudinal do hipocampo. Células localizadas na região dorsal possuem campos menores e mais específicos, por outro lado células da região ventral fazem uma representação mais ampla, menos específica (Jung *et al*, 1994; Kjelstrup *et al*, 2008; Maurer *et al*, 2005; Royer *et al*, 2010). Considerando essas diferenças nas células de lugar, seria plausível que a formação de uma memória mediada pelo hipocampo ventral fosse mais genérica. Cullen *et al* 2015 demonstraram que a atividade do vHPC e do ACC estão relacionadas a memórias generalizadas; quando essas estruturas são inibidas, a memória volta a ser precisa (Cullen *et al*, 2015).

5.5. Papel dos NMDARs no aprendizado subsequente a uma memória remota

Os resultados aqui apresentados (**Capítulo II, Figura 2A e B**) demonstraram também que os NMDARs não são necessários quando o aprendizado subsequente ocorre após um período recente, mas voltam a ser necessários quando ele ocorre após um período remoto. Nesses experimentos o intervalo entre os aprendizados foi estendido para um período onde a primeira memória já havia sido consolidada sistemicamente e não dependia mais do hipocampo para ser evocada (**Capítulo II, Figura 1A**). Nessa situação, a variável intervalo entre os aprendizados nos traz um segundo fator que pode influenciar nos resultados obtidos, a dinâmica da consolidação sistêmica. Enfrentamos algumas dificuldades metodológicas tentando padronizar os protocolos aqui utilizados, principalmente relativo a memória remota, onde tentamos reduzir ao máximo a generalização entre os contextos utilizados.

Apesar de termos mostrado que o hipocampo não é necessário para a evocação (**Capítulo II, Figura 1A**), com os nossos resultados não é possível afirmar que o traço que representava a primeira memória não está mais presente no hipocampo. Se a memória for totalmente independente do hipocampo e somente dependente do córtex, seria esperado que um

novo aprendizado recrutasse NMDAR, isso porque seria como se não existisse um aprendizado prévio. Contudo, o estudo de Goshen et al., 2011 sugere que a inativação hipocampal através da utilização de fármacos pode gerar um artefato. Como os fármacos agem de maneira prolongada (por mais de trinta minutos), o córtex teria tempo suficiente para ser ativado de maneira a compensar a inativação hipocampal e dessa forma os animais conseguiriam evocar a memória mesmo com o hipocampo inativado. Porém, numa situação onde a inativação hipocampal fosse realizada de forma pontual (optogeneticamente), a memória não conseguia ser evocada. Dessa forma, os autores desse trabalho sugerem que o hipocampo ainda retém o traço da memória remota, apesar do córtex poder compensar em situações de inativação prolongada (Goshen *et al*, 2011). Os mesmos resultados obtidos por Goshen *et al* 2011 foram replicados no laboratório do Dr Brian Wiltgen (dados não publicados). Dessa forma, acreditamos que o fato do aprendizado subsequente voltar a ser dependente de NMDAR se deva principalmente ao intervalo entre os aprendizados e não a ausência do traço prévio no hipocampo.

Além disso, também poderia ser argumentado que o aprendizado subsequente a memória remota não seria mais dependente de NMDAR porque o traço da primeira memória já estaria muito fraco. Se observarmos com cuidado, quando comparamos o *freezing* do teste 1 com o do teste 2 vemos um decaimento significativo (**Capítulo II, Figura 1A**). Contudo, acreditamos que esse decaimento do *freezing* não se deva a um enfraquecimento da memória, mas sim a infusão que foi realizada antes do teste. Isso porquê em trabalhos anteriores do grupo observamos a mesma diminuição da resposta de medo quando os animais foram infundidos antes do teste (como exemplo, ver figura 6D de (Haubrich *et al*, 2015). Corroborando essa ideia, vimos em um teste posterior, sem a infusão de fármacos, que a resposta de medo ainda se mantinha elevada (**Capítulo II, Apêndice: Figura XII**).

5.5.1. Reconsolidação

Um questionamento pertinente é se o segundo aprendizado poderia ser mediado pela reconsolidação da primeira memória, ao invés de ser mediado por um novo aprendizado. De fato, existem muitas semelhanças entre os fenômenos de consolidação e a reconsolidação. Ambos fenômenos são prejudicados por inibidores de síntese proteica, por exemplo (Nader *et al*, 2000). Contudo, a reconsolidação é inibida por antagonistas NMDAR e o aprendizado subsequente não é prejudicado (Lee *et al*, 2006). Além disso, a expressão comportamental do

medo durante uma sessão de reativação costuma ser elevada, ao passo que a linha de base do segundo treino é baixa. Para ser possível induzir a reconsolidação a similaridade entre os contextos usualmente é alta, aqui utilizamos contextos bem diferentes. Todos esses fatores nos levam a crer que de fato esteja ocorrendo um segundo aprendizado e não a reconsolidação do primeiro aprendizado.

5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi desafiador em tentar entender um pouco a complexidade dos aprendizados subsequentes. Continua sendo surpreendente para mim todas as alterações que um aprendizado pode causar no sistema nervoso central. Quando achamos que os mecanismos envolvidos com a formação das memórias já estão bem fundamentados, modificamos um pouco o desenho experimental e observamos que o simples fato do animal possuir uma experiência prévia semelhante pode mudar muito do que acreditávamos ser fundamental na formação das memórias. Sendo assim, acreditamos que ainda estamos longe de entender os mecanismos envolvidos com a natureza contínua das memórias. Esse trabalho possibilitou encaixar apenas uma pequena peça no quebra-cabeça infinito que é o sistema nervoso.

6. CONCLUSÕES

6.1. Capítulo I

6.1.1. O aprendizado causa um aumento da excitabilidade intrínseca, que dura pelo menos dois dias, especificamente nos neurônios recrutados para o aprendizado.

6.1.2. Os neurônios recrutados para o primeiro aprendizado são mais propensos a serem utilizados para o segundo aprendizado, independente de ser um re-aprendizado no mesmo contexto ou em um contexto novo.

6.1.3. O primeiro aprendizado é mediado por NMDARs.

6.1.4. O aprendizado subsequente a uma memória recente é independente dos NMDARs

6.1.5. Os mGluRs do tipo I não são necessários para a formação do primeiro aprendizado.

6.1.6. Os mGluRs do tipo I são recrutados para o aprendizado subsequente.

Juntos, esses resultados sugerem que o aumento da excitabilidade intrínseca pode servir como um mecanismo de metaplasticidade que favorece a codificação de novas memórias via ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR).

6.2. Capítulo II

6.2.1. A memória remota pode ser evocada mesmo quando ambos hipocampo dorsal e o ventral são inibidos.

6.2.2. A inativação do córtex cingulado anterior não prejudica a formação de um aprendizado subsequente a uma memória que já foi consolidada sistemicamente.

6.2.3. A inativação do hipocampo dorsal não prejudica a formação do aprendizado subsequente a uma memória remota.

6.2.4. O aprendizado subsequente a uma memória não é prejudicado pela inativação do hipocampo ventral.

6.2.5. A inativação concomitante do hipocampo dorsal e ventral causa um déficit na formação do aprendizado subsequente a uma memória remota.

6.2.6. As pré-exposições não modificam o mecanismo de plasticidade sináptica que vai ser recrutado para o aprendizado, os NMDARs ainda são requeridos para o primeiro aprendizado associativo após as habituações.

6.2.7. A metaplasticidade induzida pelo primeiro aprendizado não influencia no aprendizado subsequente quando o intervalo entre eles é aumentado para quarenta dias.

Os resultados acima sugerem que aprendizados muito afastados temporalmente *não* são mais influenciados pelos mecanismos metaplasticidade induzidos pelo primeiro aprendizado.

7. PERSPECTIVAS

- Verificar a necessidade dos receptores NMDARs na formação do aprendizado subsequente que ocorre no período entre três e quarenta dias após o primeiro aprendizado.
- Avaliar a qualidade da memória aprendida com a participação do hipocampo dorsal *versus* hipocampo ventral.
- Avaliar a sobreposição neuronal quando o intervalo entre os aprendizados é estendido (quarenta dias).
- Verificar a existência de possíveis modificações das subunidades dos NMDARs envolvidas com o aprendizado subsequente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham WC, Bear MF (1996). Metaplasticity: The plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **19**: 126–130.
- Abraham WC, Williams JM (2008). LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 260–268.
- Alagband Y, Marshall JF (2013). Common influences of non-competitive NMDA receptor antagonists on the consolidation and reconsolidation of cocaine-cue memory. *Psychopharmacology (Berl)* **226**: 707–719.
- Alberini CM (2009). Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *New York* 121–145doi:10.1152/physrev.00017.2008.
- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* **19**: 1106–14.
- Atherton LA, Dupret D, Mellor JR (2015). Memory trace replay: The shaping of memory consolidation by neuromodulation. *Trends Neurosci* **38**: 560–570.
- Baez MV, Cercato MC, Jerusalinsky DA (2018). NMDA Receptor Subunits Change after Synaptic Plasticity Induction and Learning and Memory Acquisition. *Neural Plasticity* Article ID 5093048
- Baker KD, Edwards TM, Rickard NS (2013). The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* **37**: 1211–1239.
- Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RGM (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* **378**: 182–186.
- Barry DN, Coogan AN, Commins S (2016). The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes *Zif268*, *c-Fos* and *Arc*. *Neurobiol Learn Mem* **128**: 46–55.
- Bear MF, Malenka RC (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* **4**: 389–399.
- Bianchin M, Silva RC Da, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I (1994). Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behav Pharmacol* **5**: 356–359.
- Bliss TVP, Cooke SF (2011). Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clin (São Paulo, Brazil)* **66 Suppl 1**: 3–17.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* **400**: 671–675.
- Bortolotto Z a, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, *et al* (1999). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* **402**: 297–301.
- Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL (2012). *Basic Neurochemistry. Basic Neurochem* doi:10.1016/C2009-0-00066-X.
- Broadbent NJ, Clark RE (2013). Remote context fear conditioning remains hippocampus-dependent irrespective of training protocol, training-surgery interval, lesion size, and lesion method. *Neurobiol Learn Mem* **106**: 300–308.
- Brown TH, Zhao Y, Leung V (2010). Hebbian plasticity. *Encycl Neurosci* 1049–1056doi:10.1016/B978-008045046-9.00796-8.
- Buonomano D V., Carvalho TP (2010). Spike-Timing-Dependent Plasticity (STDP). *Encycl Neurosci* 265–268doi:10.1016/B978-008045046-9.00822-6.
- Cai DJ, Aharoni D, Shuman T, Shobe J, Biane J, Song W, *et al* (2016a). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature* **534**: 115–118.

- Cain DP, Saucier D, Hall J, Hargreaves EL, Boon F (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behav Neurosci* **110**: 86–102.
- Casagrande MA, Haubrich J, Pedraza LK, Popik B, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L (2018). Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiol Learn Mem* **150**:42-47.
- Chandra N, Barkai E (2017). A non-synaptic mechanism of complex learning: Modulation of intrinsic neuronal excitability. *Neurobiol Learn Mem* doi:10.1016/j.nlm.2017.11.015.
- Cho K, Aggleton JP, Brown MW, Bashir ZI (2001). An experimental test of the role of postsynaptic calcium levels in determining synaptic strength using perirhinal cortex of rat. *J Physiol* **532**: 459–66.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005). Impaired remote spatial memory after hippocampal lesions despite extensive training beginning early in life. *Hippocampus* **15**: 340–346.
- Clem RL, Celike T, Barth AL (2008). Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science (80-)* **319**: 101–104.
- Clem RL, Huganir RL (2010). Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science (80-)* **330**: 1108–1112.
- Cohen-Matsliah SI, Brosh I, Rosenblum K, Barkai E (2007). A novel role for extracellular signal-regulated kinase in maintaining long-term memory-relevant excitability changes. *J Neurosci* **27**: 12584–9.
- Coussen F (2009). Molecular determinants of kainate receptor trafficking. *Neuroscience* **158**: 25–35.
- Crestani AP, Quillfeldt JA (2016a). Can previous learning alter future plasticity mechanisms? *Behav Neurosci* **130**: 1–5.
- Cullen PK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC, Jasnow AM (2015). Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol Learn Mem* **124**: 19–27.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* **64**: 477–505.
- Curzon P, Rustay NR, Browman KE (CRC Press/Taylor & Francis: 2009). *Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. Methods Behav Anal Neurosci.*
- Dandolo LC, Schwabe L (2018). Time-dependent memory transformation along the hippocampal anterior-posterior axis. *Nat Commun.* **9**(1):1205.
- Dash PK, Hebert AE, Runyan JD (2004). A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Brain Res Rev* **45**: 30–7.
- Davis HP, Squire LR (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychol Bull* **96**: 518–559.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* **36**: 527–538.
- Dudai Y (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**: 51–86.
- Dudai Y, Morris RGM (2013). Memorable trends. *Neuron* **80**: 742–750.
- Fanselow MS, Dong H-W (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**: 7–19.
- Fanselow MS, Kim JJ, Yipp J, Oca B De (1994). Differential effects of the N-methyl-d-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behav Neurosci* **108**: 235–240.
- Faust T (2013). Dynamic NMDAR-mediated properties of place cells during the object place

- memory task. *Front Behav Neurosci* **7**: .
- Ferbinteanu J, Kennedy PJ, Shapiro ML (2006). Episodic memory--from brain to mind. *Hippocampus* **16**: 691–703.
- Foster DJ, Wilson MA (2006). Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* **440**: 680–683.
- Frankland PW (2004). The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science (80-)* **304**: 881–883.
- Frankland PW, Bontempi B (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* **6**: 119–130.
- Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, Silva AJ (2001). α -CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* **411**: 309–313.
- Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, *et al* (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* **147**: 678–689.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001). Experience-Dependent Gene Expression in the Rat Hippocampus after Spatial Learning: A Comparison of the Immediate-Early Genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* **21**: 5089–5098.
- Hader K, Schafe GE, Doux JE Le (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**: 722–726.
- Han J-H, Kushner S a, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown R a, *et al* (2007). Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* **316**: 457–60.
- 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**: 924–932.
- Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, O. Alvares L De, *et al* (2015). Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology* **40**: .
- Hayashi ML, Choi SY, Shankaranarayana Rao BS, Jung HY, Lee HK, Zhang D, *et al* (2004). Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* **42**: 773–787.
- Hernandez PJ, Abel T (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 293–311.
- Hoz L de, Martin SJ (2014). Double dissociation between the contributions of the septal and temporal hippocampus to spatial learning: The role of prior experience. *Hippocampus* **24**: 990–1005.
- Inglis J, Martin SJ, Morris RG (2013) Upstairs/downstairs revisited: spatial pretraining-induced rescue of normal spatial learning during selective blockade of hippocampal N-methyl-d-aspartate receptors. *Eur J Neurosci*. **37**(5):718-27.
- Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* **29**: 496–505.
- Izquierdo I, Furini CRG, Myskiw JC (2016). Fear Memory. *Physiol Rev* **96**: 695–750.
- Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, Ledoux JE (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* **147**: 509–524.
- Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW (2015a). Finding the engram. *Nat Rev Neurosci* **16**: 521–534.
- Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW (2015b). Finding the engram. *Nat Rev Neurosci* **16**: 521–534.
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL (1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci* **14**: 7347–7356.
- Kandel ER (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-

- 2, and CPEB. *Mol Brain* **5**: 14.
- Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell* **157**: 163–186.
- Kandel ER, Pittenger C (1999). The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **354**: 2027–2052.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000). *Principles of Neural Science. Neurology* **3**: .
- Katche C, Cammarota M, Medina JH (2013). Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiol Learn Mem* **106**: 40–47.
- Keck T, Toyozumi T, Chen L, Doiron B, Feldman DE, Fox K, *et al* (2017). Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: the current state of the field and future research directions. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **372**: 20160158.
- Keinath AT, Wang ME, Wann EG, Yuan RK, Dudman JT, Muzzio IA (2014). Precise spatial coding is preserved along the longitudinal hippocampal axis. *Hippocampus* **24**: 1533–1548.
- Kim JJ, DeCola JP, Landeira-Fernandez J, Fanselow MS (1991). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behav Neurosci* **105**: 126–133.
- Kim JJ, Fanselow MS (1992). Modality-Specific Retrograde-Amnesia of Fear. *Science (80-)* **256**: 675–677.
- Kitanishi T, Ikegaya Y, Matsuki N, Yamada MK (2009). Experience-dependent, rapid structural changes in hippocampal pyramidal cell spines. *Cereb Cortex* **19**: 2572–8.
- Kjelstrup KB, Solstad T, Brun VH, Hafting T, Leutgeb S, Witter MP, *et al* (2008). Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science (80-)* **321**: 140–143.
- Kritchevsky M, Squire LR (1989). Transient global amnesia: evidence for extensive, temporally graded retrograde amnesia. *Neurology* **39**: 213–218.
- LeDoux J (2007). The amygdala. *Curr Biol* **17**: .
- LeDoux JE (2014). Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 2871–2878.
- Lee JLC, Milton AL, Everitt BJ (2006). Reconsolidation and Extinction of Conditioned Fear: Inhibition and Potentiation. *J Neurosci* **26**: 10051–10056.
- Lehman M, Malmberg KJ (2013). A buffer model of memory encoding and temporal correlations in retrieval. *Psychol Rev* **120**: 155–189.
- Lisman J, Cooper K, Sehgal M, Silva AJ (2018). Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nat Neurosci* 1–6doi:10.1038/s41593-018-0076-6.
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, *et al* (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* **304**: 1021–4.
- Lohmann C, Wong ROL (2005). Regulation of dendritic growth and plasticity by local and global calcium dynamics. *Cell Calcium* **37**: 403–9.
- Malenka RC, Bear MF (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron* **44**: 5–21.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999). Long-term potentiation - A decade of progress? *Science (80-)* **285**: 1870–1874.
- Malinow R, Malenka RC (2002). AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annu Rev Neurosci* **25**: 103–126.
- Man H-Y (2011). GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors--inducers of plasticity? *Curr Opin Neurobiol* **21**: 291–8.
- Manahan-Vaughan D, Braunewell KH, Reymann KG (1998). Subtype-specific involvement of metabotropic glutamate receptors in two forms of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Neuroscience* **86**: 709–721.
- Manahan-Vaughan D, Reymann K. (1997). Group 1 metabotropic glutamate receptors

- contribute to slow-onset potentiation in the rat CA1 region in vivo. *Neuropharmacology* **36**: 1533–1538.
- Martin SJ, Hoz L De, Morris RGM (2005). Retrograde amnesia: Neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* **43**: 609–624.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**: 761–766.
- Matt L, Hell JW (2014). LTP: GluN2B on the go. *EMBO J* **33**: 781–782.
- Maurer AP, VanRhoads SR, Sutherland GR, Lipa P, McNaughton BL (2005). Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus* **15**: 841–852.
- Maviel T (2004). Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science (80-)* **305**: 96–99.
- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neortex: Insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* **102**: 419–57.
- McGaugh JL (2000). Memory--a Century of Consolidation. *Science (80-)* **287**: 248–251.
- Morris RG (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* **9**: 3040–3057.
- Morris RGM (1999). D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull* **50**: 437.
- Morris RGR, Anderson E, Lynch GSG, Baudry M, Anderson A, Baudry B (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an iV-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**: 774–776.
- Motanis H, Maroun M, Barkai E (2014). Learning-induced bidirectional plasticity of intrinsic neuronal excitability reflects the valence of the outcome. *Cereb Cortex* **24**: 1075–1087.
- Moyer JR, Thompson LT, Disterhoft JF (1996). Trace eyeblink conditioning increases CA1 excitability in a transient and learning-specific manner. *J Neurosci* **16**: 5536–5546.
- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* **511**: 348–352.
- Nádasy Z, Hirase H, Czurkó A, Csicsvari J, Buzsáki G (1999). Replay and Time Compression of Recurring Spike Sequences in the Hippocampus. *J Neurosci* **19**: 9497–9507.
- Nadel L, Moscovitch M (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 217–227.
- Nicoll RA, Malenka RC (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **377**: 115–118.
- Nicoll RA, Schmitz D (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* **6**: 863–876.
- Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo MM, Kato K (2000). Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* **408**: 584–588.
- Oh MM, Kuo AG, Wu WW, Sametsky E a, Disterhoft JF (2003). Watermaze learning enhances excitability of CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **90**: 2171–9.
- Okuno H (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res* **69**: 175–186.
- Oliveira Alvares L de, Einarsson EO, 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**: .
- Oliveira Alvares L De, Genro BP, Diehl F, Quillfeldt JA (2008). Differential role of the

- hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* **90**: 1–9.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* **14**: 383–400.
- Pedraza LK, Sierra RO, Crestani AP, Quillfeldt JA, Oliveira Alvares L de (2017a). Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: Implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus* **27**: .
- Pedraza LK, Sierra RO, Crestani AP, Quillfeldt JA, Oliveira Alvares L de (2017b). Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: Implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus* **27**: 518–528.
- Petrovic MM, Viana Da Silva S, Clement JP, Vyklícky L, Mulle C, González-González IM, *et al* (2017). Metabotropic action of postsynaptic kainate receptors triggers hippocampal long-term potentiation. *Nat Neurosci* **20**: 529–539.
- PITKÄNEN A, PIKKARAINEN M, NURMINEN N, YLINEN A (2006). Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat: A Review. *Ann N Y Acad Sci* **911**: 369–391.
- Plant K, Pelkey KA, Bortolotto ZA, Morita D, Terashima A, McBain CJ, *et al* (2006). Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat Neurosci* **9**: 602–604.
- Ploski JE, McIntyre CK (2015). Emotional modulation of synapses, circuits and memory. *Front Behav Neurosci* **9**: 35.
- Quinlan EM, Lebel D, Brosh I, Barkai E (2004). A Molecular Mechanism for Stabilization of Learning-Induced Synaptic Modifications. *Neuron* **41**: 185–192.
- Rashid AJ, Yan C, Mercaldo V, Hsiang H-L, Park S, Cole CJ, *et al* (2016). Competition between engrams influences fear memory formation and recall. *Science (80-)* **353**: 383–387.
- Riedel G, Reymann KG (1996). Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. *Acta Physiol Scand* **157**: 1–19.
- Roesler R, Vianna M, Sant’ Anna MK, Kuyven CR, Krüel AVS, Quevedo J, *et al* (1998). Intrahippocampal Infusion of the NMDA Receptor Antagonist AP5 Impairs Retention of an Inhibitory Avoidance Task: Protection from Impairment by Pretraining or Preexposure to the Task Apparatus. *Neurobiol Learn Mem* **69**: 87–91.
- Rogerson T, Cai DJ, Frank A, Sano Y, Shobe J, Lopez-Aranda MF, *et al* (2014). Synaptic tagging during memory allocation. *Nat Rev Neurosci* **15**: 157–169.
- Rogerson T, Jayaprakash B, Cai DJ, Sano Y, Lee YS, Zhou Y, *et al* (2016). Molecular and cellular mechanisms for trapping and activating emotional memories. *PLoS One* **11**: .
- Royer S, Sirota A, Patel J, Buzsáki G (2010). Distinct Representations and Theta Dynamics in Dorsal and Ventral Hippocampus. *J Neurosci* **30**: 1777–1787.
- Rudy JW, Matus-Amat P (2005). The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: Implications for a unitary function of the hippocampus. *Behav Neurosci* **119**: 154–163.
- Ryan TJ, Roy DS, Pignatelli M, Arons A, Tonegawa S (2015). Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science (80-)* **348**: 1007–1013.
- Saar D, Barkai E (2003). Long-term modifications in intrinsic neuronal properties and rule learning in rats. *Eur J Neurosci* **17**: 2727–2734.
- Saar D, Grossman Y, Barkai E (1999). Reduced synaptic facilitation between pyramidal neurons in the piriform cortex after odor learning. *J Neurosci* **19**: 8616–8622.
- Saar D, Grossman Y, Barkai E (2001). Long-lasting cholinergic modulation underlies rule learning in rats. *J Neurosci* **21**: 1385–1392.
- Sacktor TC (2008). *PKM-zeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of*

- memory storage. *Prog Brain Res* **169**: .
- Sanders J, Cowansage K, Baumgartel K, Mayford M (2012). Elimination of Dendritic Spines with Long-Term Memory Is Specific to Active Circuits. *J Neurosci* **32**: 12570–12578.
- Sanders MJ, Fanselow MS (2003). Pre-training prevents context fear conditioning deficits produced by hippocampal NMDA receptor blockade. *Neurobiol Learn Mem* **80**: 123–129.
- Schröder UH, Müller T, Schreiber R, Stolle A, Zuschratter W, Balschun D, *et al* (2008). The potent non-competitive mGlu1 receptor antagonist BAY 36-7620 differentially affects synaptic plasticity in area cornu ammonis 1 of rat hippocampal slices and impairs acquisition in the water maze task in mice. *Neuroscience* **157**: 385–395.
- Schulz B, Fendt M, Gasparini F, Lingenhöhl K, Kuhn R, Koch M (2001). The metabotropic glutamate receptor antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) blocks fear conditioning in rats. *Neuropharmacology* **41**: 1–7.
- Sierra RO, Pedraza LK, Zanona QK, Santana F, Boos FZ, Crestani AP, *et al* (2017). Reconsolidation-induced rescue of a remote fear memory blocked by an early cortical inhibition: Involvement of the anterior cingulate cortex and the mediation by the thalamic nucleus reuniens. *Hippocampus* **27**: .
- Simonyi A, Schachtman TR, Christoffersen GRJ (2010). Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonism in learning and memory. *Eur J Pharmacol* **639**: 17–25.
- Simonyi A, Serfozo P, Shelat PB, Dopheide MM, Coulibaly AP, Schachtman TR (2007). Differential roles of hippocampal metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in inhibitory avoidance learning. *Neurobiol Learn Mem* **88**: 305–311.
- Squire LR, Alvarez P (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 169–177.
- Squire LR, Zola SM (1998). Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus* **8**: 205–211.
- Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* **15**: 655–669.
- Szapiro G, Izquierdo L., Alonso M, Barros D, Paratcha G, Ardenghi P, *et al* (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience* **99**: 1–5.
- Taylor KK, Lowry E, Tanaka K, Levy B, Reijmers L, Mayford M, *et al* (2011). Characterization of NMDAR-Independent Learning in the Hippocampus. *Front Behav Neurosci* **5**: 1–12.
- Taylor KK, Wiltgen BJ (2013). New methods for understanding systems consolidation. *Learn Mem* **20**: 553–557.
- Thompson CL, Pathak SD, Jeromin A, Ng LL, MacPherson CR, Mortrud MT, *et al* (2008). Genomic Anatomy of the Hippocampus. *Neuron* **60**: 1010–1021.
- Thompson LT, Moyer JR, Disterhoft JF (1996). Transient changes in excitability of rabbit CA3 neurons with a time course appropriate to support memory consolidation. *J Neurophysiol* **76**: 1836–1849.
- Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, Redondo R (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron* **87**: 918–931.
- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, *et al* (2007). Schemas and Memory Consolidation. *Science (80-)* **316**: 76–82.
- Tse D, Takeuchi T, Kakeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, *et al* (2011). Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex. *Science (80-)* **333**: 891–895.
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, *et al* (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density

- proteins. *Neuron* **23**: 583–592.
- Turrigiano G (2012). Homeostatic synaptic plasticity: Local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**: .
- Urban NN, Barrionuevo G (1996). Induction of hebbian and non-hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation. *J Neurosci* **16**: 4293–9.
- Varela C, Weiss S, Meyer R, Halassa M, Biedenkapp J, Wilson MA, *et al* (2016). Tracking the Time-Dependent Role of the Hippocampus in Memory Recall Using DREADDs. *PLoS One* **11**: e0154374.
- Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Souza MM de, Rodrigues C, Sant’Anna MK, *et al* (2001). Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Brazilian J Med Biol Res* **34**: 233–40.
- Voglis G, Tavernarakis N (2006). The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* **7**: 1104–1110.
- Wang H, Ardiles AO, Yang S, Tran T, Posada-Duque R, Valdivia G, *et al* (2016). Metabotropic Glutamate Receptors Induce a Form of LTP Controlled by Translation and Arc Signaling in the Hippocampus. *J Neurosci* **36**: 1723–1729.
- Wang SH, Finnie PSB, Hardt O, Nader K (2012). Dorsal hippocampus is necessary for novel learning but sufficient for subsequent similar learning. *Hippocampus* **22**: 2157–2170.
- Willard SS, Koochekpour S (2013). Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci* **9**: 948–959.
- Wilson M, McNaughton B (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science (80-)* **265**: 676–679.
- Wiltgen BJ, Royle GA, Gray EE, Abdipranoto A, Thangthaeng N, Jacobs N, *et al* (2010). A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One* **5**: .
- Wiltgen BJ, Wood AN, Levy B (2011a). The cellular mechanisms of memory are modified by experience. *Learn Mem* **18**: 747–50.
- Wiltgen BJ, Wood AN, Levy B (2011b). The cellular mechanisms of memory are modified by experience. *Learn Mem* **18**: 747–750.
- Winocur G (1984). The effects of retroactive and proactive interference on learning and memory in old and young rats. *Dev Psychobiol* **17**: 537–545.
- Winocur G, Moscovitch M (2011). Memory transformation and systems consolidation. *J Int Neuropsychol Soc* **17**: 766–780.
- Winocur G, Moscovitch M, Fogel S, Rosenbaum RS, Sekeres M (2005). Preserved spatial memory after hippocampal lesions: effects of extensive experience in a complex environment. *Nat Neurosci* **8**: 273–275.
- Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M (2007). Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat Neurosci* **10**: 555–557.
- Yiu AP, Mercaldo V, Yan C, Richards B, Rashid AJ, Hsiang HLL, *et al* (2014). Neurons Are Recruited to a Memory Trace Based on Relative Neuronal Excitability Immediately before Training. *Neuron* **83**: 722–735.
- Young SL, Bohenek DL, Fanselow MS (1994). NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav Neurosci* **108**: 19–29.
- Zangenehpour S, Chaudhuri A (2002). Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Mol Brain Res* **109**: 221–225.
- Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J, *et al* (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat*

Neurosci **12**: 1438–1443.

9. APÊNDICE

REVIEW

Can Previous Learning Alter Future Plasticity Mechanisms?

Ana Paula Crestani and Jorge Alberto Quillfeldt
Federal University of Rio Grande do Sul

The dynamic processes related to mnemonic plasticity have been extensively researched in the last decades. More recently, studies have attracted attention because they show an unusual plasticity mechanism that is independent of the receptor most usually related to *first-time learning*—that is, memory acquisition—the NMDA receptor. An interesting feature of this type of learning is that a previous experience may cause modifications in the plasticity mechanism of a subsequent learning, suggesting that prior experience in a very similar task triggers a memory acquisition process that does not depend on NMDARs. The intracellular molecular cascades necessary to assist the learning process seem to depend on the activation of hippocampal CP-AMPA receptors. Moreover, most of these studies were performed on hippocampus-dependent tasks, even though other brain areas, such as the basolateral amygdala, also display NMDAR-independent learning.

Keywords: subsequent learning, NMDAR-independent learning, first-time learning, CP-AMPA receptors, reextinction

During many decades, it was thought that learning and memory were essentially a process dependent on NMDA receptors (NMDARs; LeDoux, 2000). Several studies have demonstrated how the manipulation of glutamatergic transmission interferes with memory formation. Blocking of NMDARs impairs acquisition and consolidation in different behavioral tasks, such as the water maze (Cain, Saucier, Hall, Hargreaves, & Boon, 1996; Morris, 1989; Morris, Anderson, Lynch, & Baudry, 1986), contextual fear conditioning (CFC; Fanselow, Kim, Yipp, & De Oca, 1994; J. J. Kim, DeCola, Landeira-Fernandez, & Fanselow, 1991; Young, Bohenek, & Fanselow, 1994), inhibitory avoidance (IA; Cercato et al., 2014), open field exposure (Vianna et al., 2001), object place memory (Faust, Robbiati, Huerta, & Huerta, 2013), conditioned place preference (Alagband & Marshall, 2013), and others. Furthermore, electrophysiological studies with NMDAR antagonists (Morris et al., 1986; Tsien, Huerta, & Tonegawa, 1996) and NMDAR-knockout animals (Huerta, Sun, Wilson, & Tonegawa, 2000; Shimizu, Tang, Rampon, & Tsien, 2000; Xia et al., 2005) have also found deficits in memory formation.

However, some studies suggest these receptors would not be required for all forms of learning. A first, previous learning can

alter the plasticity mechanisms of a subsequent, second learning (Bannerman, Good, Butcher, Ramsay, & Morris, 1995; Sanders & Fanselow, 2003; Roesler et al., 1998; Tayler et al., 2011; Wiltgen et al., 2010; Wiltgen, Wood, & Levy, 2011). This minireview will focus on the NMDAR-independent learning and discuss the necessary requirements for this type of learning to take place, including the underlying plasticity mechanisms.

NMDAR-Independent Learning and Hippocampus-Dependent Memory

NMDAR-independent learning was demonstrated in distinct behavioral tasks: the water maze, IA, CFC, and the radial maze (Caramanos & Shapiro, 1994). A pioneering study was performed in a water maze by Bannerman et al. (1995). In that study, the NMDAR antagonist 5-amino-phosphonovaleric acid (AP5) was able to impair the acquisition of a new memory. However, if the subjects had been previously trained in the water maze task, subsequent, second learning was not sensitive to AP5 any longer, suggesting that NMDARs were not necessary for the acquisition of the spatial representation of a new environment. Also, when the preceding learning was of spatial nature, the second, NMDAR-independent, yet still hippocampus-dependent, learning took place without restrictions; if a nonspatial water maze task is performed first, however, the NMDAR blockade deficit is prevented (Bannerman et al., 1995). In the same issue of *Nature* in which this research was presented, it was shown that the NMDAR antagonist NPC17742 (2R,4R,5S-2-amino-4,5-[1,2-cyclohexyl]-7-phosphonoheptanoic acid) does not prevent spatial learning in rats that were familiar with the task requirements in a nonspatial water maze (Saucier & Cain, 1995). Therefore, involvement of hippocampal NMDARs in memory may depend on the familiarity with task requirements and the environment. Nevertheless, NMDAR antagonists might potentially cause sensorimotor disturbance and masquerade as learning defi-

Ana Paula Crestani and Jorge Alberto Quillfeldt, Psychobiology and Neurocomputation Lab and Neuroscience Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul.

We thank Fernanda Nogueira Lotz Alves for her contributions in the preparation of this article.

Correspondence concerning this article should be addressed to Ana Paula Crestani, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (Psychobiology and Neurocomputation Lab), Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: paula.crestani@gmail.com

cits (Cain et al., 1996; Saucier, Hargreaves, Boon, Vanderwolf, & Cain, 1996). Recent work from Morris and colleagues have shown that sensorimotor disturbances can be avoided with a lower drug concentration, and that the pretraining phenomenon is dose-dependent (Inglis, Martin, & Morris, 2013; Morris, Steele, Bell, & Martin, 2013). All these studies display a similar finding: Under certain conditions, animals were able to learn without the NMDAR (Bannerman et al., 1995; Inglis et al., 2013; Morris et al., 2013; Saucier & Cain, 1995;).

When it comes to aversive memories—as in IA and CFC—the same phenomenon was observed. Roesler et al. (1998) showed that pretraining or preexposure to IA apparatus prevents the amnesic effect of AP5 in posterior learning. In CFC, the memory deficit caused by the infusion of an NMDA antagonist into the hippocampus was alleviated by a pretraining session in the same apparatus (Hardt, Wang, & Nader, 2009; Sanders & Fanselow, 2003). In support of these findings, Tayler et al. (2011) found that for animals trained in two different environments, learning of the second training session does not depend on the NMDAR, and the hippocampus was required for conditioning in both environments. In all of these aforementioned studies, subsequent learning remained hippocampus-dependent despite changes in learning-related synaptic plasticity.

On the other hand, some complications raised from studies included that the second training was dependent on a distinct hippocampal region (dorsal vs. ventral) or even a different brain structure (such as the entorhinal cortex; Cammarota, Bevilacqua, Köhler, Medina, & Izquierdo, 2005; de Hoz & Martin, 2014; Wang, Finnie, Hardt, & Nader, 2012). In these cases, the success of the second learning in the presence of the NMDAR antagonist may reflect an inactivity or independence from the brain area related to the first learning. For clarity, we will detail these three studies. In the first one, the work of Cammarota et al. (2005) evaluated the involvement of the striatum in IA learning by training the animals twice. The acquisition of a memory that requires the suppression of exploratory movements, such as IA, may be associated with the establishment of a habit, and habits tend to depend on the striatum (Knowlton, Mangels, & Squire, 1996). Accordingly, they found that the second IA learning involved the striatum instead of the hippocampus. Another interesting result, barely discussed, is that the acquisition/consolidation of one trial IA task required the normal functionality of type-I metabotropic glutamate receptors (mGluR1) in the striatum, despite the second round of learning being independent from mGluR1 in this brain structure (Cammarota et al., 2005). In the second study, Wang et al. (2002) showed that the first learning needs the integrity of the entire hippocampus, whereas the subsequent conditioning can be mediated either by the ventral or the dorsal hippocampus, depending on which area is needed. Additional data indicated that voltage-dependent calcium channels are not necessary for the second learning (Wang et al., 2012). The third article, from de Hoz and Martin (2014), suggests that once spatial information has been acquired in one context—for example, in the water maze—the ventral, rather than dorsal, hippocampus may mediate the consecutive learning in a distinct environment. These studies suggest that, under certain conditions, the second, subsequent learning could depend on a distinct brain area related to the first learning, and the NMDAR-independent acquisition could reflect only the independence from this particular brain area.

These findings in support of the hypothesis that learning can be acquired independently of NMDAR activation also raised the question of whether a previous learning could lead a second one, in a distinct behavioral task, to be NMDAR-independent. Thereby, a set of experiments demonstrated that animals were able to learn without NMDARs only when they were retrained on the same behavioral task. Moreover, temporal contingency remains viable after 15 or even 30 days between conditionings, and the second, subsequent learning could still take place without relying on NMDARs, suggesting a long-lasting change in the cellular mechanisms that were used to encode the related new information (Wiltgen et al., 2011).

Plasticity Mechanisms Related to NMDARs

NMDARs are ionic channels assembled from four subunits (a heterotetramer). They may be composed of GluN1, GluN2 (GluN2A-D), and GluN3 (GluN3A-B) subunits. The biophysical properties—for example, receptor permeability—and physiological roles of synaptic NMDARs are dependent on their subunit composition (Ladépêche, Dupuis, & Groc, 2014).

The NMDAR plays an essential role in the plasticity process by enabling calcium influx. Calcium acts as a second-messenger inducing activation of several intracellular biochemical cascades that lead to protein synthesis and synaptic strengthening. A central Ca^{2+} -sensitive protein that regulates these biochemical effects is calmodulin (CaM). In response to changes in intracellular Ca^{2+} , both CaMK IV and certain isoforms of CaMK II may influence gene expression. Moreover, CaMK II is directly involved in the modulation of neuronal adaptive responses regulating a large amount of substrates, such as MAP2, synapsin 1, and the GluA1/AMPA subunit. Ca^{2+} concentration influences cyclic AMP levels by activation of CaM-dependent adenylate cyclases, and also modulates the Ras signaling pathway. The activation of the Ras pathway results in the sequential activation of Raf, MEK-1, MAP kinases and ribosomal S6 kinases (Rsk), inducing gene expression (Konur & Ghosh, 2005; Ladépêche et al., 2014).

In those types of learning in which plasticity mechanisms were not mediated by NMDARs, other calcium permeable receptors must be recruited in order to trigger the intracellular molecular cascades necessary to induce protein synthesis and assist the learning process. This issue will be discussed in more detail in the following section.

A Model to Explain NMDAR-Independent Learning

Wiltgen's group (Tayler et al., 2011) proposed an interesting model to explain subsequent, NMDAR-independent learning. Being trained in a task—in that case, a context fear conditioning—activates and induces plasticity in a subset of hippocampal neurons that form the memory related to that experience. The plasticity induced by this *first learning* leads to an increase in synaptic strength and the expression of novel receptor proteins, which in turn will be able to mediate plasticity despite the presence of an NMDAR antagonist. The alteration in synaptic plasticity mechanisms promoted by the first learning enables the subsequent behavioral experience to take place in the absence of NMDAR activation. Tayler et al. suggested that NMDAR-independent learning is possible only if recently engaged neurons are reacti-

vated during subsequent learning. Therefore, contextual features seem to be an important condition to induce the reactivation of the cells involved in previous learning. Hence, the secondary context must be different enough to trigger new learning while not inducing memory generalization, and, at the same time, be sufficiently similar to the first environment in order to have a considerable amount of overlapping neurons. The work of Tayler et al. demonstrated that modifications in the degree of context similarity influence the NMDAR-dependence or NMDAR-independence of subsequent learning. A moderately similar environment is required for NMDAR-independent learning, and its context contributes to reduce memory generalization favored by a highly similar one. These experiments suggest that NMDAR-independent plasticity occurs only in previously activated cells. Thereafter, when contexts were distinct enough, NMDAR activation was once again required for learning (Tayler et al., 2011).

Assuming that NMDARs were not necessary for some types of learning, the next question was which receptor promotes this learning? A likely receptor would be calcium permeable-AMPA (CP-AMPA), which is involved with the plasticity mechanisms and is permeable to Ca^{2+} . To address this issue, Wiltgen et al. (2010) engineered mutant mice with a conditional deletion of GluR2 in the CA1 region of the hippocampus and elegantly demonstrated that GluR2-lacking CP-AMPA were a potential candidate cellular mechanism behind NMDAR-independent learning. Consistent with this well-described phenomenon in the hippocampus, NMDAR-independent learning was also observed in the barrel cortex. Experiments performed by Clem, Celikel, and Barth (2008) found that synaptic strengthening induced by a single whisker stimulation protocol initially requires NMDARs. However, ongoing whisker stimulation induces an NMDAR-independent synaptic strength, requiring mGluR and CP-AMPA (Clem & Barth, 2006; Clem et al., 2008). In this way, these studies support the hypothesis that subsequent learning reactivated a subset of neurons related to previous learning, and that some synaptic plasticity mechanism is modified by a previous behavioral experience.

When it comes to cellular signaling pathways, calcium influx from different types of calcium-permeable receptors does not necessarily act through the same molecular cascades. For instance, when comparing the NMDAR with the CP-AMPA, the former classically activates the Ca/CaM-dependent kinase II (CaMK II) pathway, whereas the latter requires phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/MAP kinases, but not CaMK II. Hence, both CP-AMPA and NMDARs have been shown to activate the ERK/MAPK signaling cascade and phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) through PI3K. Because CP-AMPA-dependent plasticity rules out the activity of CaMK II, alternate factors such as Ras and PI3K may be better candidates to activate the ERK/MAPK pathway in response to calcium (Asrar, Zhou, Ren, & Jia, 2009; Perkinton, Sihra, & Williams, 1999).

An intriguing question still remains unanswered regarding the immediate early genes (IEGs) that are activated in response to calcium influx from distinct receptors. The expression of Arc and *c-fos*, for instance, is mediated by NMDAR activation, even though this receptor is not required for some learning situations. The implication in this case, is that Arc and *c-fos* expression would not be required for NMDAR-independent learning (Wiltgen et al., 2011). More studies are necessary in order to understand how different calcium receptors mediate the activation of IEG.

NMDARs-Independent Learning and Extinction Memories in the Basolateral Amygdala (BLA)

Classically, activation of NMDAR in the BLA is required for context fear conditioning. In contrast to the idea that plasticity mechanisms in the hippocampus are dynamic and can be altered by prior behavioral experience, some studies reported that this phenomenon does not occur the same way in the BLA. Laurent and Westbrook (2009) demonstrated that neither context preexposure (familiarity) nor training twice in an identical context is enough to induce NMDAR-independent learning in the BLA. Moreover, subsequent fear conditioning to different stimuli, for example, first to light and second to tone, or performed in distinct contexts, remained dependent upon NMDAR activation (Lee & Kim, 1998). However, another work suggested that the plasticity mechanisms are changed because of repeated training, being initially dependent, but not later, on the NMDA (Pistell & Falls, 2008). In addition to the contrasting results, there is a lack of research evaluating the dynamic of other types of glutamate receptors (e.g., CP-AMPA and mGluRs) after retraining, or subsequent training in a similar context. When we manage to understand glutamate receptor dynamics in the BLA induced by subsequent learning, we would be able to tackle the particularities of local NMDA-independent learning mechanisms.

On the other hand, thinking more broadly about mnemonic processes, prior learning might influence not only a similar experience but also subsequent learning with different, even opposite meaning, as is the case for an extinction memory. Nowadays, it is widely accepted that an extinction memory is a second, new memory trace, which has a *transient* inhibitory effect upon a previously consolidated memory. For aversive memories, for which a conditioned stimulus (conditional stimulus [CS]) is paired with an unconditioned stimulus (US), an extinction memory is formed after a long or repeated reexposure to the CS without the presence of the US, leading to a decline in the expression of the conditioned response (Berman & Dudai, 2001). Many studies have extensively characterized extinction memories, and their behavioral and molecular bases are now at least partially well established. Regarding the importance of NMDARs during extinction process, animals cannot learn to inhibit fear related to the original conditioning if NMDARs are blocked (Quirk & Mueller, 2008; Zimmerman & Maren, 2010). Furthermore, it has been demonstrated that CP-AMPA are crucial to the erasure of the memory trace in a specific protocol of extinction, as well as in the memory reconsolidation process in the lateral amygdala (Clem & Haganir, 2010; Hong et al., 2013).

Additionally, there is an indication that learning of extinction is also modulated by previous experience. For instance, Langton and Richardson (2008, 2009) demonstrated that when D-cycloserine (a NMDAR partial agonist) is used to facilitate, and MK-801 (a NMDAR antagonist) to prevent, the first extinction, the second extinction becomes insensitive to either NMDAR agonists or antagonists, provided that both extinctions involve the same CS. Conversely, Chan and McNally (2009) showed that CS familiarity influences the sensitivity to the NMDAR antagonist. Thereby, these data suggest that reextinction is also an NMDA-independent process, in a nice analogy to what we have been observing in first-second learning situations.

In agreement with reports that demonstrated that subsequent learning could depend on distinct brain areas related to the first learning, studies with pharmacological inactivation have, however, indicated that the BLA may not be required for memory reextinction (J. H. Kim & Richardson, 2008; Laurent, Marchand, & Westbrook, 2008). On the other side, the ventral medial prefrontal cortex has been shown to play an important role in the effectiveness of extinction and reextinction processes (Morgan, Schulkin, & LeDoux, 2003).

All these extinction-related findings support the idea that a previous learning experience—either the acquisition or the inhibition of fear—can alter the molecular mechanisms that trigger, respectively, the acquisition or the extinction of subsequent memories not only in the hippocampus but also in the amygdala.

Concluding Remarks

Currently, despite having accumulated a relatively elaborate understanding about memory plasticity behind the different phases of memory processing, we lack information on quite ordinary situations such as how a (first-time) learning may affect a second, subsequent one. Here, we reviewed some studies evaluating specific conditions and plasticity substrates (receptors, etc.) that seem to be involved in what is being called a “subsequent learning” process. The evidence converges, in that previous learning can modify the plasticity mechanism of subsequent learning, frequently turning it into an NMDAR-independent process. It is necessary to further investigate these events in order to better understand (a) the intracellular molecular cascades necessary to support these otherwise different learning mechanisms, (b) the role of temporal contingency between sequential learnings, and (c) which brain areas may be recruited by each task. The fact that animals are not “blank slates,” but instead are ever learning, just reinforces the importance of knowing these and other specific conditions able to induce this switching between plasticity states that is not only extremely relevant but also common.

References

- Alagband, Y., & Marshall, J. F. (2013). Common influences of non-competitive NMDA receptor antagonists on the consolidation and reconsolidation of cocaine-cue memory. *Psychopharmacology*, *226*, 707–719. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-012-2793-y>
- Asrar, S., Zhou, Z., Ren, W., & Jia, Z. (2009). Ca²⁺ permeable AMPA receptor induced long-term potentiation requires PI3/MAP kinases but not Ca/CaM-dependent kinase II. *PLoS One*, *4*, e4339. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004339>
- Bannerman, D. M., Good, M. A., Butcher, S. P., Ramsay, M., & Morris, R. G. (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature*, *378*, 182–186. <http://dx.doi.org/10.1038/378182a0>
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, *291*, 2417–2419. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1058165>
- Cain, D. P., Saucier, D., Hall, J., Hargreaves, E. L., & Boon, F. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: Contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behavioral Neuroscience*, *110*, 86–102. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.110.1.86>
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Köhler, C., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Learning twice is different from learning once and from learning more. *Neuroscience*, *132*, 273–279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.022>
- Caramanos, Z., & Shapiro, M. L. (1994). Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: Memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behavioral Neuroscience*, *108*, 30–43. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.108.1.30>
- Cercato, M. C., Coletti, N., Snitcowsky, M., Aguirre, A. I., Kornisiuk, E. E., Baez, M. V., & Jerusalinsky, D. A. (2014). Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *Journal of Physiology, Paris*, *108*, 263–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.08.001>
- Chan, W. Y., & McNally, G. P. (2009). Conditioned stimulus familiarity determines effects of MK-801 on fear extinction. *Behavioral Neuroscience*, *123*, 303–314. <http://dx.doi.org/10.1037/a0014988>
- Clem, R. L., & Barth, A. (2006). Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. *Neuron*, *49*, 663–670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.019>
- Clem, R. L., Celikel, T., & Barth, A. L. (2008). Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science*, *319*, 101–104. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1143808>
- Clem, R. L., & Huganir, R. L. (2010). Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science*, *330*, 1108–1112. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1195298>
- de Hoz, L., & Martin, S. J. (2014). Double dissociation between the contributions of the septal and temporal hippocampus to spatial learning: The role of prior experience. *Hippocampus*, *24*, 990–1005. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22285>
- Fanselow, M. S., Kim, J. J., Yipp, J., & De Oca, B. (1994). Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behavioral Neuroscience*, *108*, 235–240. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.108.2.235>
- Faust, T. W., Robbiati, S., Huerta, T. S., & Huerta, P. T. (2013). Dynamic NMDAR-mediated properties of place cells during the object place memory task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*, 202. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00202>
- Hardt, O., Wang, S. H., & Nader, K. (2009). Storage or retrieval deficit: The yin and yang of amnesia. *Learning & Memory*, *16*, 224–230. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.1267409>
- Hong, I., Kim, J., Kim, J., Lee, S., Ko, H. G., Nader, K., . . . Choi, S. (2013). AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, 8218–8223. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305235110>
- Huerta, P. T., Sun, L. D., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2000). Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, *25*, 473–480. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80909-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80909-5)
- Inglis, J., Martin, S. J., & Morris, R. G. M. (2013). Upstairs/downstairs revisited: Spatial pretraining-induced rescue of normal spatial learning during selective blockade of hippocampal N-methyl-d-aspartate receptors. *European Journal of Neuroscience*, *37*, 718–727. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.12087>
- Kim, J. H., & Richardson, R. (2008). The effect of temporary amygdala inactivation on extinction and reextinction of fear in the developing rat: Unlearning as a potential mechanism for extinction early in development. *The Journal of Neuroscience*, *28*, 1282–1290. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4736-07.2008>
- Kim, J. J., DeCola, J. P., Landeira-Fernandez, J., & Fanselow, M. S. (1991). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *105*, 126–133. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.105.1.126>

- Knowlton, B. J., Mangels, J. A., & Squire, L. R. (1996). A neostriatal habit learning system in humans. *Science*, 273, 1399–1402. <http://dx.doi.org/10.1126/science.273.5280.1399>
- Konur, S., & Ghosh, A. (2005). Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron*, 46, 401–405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.022>
- Ladépêche, L., Dupuis, J. P., & Groc, L. (2014). Surface trafficking of NMDA receptors: Gathering from a partner to another. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 27, 3–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.10.005>
- Langton, J. M., & Richardson, R. (2008). D-cycloserine facilitates extinction the first time but not the second time: An examination of the role of NMDA across the course of repeated extinction sessions. *Neuropsychopharmacology*, 33, 3096–3102. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2008.32>
- Langton, J. M., & Richardson, R. (2009). The role of context in the re-extinction of learned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 496–503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.06.008>
- Laurent, V., Marchand, A. R., & Westbrook, R. F. (2008). The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear. *Learning & Memory*, 15, 304–314. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.928208>
- Laurent, V., & Westbrook, R. F. (2009). Infusion of the NMDA receptor antagonist, DL-APV, into the basolateral amygdala disrupts learning to fear a novel and a familiar context as well as relearning to fear an extinguished context. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16, 96–105. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.1218709>
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155–184. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Lee, H., & Kim, J. J. (1998). Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *The Journal of Neuroscience*, 18, 8444–8454.
- Morgan, M. A., Schulkin, J., & LeDoux, J. E. (2003). Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: The memory for prior extinction training. *Behavioural Brain Research*, 146, 121–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.021>
- Morris, R. G. (1989). Synaptic plasticity and learning: Selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *The Journal of Neuroscience*, 9, 3040–3057.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319, 774–776. <http://dx.doi.org/10.1038/319774a0>
- Morris, R. G., Steele, R. J., Bell, J. E., & Martin, S. J. (2013). N-methyl-D-aspartate receptors, learning and memory: Chronic intraventricular infusion of the NMDA receptor antagonist D-AP5 interacts directly with the neural mechanisms of spatial learning. *European Journal of Neuroscience*, 37, 700–717.
- Perkinton, M. S., Sihra, T. S., & Williams, R. J. (1999). Ca(2+)-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19, 5861–5874.
- Pistell, P. J., & Falls, W. A. (2008). Extended fear conditioning reveals a role for both N-methyl-D-aspartic acid and non-N-methyl-D-aspartic acid receptors in the amygdala in the acquisition of conditioned fear. *Neuroscience*, 155, 1011–1020.
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33, 56–72. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301555>
- Roesler, R., Vianna, M., Sant'Anna, M. K., Kuyven, C. R., Krueel, A. V., Quevedo, J., & Ferreira, M. B. (1998). Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: Protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69, 87–91. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.1997.3810>
- Sanders, M. J., & Fanselow, M. S. (2003). Pre-training prevents context fear conditioning deficits produced by hippocampal NMDA receptor blockade. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 123–129. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00040-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00040-6)
- Saucier, D., & Cain, D. P. (1995). Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature*, 378, 186–189. <http://dx.doi.org/10.1038/378186a0>
- Saucier, D., Hargreaves, E. L., Boon, F., Vanderwolf, C. H., & Cain, D. P. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: Nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behavioral Neuroscience*, 110, 103–116. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.110.1.103>
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., & Tsien, J. Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290, 1170–1174. <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5494.1170>
- Taylor, K. K., Lowry, E., Tanaka, K., Levy, B., Reijmers, L., Mayford, M., & Wiltgen, B. J. (2011). Characterization of NMDAR-independent learning in the hippocampus. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 28. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00028>
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., & Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87, 1327–1338. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81827-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81827-9)
- Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., de Souza, M. M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M. K., . . . Izquierdo, I. (2001). Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 233–240. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2001000200011>
- Wang, S. H., Finnie, P. S., Hardt, O., & Nader, K. (2012). Dorsal hippocampus is necessary for novel learning but sufficient for subsequent similar learning. *Hippocampus*, 22, 2157–2170. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22036>
- Wiltgen, B. J., Royle, G. A., Gray, E. E., Abdipranoto, A., Thangthaeng, N., Jacobs, N., . . . Vissel, B. (2010). A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS ONE*, 5, e12818. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012818>
- Wiltgen, B. J., Wood, A. N., & Levy, B. (2011). The cellular mechanisms of memory are modified by experience. *Learning & Memory*, 18, 747–750. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.024026.111>
- Xia, S., Miyashita, T., Fu, T. F., Lin, W. Y., Wu, C. L., Pyzocha, L., . . . Chiang, A. S. (2005). NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in drosophila. *Current Biology*, 15, 603–615.
- Young, S. L., Bohenek, D. L., & Fanselow, M. S. (1994). NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: Immunization against amnesia by context preexposure. *Behavioral Neuroscience*, 108, 19–29. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.108.1.19>
- Zimmerman, J. M., & Maren, S. (2010). NMDA receptor antagonism in the basolateral but not central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats. *European Journal of Neuroscience*, 31, 1664–1670.

Received March 22, 2015

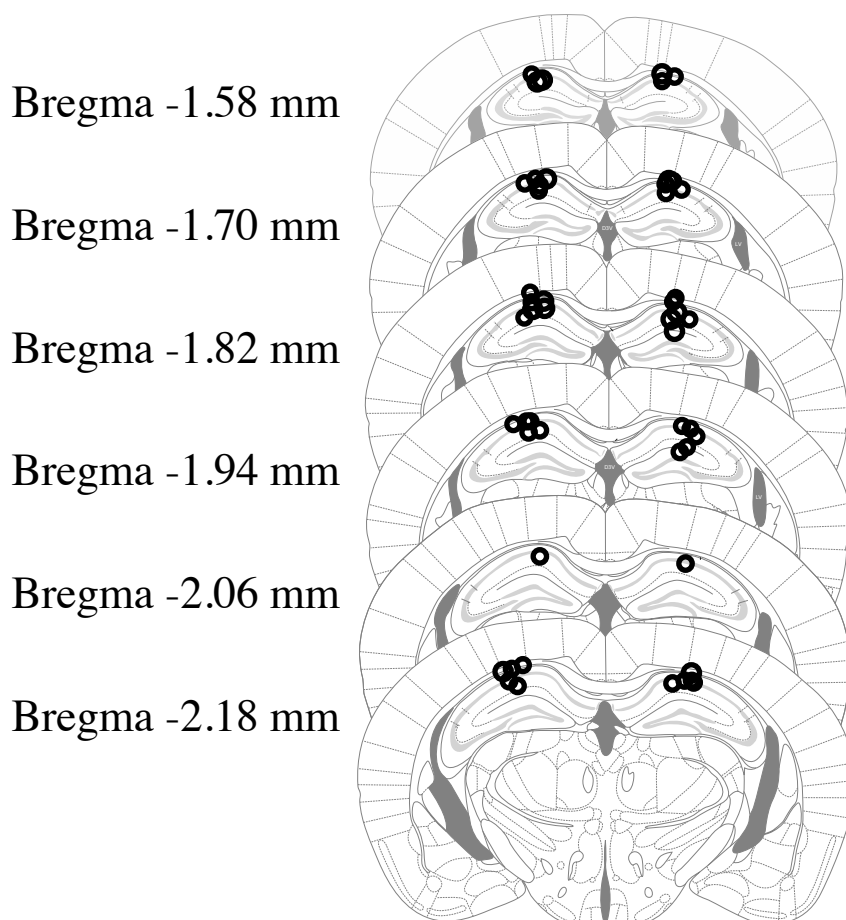
Revision received October 4, 2015

Accepted November 20, 2015 ■

CAPÍTULO I

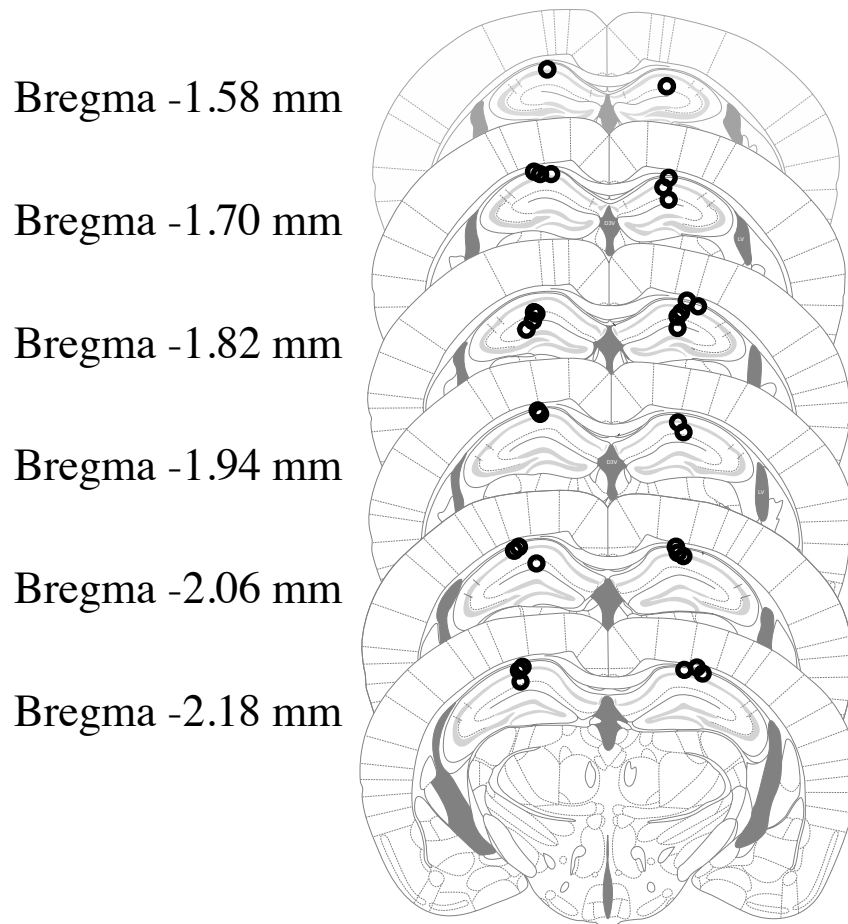
Figura I – Representação do posicionamento das cânulas no hipocampo dorsal. Camundongos que receberam a mesma droga estão representados no mesmo grupo. (A): salina (N = 35), (B): APV (N = 18), (C): MCPG (N = 12). Imagens adaptadas do “The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates”, G Paxinos and KBJ Franklin (Academic Press).

(A)



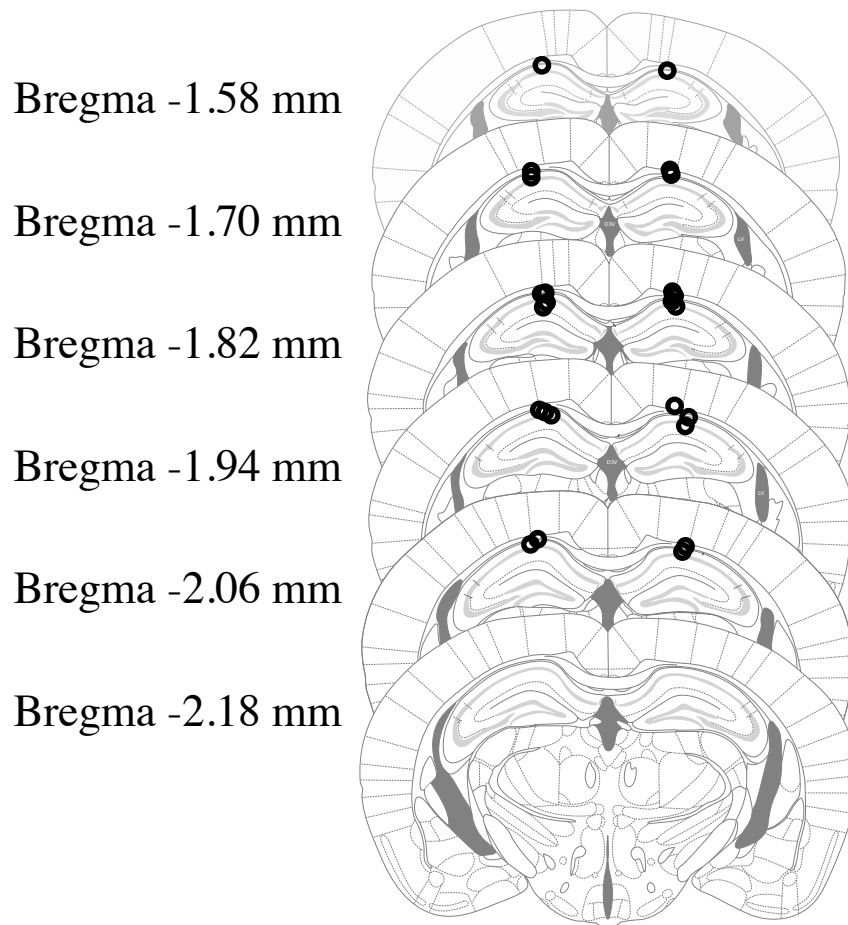
(A) Animais que receberam infusão de salina antes do treino 1 ou do treino 2 (N=35).

(B)



(B) Animais que receberam infusão de salina antes do treino 1 ou do treino 2 (N=18).

(C)



(C) Animais que receberam infusão de salina antes do treino 1 ou do treino 2 (N=12).

Camundongos duplos transgênico fos-tTA/tetO-H2B-GFP tiveram a doxiciclina retirada da alimentação dois dias antes do treino. Foram treinados no condicionamento aversivo ao contexto e imediatamente após voltaram a receber doxiciclina. Dois dias após o treino foram realizados os registros eletrofisiológicos nas células especificamente recrutadas para o aprendizado, marcadas com a proteína fluorescente H2B-GFP+ e nas células controle, sem proteína fluorescente (GFP-) (**Figura I**). Outros animais passaram pelo mesmo protocolo comportamental e foram re-treinados no contexto treino ou em um contexto novo. Noventa minutos após o re-treino eles foram perfundidos para posterior realização de imunofluorescência e quantificação da proteína c-fos (**Figura II**).

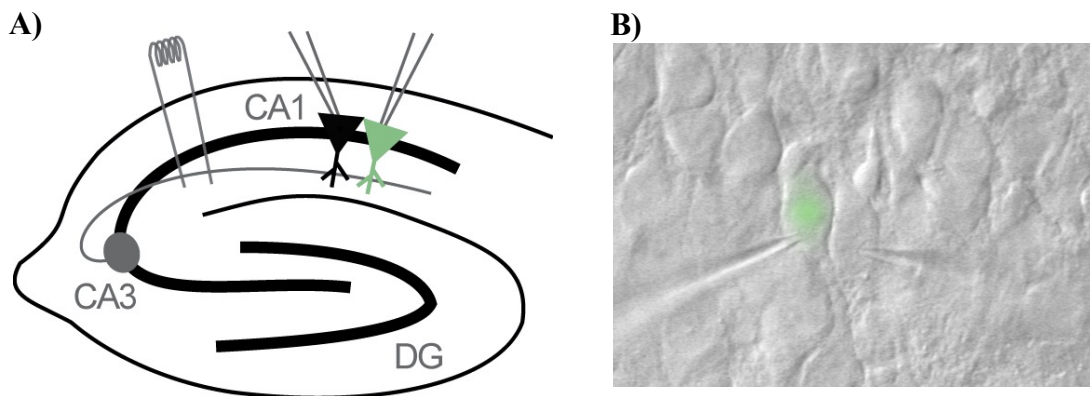


Figura II – Registro da excitabilidade neuronal através da técnica de *patch clamp*. (A) Representação esquemática da estimulação eletrofisiológica realizada nas colaterais de Schaffer do hipocampo e do registro realizado por *whole cell patch clamp* nas células piramidais da região CA1. (B) Imagem da camada piramidal de CA1 onde é possível identificar um neurônio GFP+ e um GFP-; obtida através do microscópio de epifluorescência.

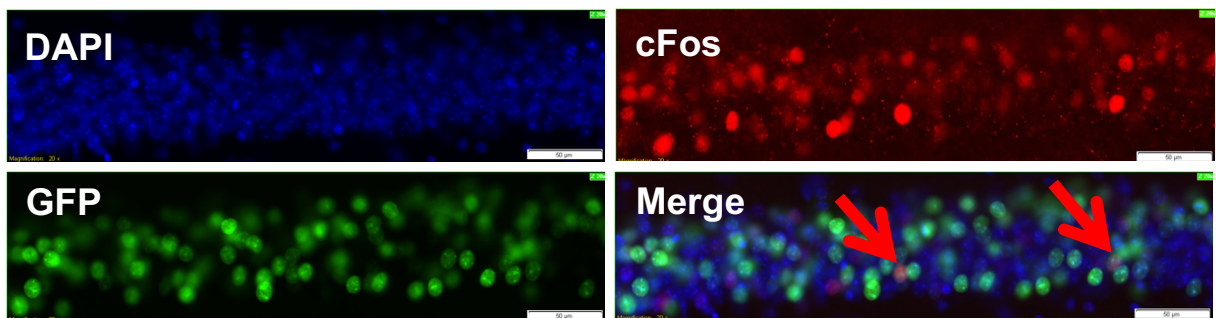


Figura III – Imunofluorescência para marcação da proteína c-fos, GFP e DAPI. Imagens representativas da marcação de DAPI (azul), c-fos (vermelho), GFP (verde) e a sobreposição (*merge*) de todos os canais (azul, vermelho e verde). As setas apontam neurônios que são GFP+ e c-fos+, sendo considerados neurônios que foram utilizados para ambos os aprendizados.

Para os experimentos abaixo, com microinfusão de fármacos intrahipocampo dorsal, foram utilizados camundongos híbridos B6/129.

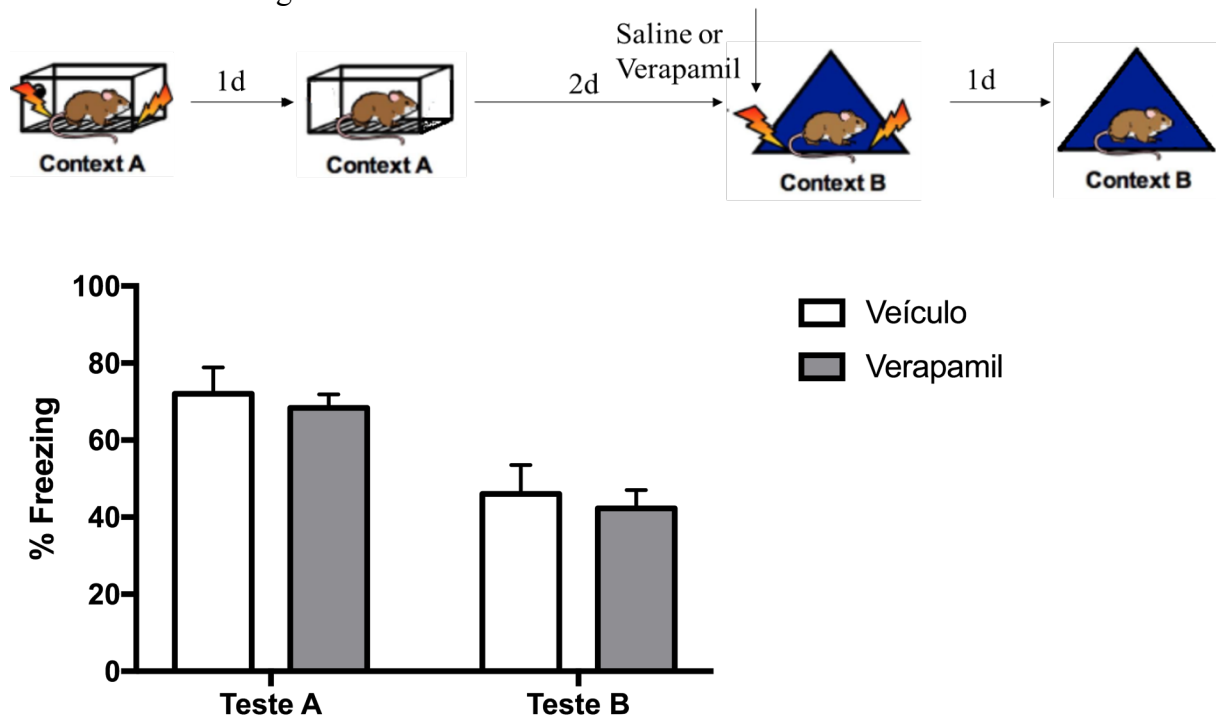


Figura IV – Inibição dos VGCC não prejudica a formação do aprendizado subsequente. Animais foram treinados no contexto A e 3 dias depois treinados no contexto B (N = 6, 7). O antagonista dos VGCCs (verapamil) foi infundido no hipocampo dorsal 15 minutos antes do treino no contexto B. ANOVA de medidas repetidas de duas vias indica que o verapamil não prejudicou a formação do aprendizado no contexto B, sem efeito de droga ($F_{(1,11)} = 0.3268, p > .05$) e sem interação ($F_{(1,11)} = 0.00, p > .05$); animais demonstraram menores respostas de medo (*freezing*) no contexto B quando comparado com o contexto A, efeito de contexto ($F_{(1,11)} = 31.56, p < .05$). Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante as sessões de teste e é expresso com média \pm S.E.M.

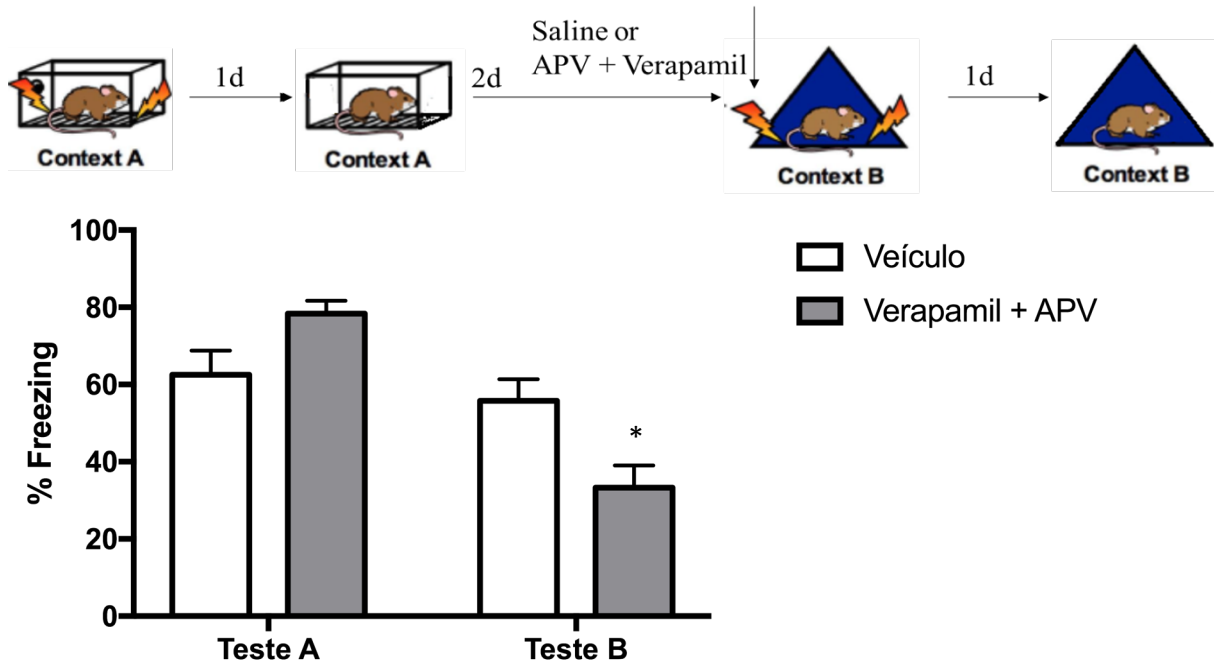


Figura V – Inibição dos VGCC + NMDAR prejudica a formação do aprendizado subsequente. Animais foram treinados no contexto A e 3 dias depois treinados no contexto B (N = 6, 6). O antagonista dos VGCCs (verapamil) foi infundido concomitantemente com o antagonista dos NMDARs (APV) no hipocampo dorsal 15 minutos antes do treino no contexto B. ANOVA de medidas repetidas de duas vias indicou efeito de interação ($F_{(1,10)} = 19.7, p < .05$), animais infundidos com verapamil + APV apresentaram menores respostas de medo (*freezing*) no contexto B quando comparados com o grupo veículo ($p < .05$). Também foi observado um efeito de contexto ($F_{(1,10)} = 36.01, p < .05$), animais apresentaram menores respostas de medo no contexto B; sem efeito de droga ($F_{(1,10)} = 0.2835, p > .05$). Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante as sessões de teste e é expresso com média \pm S.E.M.

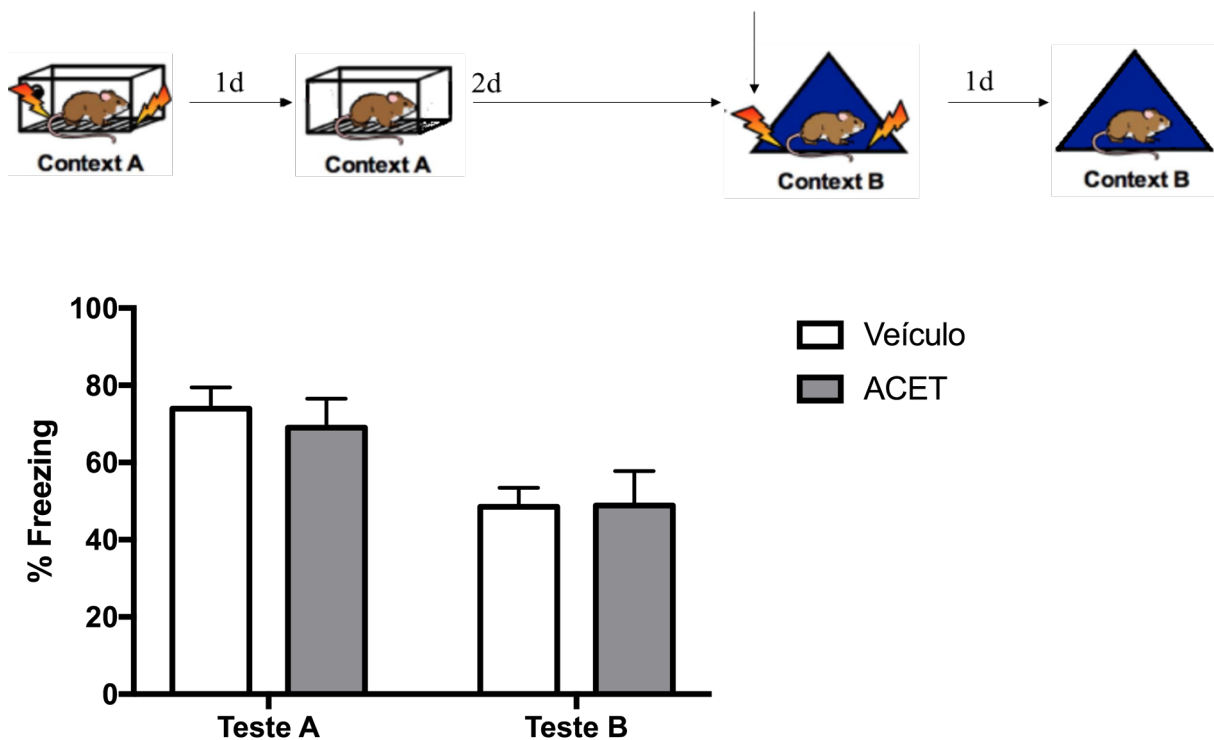


Figura VI – Inibidor dos KAR (ACET) não prejudica o segundo aprendizado.

Animais foram treinados no contexto A e 3 dias depois treinados no contexto B (N = 8, 7). O antagonista dos KARs (verapamil) foi infundido no hipocampo dorsal 15 minutos antes do treino no contexto B. ANOVA de medidas repetidas de duas vias mostrou não haver efeito de interação ($F_{(1,13)} = 0.24, p > .05$), nem efeito de droga ($F_{(1,13)} = 0.08, p > .05$); foi observado um efeito de ($F_{(1,13)} = 18.43, p < .05$), animais apresentaram menores respostas de medo no contexto B. Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante as sessões de teste e é expresso com média \pm S.E.M.

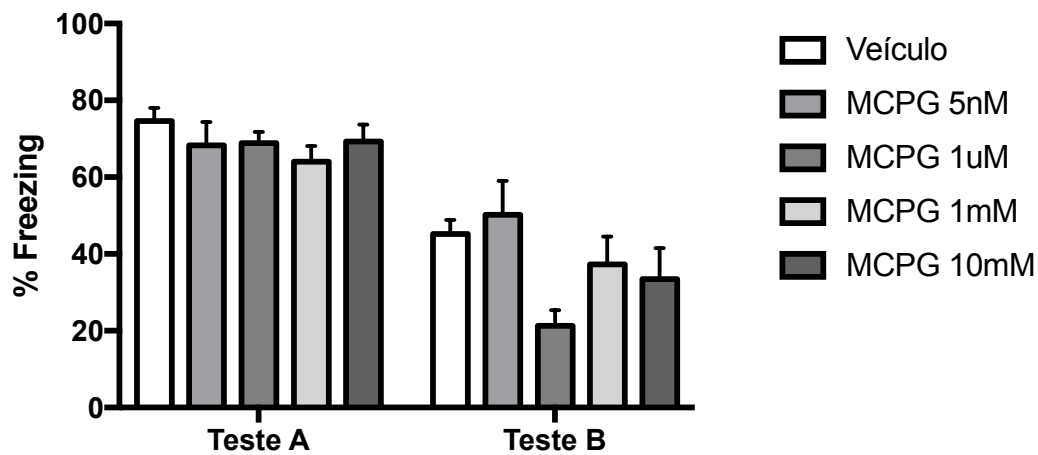


Figura VII – Curva dose-resposta do MCPG, antagonista dos mGluR do tipo I. Animais foram treinados no contexto A e 3 dias depois treinados no contexto B (N = 14, 6, 7, 8, 8). O antagonista dos mGluR do tipo I (verapamil) foi infundido no hipocampo dorsal 15 minutos antes do treino no contexto B. ANOVA de medidas repetidas de duas vias mostrou não haver efeito de interação ($F_{(4,76)} = 1.77, p > .05$); foi observado efeito de contexto ($F_{(1,76)} = 84.7, p < .05$) e efeito de droga ($F_{(4,76)} = 2.912, p < .05$), com MCPG 1uM diferindo do veículo. Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante as sessões de teste e é expresso com média \pm S.E.M.



Figura VIII – Fotografias dos contextos utilizados para os experimentos do capítulo I. À esquerda uma imagem do contexto A e à direita do contexto B.

CAPÍTULO II

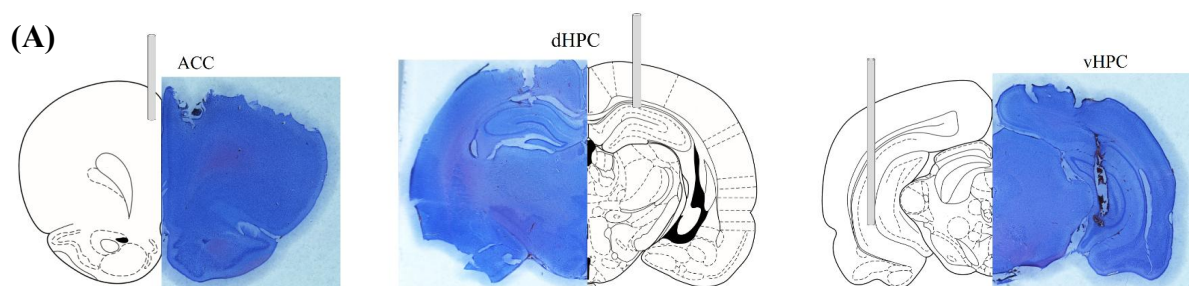


Figura IX – Posicionamento das cânulas no córtex cingulado anterior, hipocampo dorsal e ventral. (A) Imagens representativas de fatias coronais do encéfalo de ratos que foram fixadas e coradas com Nissl onde é possível ver o posicionamento da cânula. Imagem mais a esquerda representa o córtex cingulado anterior, a do meio representa o hipocampo dorsal e a da direita o hipocampo ventral.

Abaixo, representação do posicionamento das cânulas implantadas em cada animal no respectivo experimento. As representações recebem o mesmo nome da figura do artigo. Experimentos onde foram implantadas 4 cânulas estão representados por duas imagens (lado a lado) das estruturas alvo. Do lado de cada imagem estão discriminados o número de animais utilizados (N) e o fármaco infundido. VEH = veículo; MUS = muscimol; APV = (2*R*)-amino-5-phosphonovaleric acid. Imagens adaptadas do atlas “The rat brain in stereotaxic coordinates”, Paxinos, G & Watson, C (1998). San Diego, CA: Academic Press.

Figure 1A

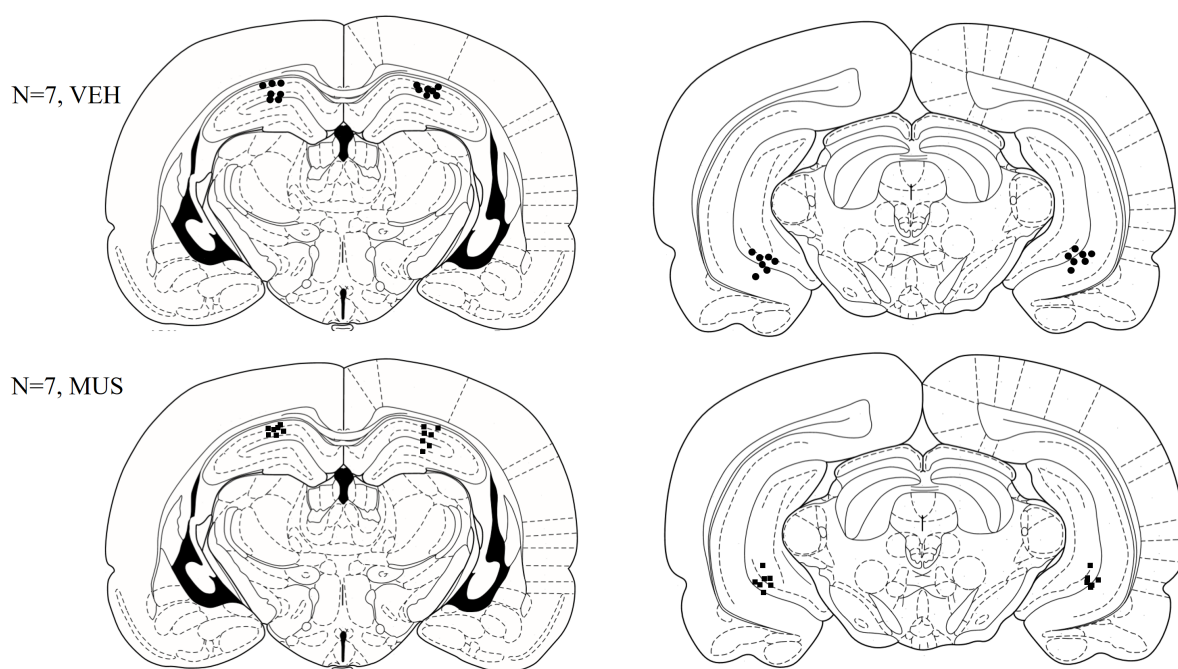
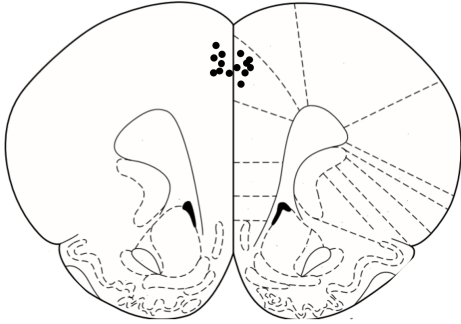


Figure 1B

N=7, VEH



N=9, MUS

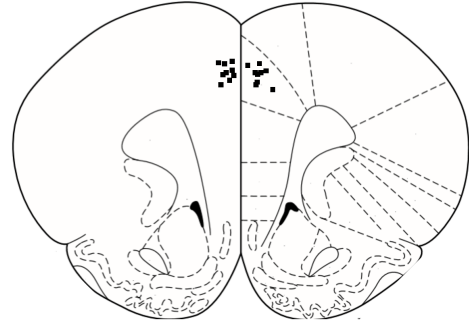
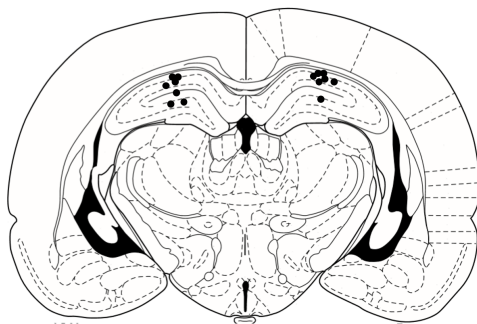


Figure 1C

N=7, VEH



N=9, MUS

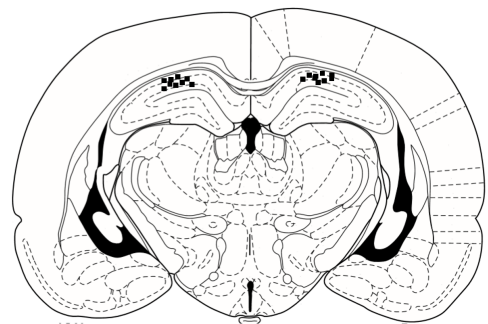
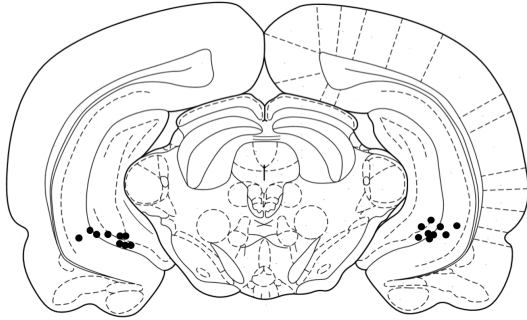


Figure 1D

N=9, VEH



N=10, MUS

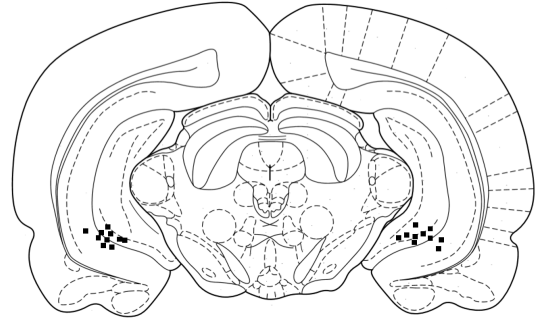
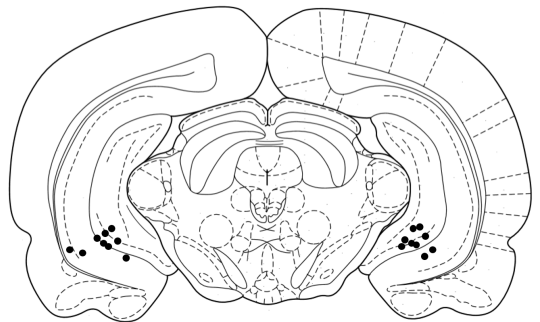
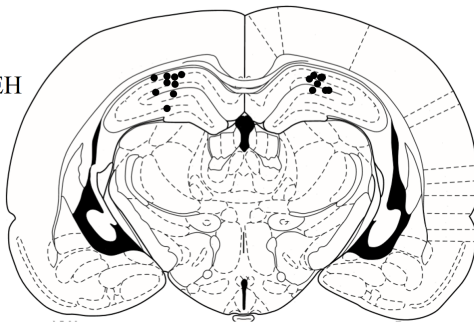


Figure 1E

N=9, VEH



N=10, MUS

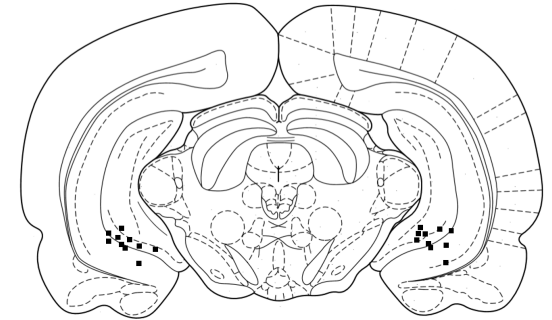
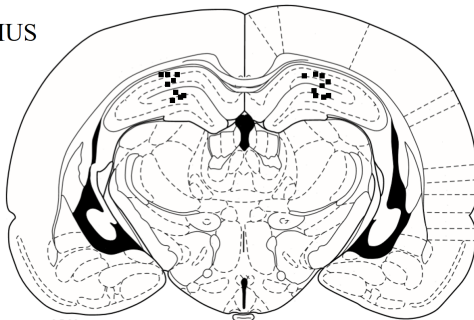


Figure 2A

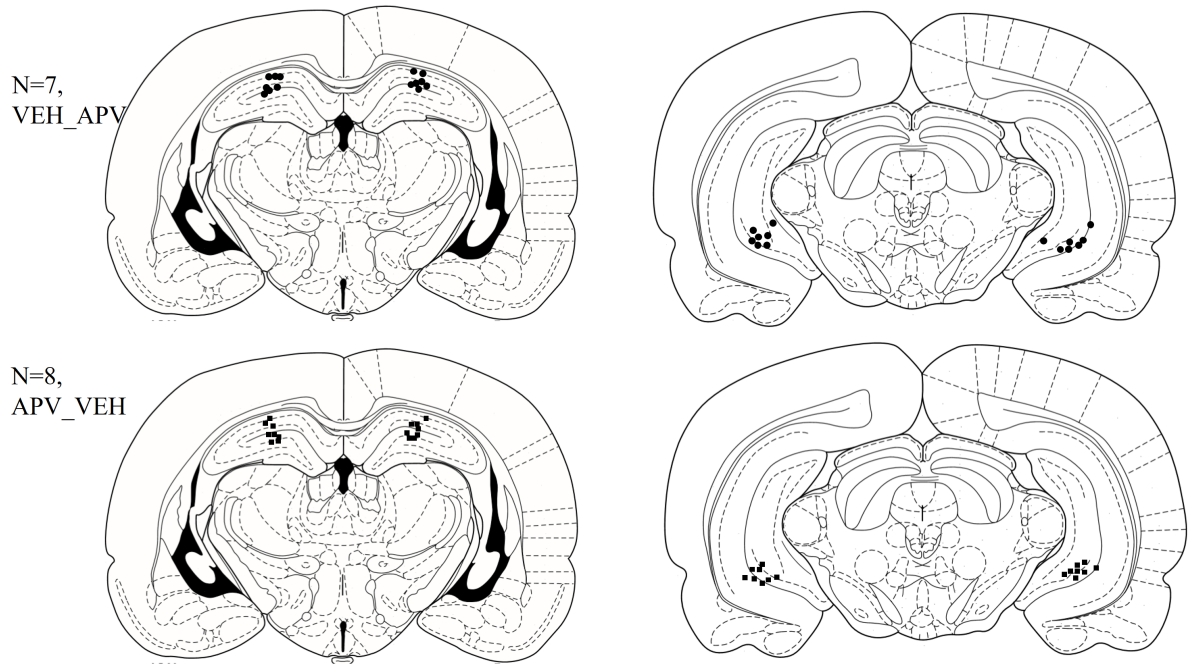
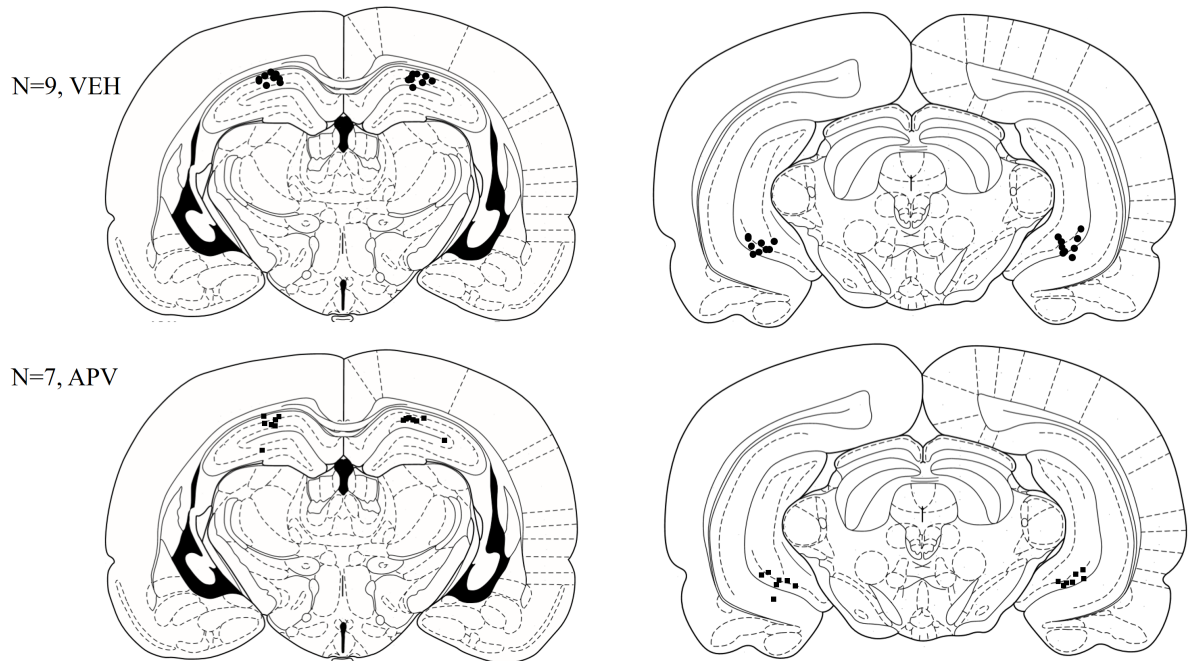


Figure 2B



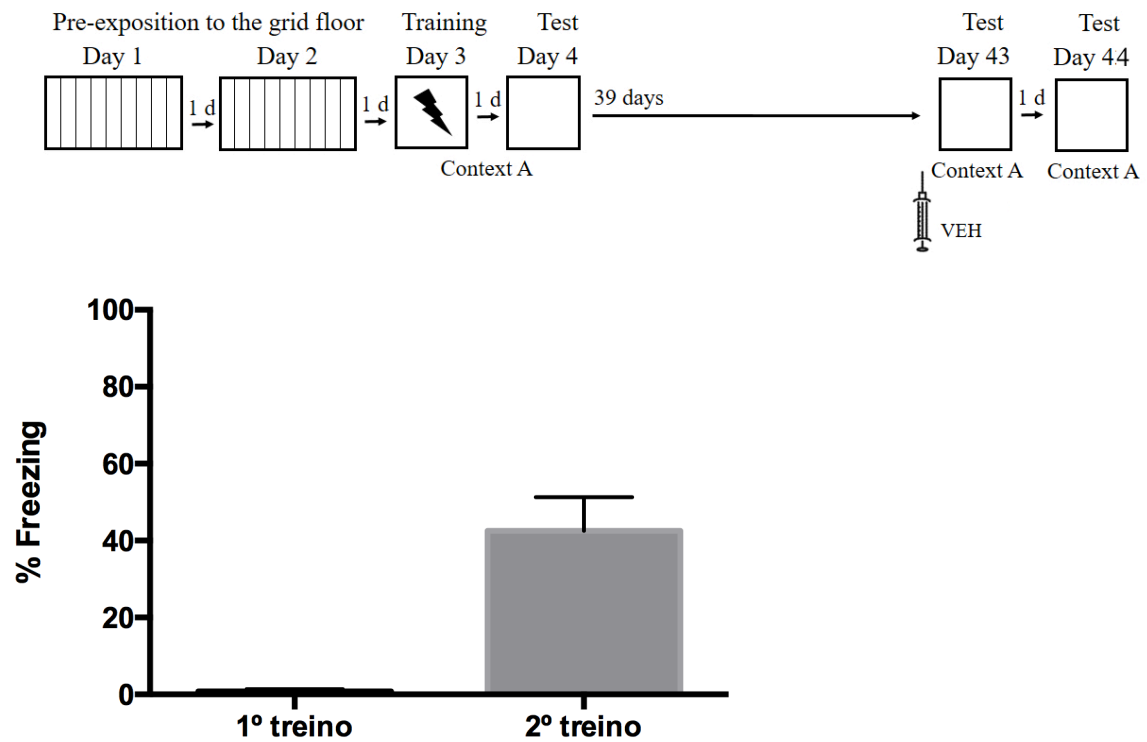


Figura X – Freezing basal é aumentado entre o primeiro e o segundo treino quando o intervalo é de 40 dias, o que indica generalização da memória. Desenho experimental representado acima do gráfico. Ratos foram pré-expostos a grade (dia 1 e dia 2) por 10 minutos, treinados no condicionamento aversivo ao contexto (dia 3) e testado no mesmo contexto no dia seguinte (dia 4). Quarenta dias após o treino 1, os animais foram treinados no contexto B (dia 43), sendo testados no mesmo contexto um dia depois (dia 44). Somente o grupo que recebeu veículo antes do segundo treino (N = 9) está representado no gráfico. Foram usados os 3 minutos basais de cada treino, antes dos animais receberem o choque. Animais apresentaram níveis de freezing basal mais elevado no segundo treino do que no primeiro. Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante as sessões de treino (3 minutos) e é expresso com media ± S.E.M.

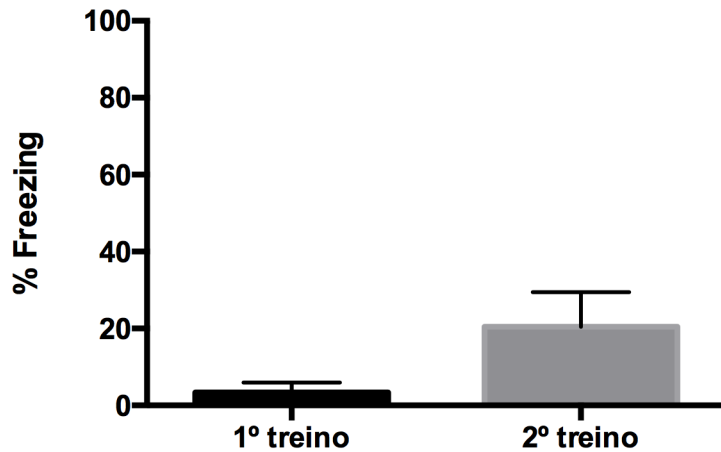
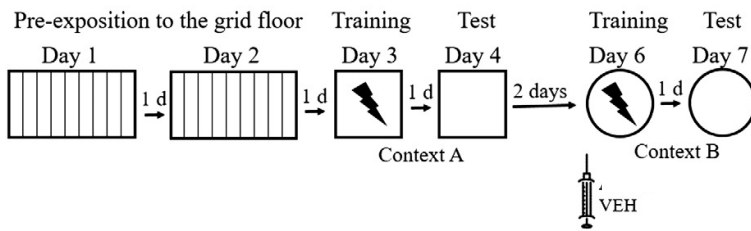


Figura XI – Freezing basal não é modificado entre o primeiro e o segundo treino quando o intervalo é de 3 dias. Desenho experimental representado acima do gráfico. Ratos foram pré-expostos a grade (dia 1 e dia 2) por 10 minutos, treinados no condicionamento aversivo ao contexto (dia 3) e testado no mesmo contexto no dia seguinte (dia 4). Três dias após o treino 1, os animais foram treinados no contexto B (dia 6), sendo testados no mesmo contexto um dia depois (dia 7). Somente grupo que recebeu veículo antes do segundo treino está representado no gráfico (N = 8). Animais apresentaram níveis de freezing basal semelhantes entre o primeiro e o segundo treino. Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante as sessões de treino (3 minutos) e é expresso com média ± S.E.M.

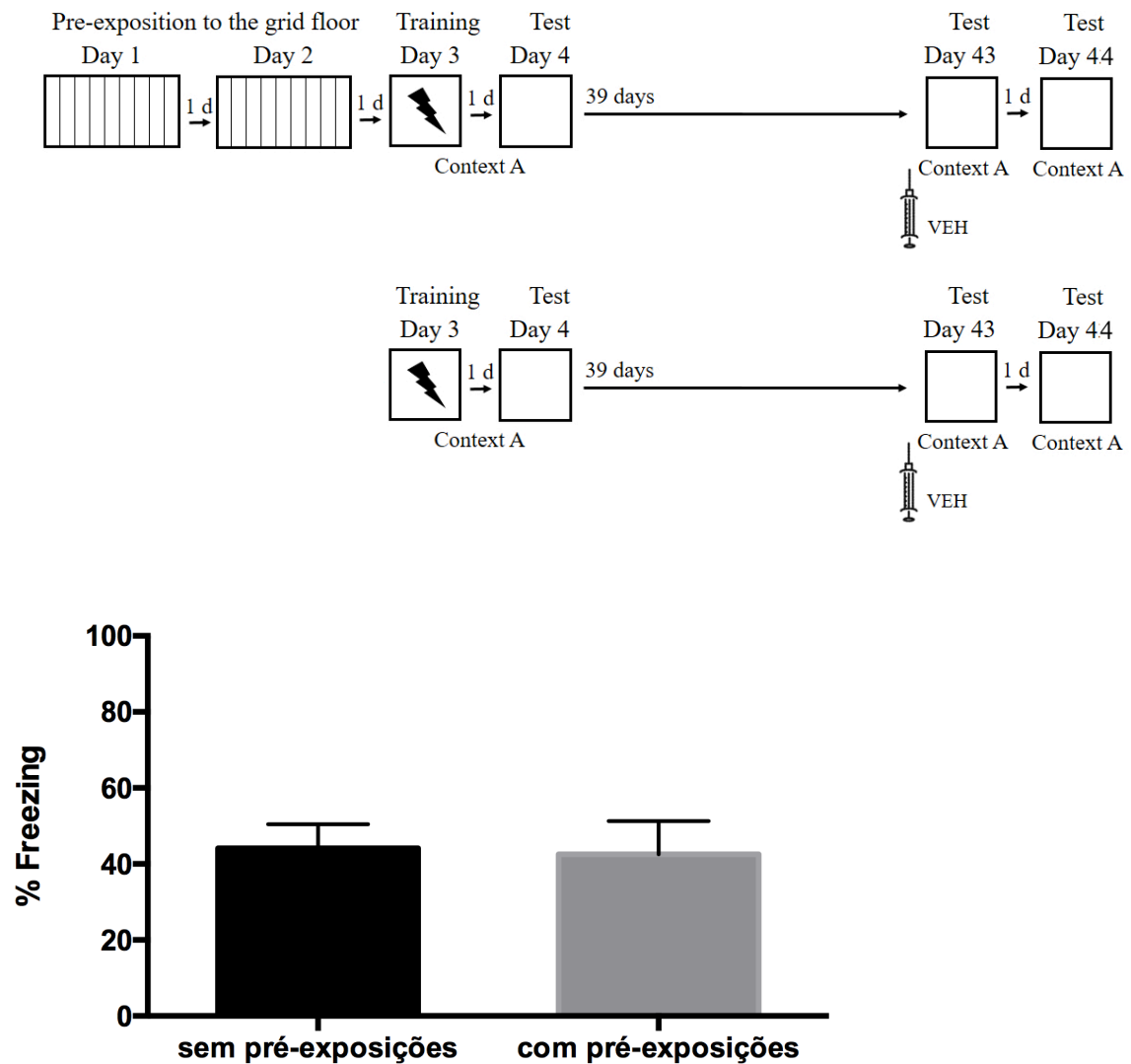


Figura XII – Pré-exposições não foram suficientes para reduzir o freezing basal no contexto B. Desenho experimental representado acima do gráfico. Um grupo de animais foi pré-exposto a grade (dia 1 e dia 2) por 10 minutos, treinados no condicionamento aversivo ao contexto (dia 3) e testado no mesmo contexto no dia seguinte (dia 4); 40 dias após o treino 1, os animais foram treinados no contexto B (dia 43), sendo testados no mesmo contexto um dia depois (dia 44). O outro grupo passou pelo mesmo protocolo, com exceção das pré-exposições (N = 9). As pré-exposições não reduziram o freezing basal no segundo treino, o que indica generalização da memória.

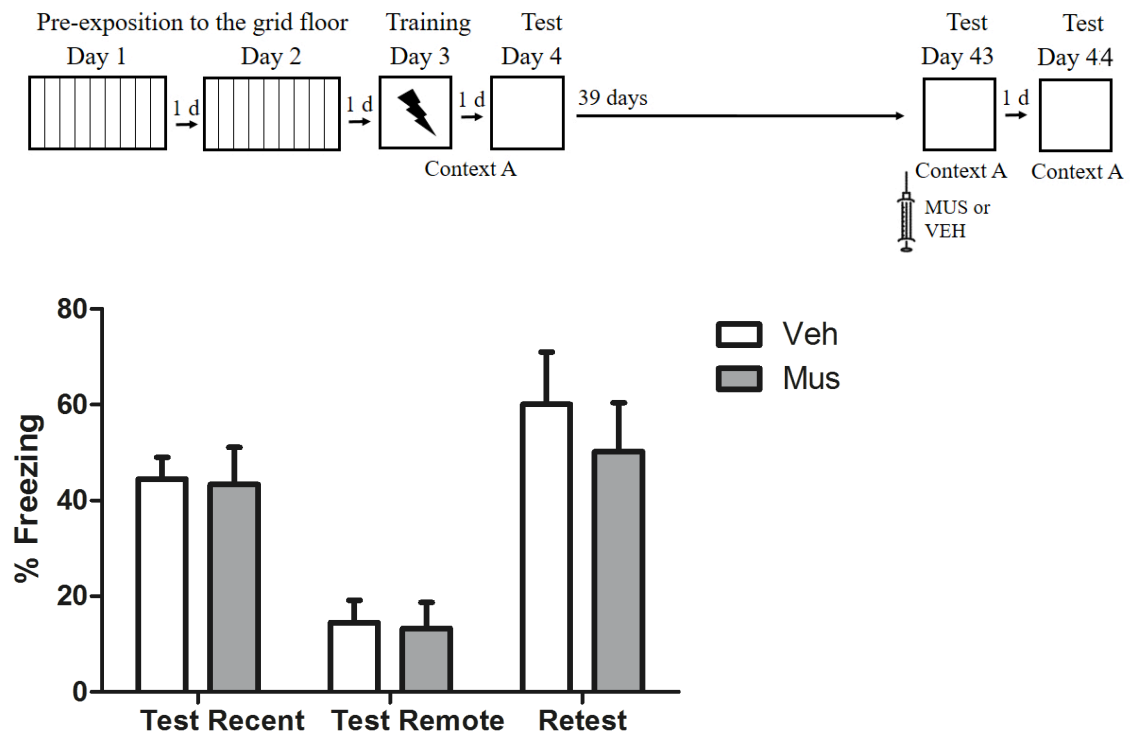


Figura XIII – Reteste 24 horas após o teste de memória remota no contexto A. Desenho experimental representado acima do gráfico. Ratos foram pré-expostos a grade (dia 1 e dia 2) por 10 minutos, treinados no condicionamento aversivo ao contexto (dia 3), testado no mesmo contexto no dia seguinte (dia 4), no dia 43 (sob efeito do fármaco) e no dia 44 (sem fármaco). Foi infundido veículo (N = 7) ou muscimol (agonista GABA_A; N = 7) bilateralmente no dHPC + vHPC 15 minutos antes do teste do dia 43. A memória de medo (% freezing) foi acessada 24 horas em todas as sessões de teste. Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante a sessão de teste e é expresso com média ± S.E.M.

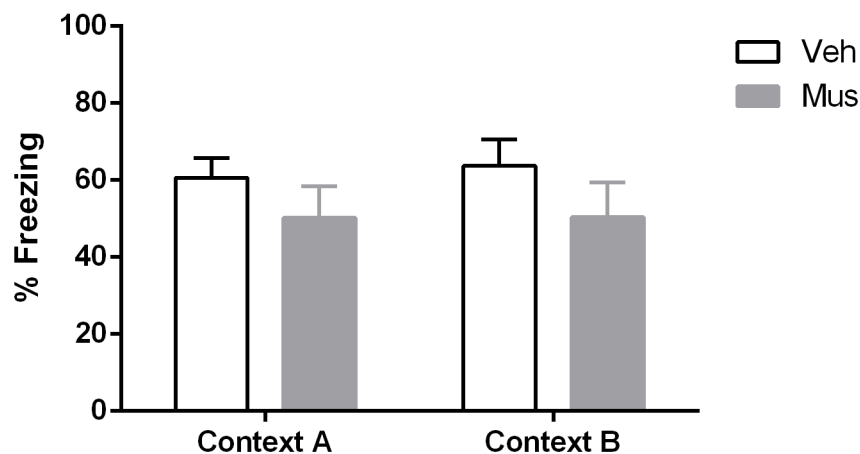
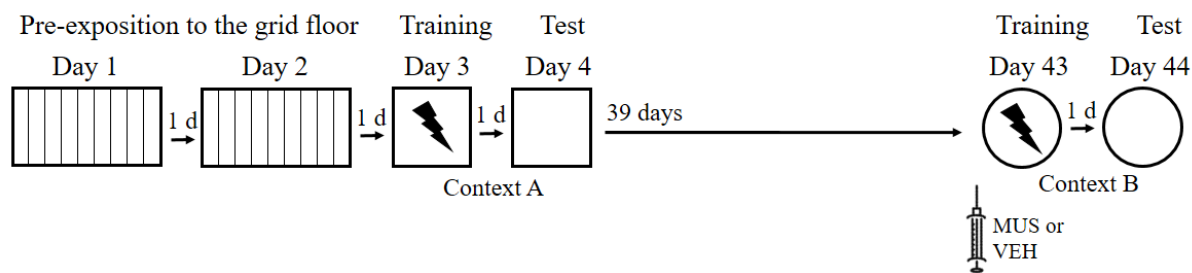


Figura XIV – Inibição concomitante do córtex cingulado anterior e do hipocampo dorsal não prejudicam a formação do aprendizado subsequente a uma memória remota. Desenho experimental representado acima do gráfico. Ratos foram pré-expostos a grade (dia 1 e dia 2) por 10 minutos, treinados no condicionamento aversivo ao contexto (dia 3) e testado no mesmo contexto no dia seguinte. O treino no contexto B foi realizado 40 dias após o treino no contexto A. Foi infundido veículo (N = 6) ou muscimol (agonista GABAa; N = 10) bilateralmente no ACC + dHPC 15 minutos antes do treino. A memória de medo (% freezing) foi acessada 24 horas após as sessões de treino. Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante a sessão de teste e é expresso com $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$

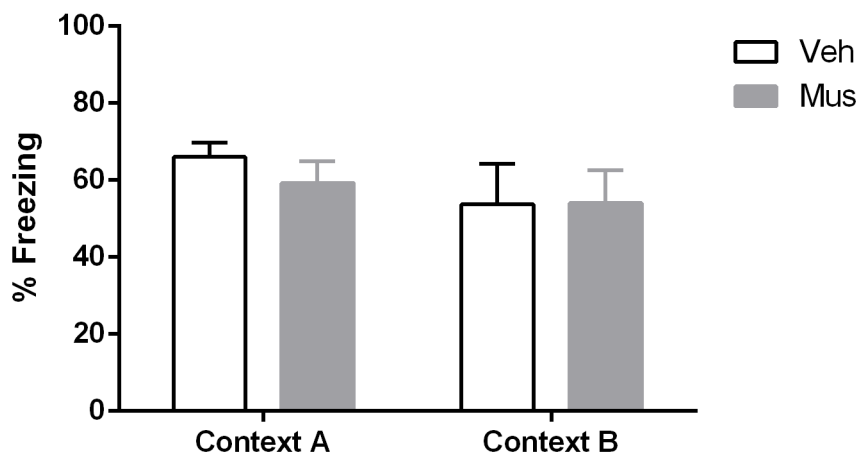
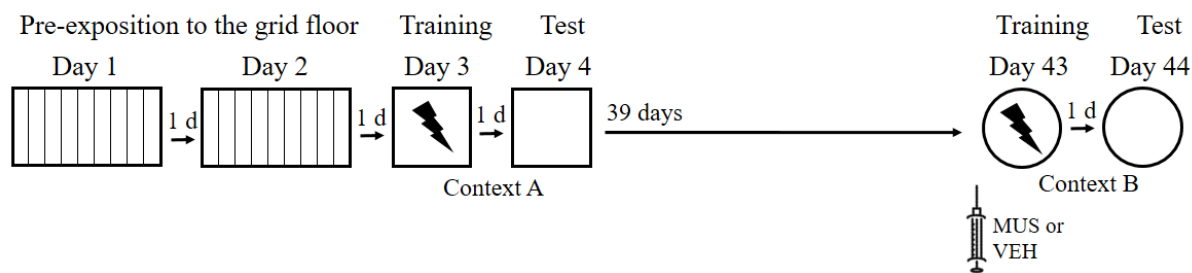


Figura XV – Inibição concomitante do córtex cingulado anterior e do hipocampo ventral não prejudicam a formação do aprendizado subsequente a uma memória remota. Desenho experimental representado acima do gráfico. Ratos foram pré-expostos a grade (dia 1 e dia 2) por 10 minutos, treinados no condicionamento aversivo ao contexto (dia 3) e testado no mesmo contexto no dia seguinte. O treino no contexto B foi realizado 40 dias após o treino no contexto A. Foi infundido veículo (N = 9) ou muscimol (agonista GABAa; N = 10) bilateralmente no ACC + vHPC 15 minutos antes do treino. A memória de medo (% freezing) foi acessada 24 horas após as sessões de treino. Gráfico representa a porcentagem de *freezing* durante a sessão de teste e é expresso com $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$

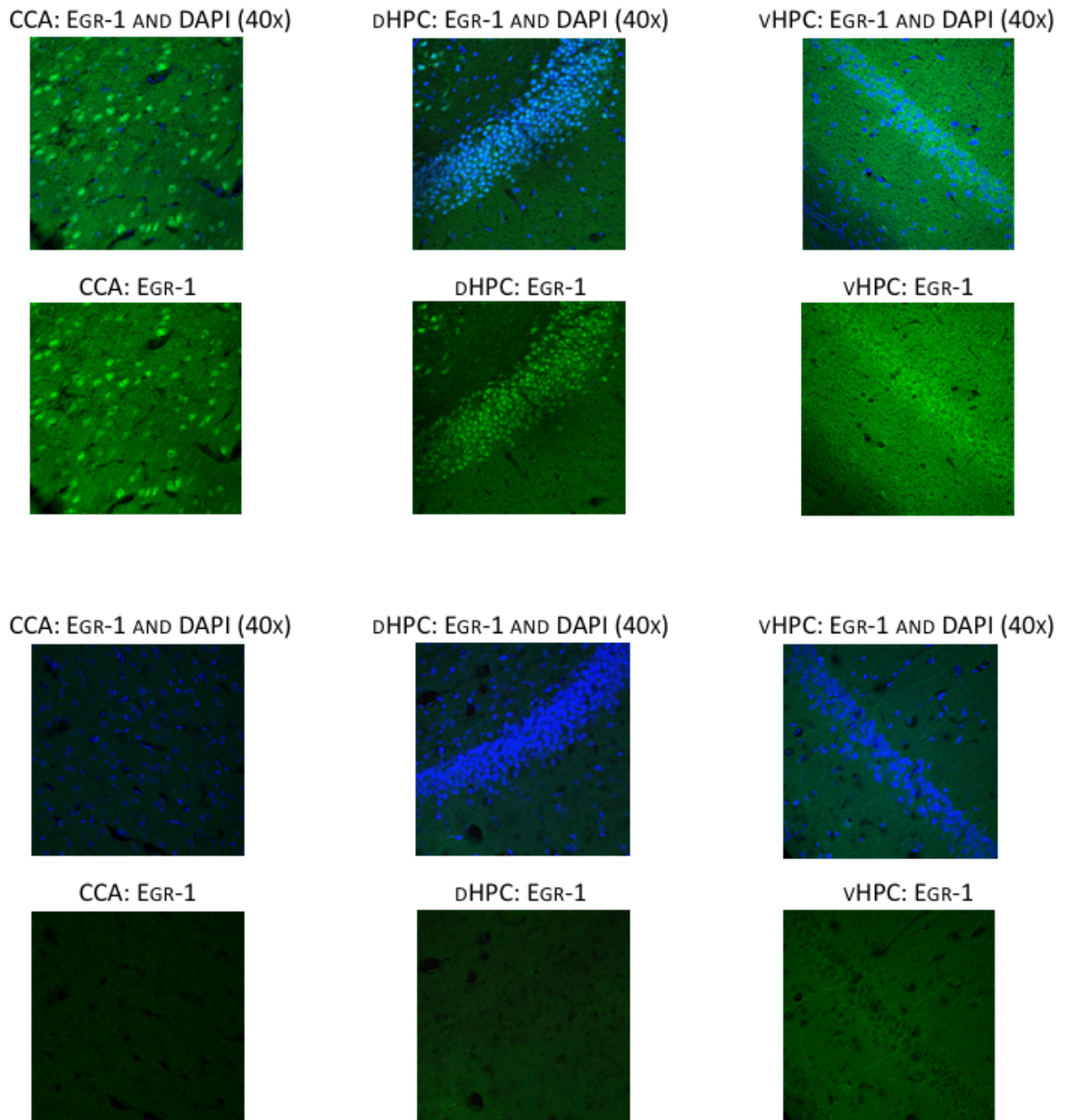


Figura XVI – Imunofluorescência para marcação da proteína Egr-1 com contra-coloração por DAPI. Imagens representativas da marcação de Egr-1 (verde) e DAPI (azul) nas regiões do córtex cingulado anterior (esquerda), hipocampo dorsal (central) e hipocampo ventral (direita). Na primeira linha estão representadas imagens com marcação de Egr-1 + DAPI e na segunda apenas Egr-1. Na terceira (com DAPI) e na quarta linhas estão os controles negativos, onde as fatias não foram incubadas com o anticorpo primário para Egr-1. Animais passaram por duas pré-exposições (dia 1 e 2), foram treinados e testados no contexto A (dia 3 e 4) e treinados no contexto B, 40 dias após treino no contexto A. Foram perfundidos 90 minutos após último treino para posterior realização da imunofluorescência.

PRE-EXPOSITION TO THE GRID



CONTEXT A



CONTEXT B



Figura XVII – Fotografias dos contextos utilizados no capítulo II. Contexto pré-exposição à esquerda, contexto A no centro e contexto B à direita.