

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Fernanda Nogueira Lotz Alves

**DURAÇÃO DA JANELA DE CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA E DINÂMICA DE
GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS: PARTICIPAÇÃO DO
HIPOCAMPO DORSAL E CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL**

Porto Alegre

2020

Fernanda Nogueira Lotz Alves

**DURAÇÃO DA JANELA DE CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA E DINÂMICA DE
GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS: PARTICIPAÇÃO DO
HIPOCAMPO DORSAL E CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Porto Alegre

2020

Dedico este trabalho a todos que o tornaram possível

Agradecimentos

Esse período do mestrado foi como um trabalho de construção. Cada tijolo colocado para erguer esse edifício me levou mais perto de visualizar o trabalho completo. Mas uma casa não se constrói sozinha, e sem o apoio e colaborações este projeto com certeza seria muito mais difícil de concluir. Consegui porque não estava sozinha nessa jornada.

Começando pelos pilares, gostaria de agradecer à minha **família**, em especial à minha **mãe** pelo apoio incondicional não só nesses dois anos de mestrado, mas durante a vida toda. Não existe combinação bonita de palavras que traduziria tamanha amor e gratidão que sinto por vocês. Ao professor **Jorge Quillfeldt**, que me orientou na graduação e no mestrado, por ter me acolhido no Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação onde a curiosidade pela neurociência se tornou um fascínio. Você é um exemplo de professor, cientista e divulgador da ciência com quem aprendi muitas lições a serem levadas para a vida toda. Obrigada por terem acreditado em mim.

Não menos importantes, à **Mirelle Casagrande**, **Kétlyn Guerra** e **Rafaela Gaiga** que estiveram lá juntos comigo com a mão na massa, operando, infundindo e me ajudando nos experimentos. Vocês viabilizaram a realização deste trabalho. Ao **Bruno Popik** e à **Krislei Scienza** pelos comentários úteis sobre este projeto. Aos **colegas do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação e Laboratório de Neurobiologia da Memória**, do passado e presente, pela amizade e lembranças boas. À **Tina** pelos cuidados com os animais.

Gostaria de agradecer também à relatora e aos membros da banca, **Dra. Denise Zancan**, **Dr. Alberto Rasia**, e **Dr. Leandro Bertoglio** por melhorarem a qualidade dessa dissertação.

À agência de fomento **CAPES** pela bolsa.

E claro, aos **ratos de laboratório** que foram instrumentais para que este trabalho fosse realizado e, quem sabe, colocaremos um tijolo na construção da ciência.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução	10
1.1 Definição da memória	11
1.2 Memória ou memórias? Classificando as fases e os tipos.....	12
1.2.1 Fases da memória.....	12
1.2.2 Classificação quanto ao tempo de duração.....	13
1.2.3 Classificação quanto ao conteúdo	14
1.3 Consolidação da memória.....	15
1.3.1 Consolidação sináptica: rápida e ao nível celular	16
1.3.2 Consolidação sistêmica: prolongada e ao nível de sistemas.....	17
1.3.2.1 O engrama dinâmico: lançando luz sobre os caminhos da consolidação sistêmica.....	17
1.4 O tempo como elemento de transformação	21
1.4.1 Do valor adaptativo da generalização ao mal-adaptativo	21
1.4.2 A generalização e consolidação sistêmica como dois lados de uma mesma moeda	22
1.4.3 Mecanismos por trás da perda de precisão	23
1.5 O córtex entorrinal: Interface entre o hipocampo e o neocórtex	26
1.5.1 Divisão anatômica e conexões com outras estruturas.....	27
1.5.2 O córtex entorrinal lateral na consolidação sistêmica e generalização de memórias episódicas	29
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo geral.....	33

2.2 Objetivos específicos	33
3. Material e métodos	35
3.1 Animais	35
3.2 Aparatos	35
3.3 Procedimentos Experimentais.....	36
3.3.1 Condicionamento aversivo ao contexto (CAC)	36
3.3.2 Sessões de teste	36
3.3.2.1 Consolidação sistêmica	36
3.3.2.2 Precisão da memória	37
3.3.3 Cirurgia estereotáxica, canulação e cuidados pós-operatórios.....	37
3.3.4. Drogas e infusão.....	37
3.3.5 Histologia	38
3.4.6 Análises estatísticas	38
4. Resultados	39
4.1 Experimento piloto	39
4.2 Consolidação sistêmica.....	41
4.2.1 Participação do hipocampo dorsal na evocação da memória 2 e 28 dias após o treino	41
4.2.2 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória 2 e 28 dias após o treino	43
4.2.3 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória remota 45 dias após o treino	45
4.3 Generalização da memória	47
4.3.1 Participação do hipocampo dorsal na evocação da memória no contexto alternativo B	47
4.3.2 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória no contexto alternativo B	49

4.3.3 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória no contexto alternativo C	51
5. Discussão geral.....	53
6. Conclusões.....	58
7. Perspectivas imediatas e de longo prazo	59
8. Referências bibliográficas	60
9. Apêndice	68
9.1 Gráficos dos retestes	68
9.2 Esquemas representativos das histologias	73

Lista de Abreviaturas

ACC – Córtex Cingulado Anterior

AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

AMPA – Receptor AMPA

CA1 – Corno de Ammon 1

CAC – Condicionamento Aversivo ao Contexto

CAMKII – Proteína Cinase dependente de Cálcio e Calmodulina II

DG – Giro Denteado

dHPC – Hipocampo dorsal

EC – Córtex Entorrinal

GABA – Ácido γ -Aminobutírico

HPC – Hipocampo

LEC – Córtex Entorrinal Lateral

mPFC – Córtex Pré-frontal Medial

PBS – Tampão Fosfato Salino

PKA – Proteína Cinase A

PKC – Proteína Cinase C

TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

Lista de Figuras

Figura 1. As fases da memória.....	12
Figura 2. Classificação das memórias de longo prazo de acordo com o seu conteúdo	15
Figura 3. Esquema representando a Teoria Standard da consolidação sistêmica	18
Figura 4. Esquema representando a Teoria dos Múltiplos Traços	19
Figura 5. Esquema representando a Teoria da Transformação dos Traços ...	20
Figura 6. Diagrama esquemático simplificado das principais projeções do lobo temporal medial com os córtices de associação	27
Figura 7. Representação esquemática das principais vias anatômicas da formação hipocampal e lobo temporal medial do rato	28
Figura 8. Resumo das principais aferências e eferências do córtex entorrinal, nas suas divisões de área lateral e medial	29
Figura 9. Esquema representando o EC como estação de relé entre o HPC e o ACC.....	31
Figura 10. Comparação entre os três contextos para verificar o grau de generalização.....	39
Figura 11. Comparativo entre os grupos PBS (LEC) nos três contextos aos 28 dias.....	40
Figura 12. O hipocampo pode estar participando da evocação da memória 2, mas não 28 dias após o treino no contexto original	44
Figura 13. O LEC participa da evocação da memória aos 2 e 28 dias após o treino no contexto original	46
Figura 14. O LEC não participa mais da evocação de uma memória contextual remota (45 dias)	44
Figura 15. Muscimol não teve efeito aos 28 dias, quando testados em um contexto similar ao do treino (Contexto B)	48

Figura 16. A inibição do LEC 28 dias após o treino em um contexto similar (Contexto B) resultou no prejuízo da memória de medo generalizada.....	50
Figura 17. Muscimol não teve efeito aos 2 ou 28 dias, quando testados em um contexto diferente do treino (Contexto C).....	52
Figura 18. Sensações de familiaridade são atribuídas aos córtices rinais enquanto as de lembrança ao hipocampo	56
Figura 1 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 2 dias após o treino no Contexto A.....	68
Figura 2 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 28 dias após o treino no Contexto A.....	68
Figura 3 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no LEC 2 dias após o treino no Contexto A.....	69
Figura 4 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no LEC 28 dias após o treino no Contexto A.....	69
Figura 5 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no LEC 45 dias após o treino no Contexto A.....	69
Figura 6 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 2 dias após o treino no Contexto B.....	70
Figura 7 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 28 dias após o treino no Contexto B.....	70
Figura 8 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no LEC 2 dias após o treino no Contexto B.....	71
Figura 9 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no LEC 28 dias após o treino no Contexto B.....	71
Figura 10 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no LEC 2 dias após o treino no Contexto C	72
Figura 11 (Apêndice). Infusão de PBS ou muscimol no LEC 28 dias após o treino no Contexto C	72
Figura 14 (Apêndice). Esquema representativo do local de infusão de PBS ou muscimol no LEC	73
Figura 15 (Apêndice). Esquema representativo do local de infusão de PBS ou muscimol no dHPC.....	73

Resumo

A consolidação sistêmica é um processo dinâmico e dependente de tempo em que memórias contextuais se tornam independentes do hipocampo e dependentes de estruturas corticais para a evocação. Em paralelo, ocorre a perda de precisão, que é quando os animais não conseguem mais distinguir entre o contexto em que foram treinados e um contexto novo, com dicas similares. Ou seja, a memória se torna generalizada. Anatomicamente, o córtex entorrinal faz conexões com o hipocampo e várias estruturas corticais, muitas das quais participam de processos mnemônicos, sendo assim uma importante interface entre essas áreas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a janela de duração da consolidação sistêmica e generalização de uma memória contextual de medo, visando o papel do hipocampo dorsal (dHPC) e córtex entorrinal lateral (LEC). Animais foram treinados em um contexto (A) e testados no mesmo contexto 2, 28 ou, no caso do LEC, 45 dias após para verificar se a consolidação sistêmica tinha ocorrido. Nossos resultados indicam que ocorre a consolidação sistêmica da memória contextual aversiva antes dos 28 dias para o HPC e entre 28 e 45 dias para o LEC. Em outro grupo de experimentos, ratos foram também treinados no contexto A e testados 2 ou 28 dias após no contexto alternativo B ou C. De forma geral, nossos resultados obtidos com o dHPC são congruentes com a literatura. Quanto ao LEC, aos 28 dias a infusão do agonista GABA_A muscimol inibiu a expressão da memória generalizada quando testados no contexto B mas não no C. Mais estudos são necessários para elucidar esses resultados.

Abstract

Systems consolidation is a dynamic and time-dependent process in which contextual memories become independent of the hippocampus and dependent on cortical structures for their retrieval. In parallel, loss of precision occurs, which is when animals can no longer distinguish between the context where they were trained and a novel one, with similar cues. That is, the memory becomes generalised. Anatomically, the entorhinal cortex forms connections with the hippocampus and several cortical structures, many of which participate in mnemonic processes, and is therefore an important interface between these areas. The aim of this work was to characterize the role of the lateral entorhinal cortex (LEC) and dorsal hippocampus (dHPC) in the duration window of systems consolidation and generalisation of a contextual fear memory. Animals were trained in one context (A) and tested in the same context 2, 28 or, in the case of LEC, 45 days later to verify for systems consolidation. Our results indicate that systems consolidation of an aversive contextual memory occurs before 28 days for HPC and between 28 and 45 days for LEC. In another set of experiments, rats were also trained in context A and tested 2 or 28 days later in an alternative context B or C. In a general sense, our results for dHPC are in accordance with the literature. As for LEC, at 28 days, infusion of the GABA_A agonist muscimol inhibited the expression of a generalized memory when tested in context B but not in C. Further studies are needed to elucidate these results.

1. Introdução

“Viver às avessas!” Alice repetiu em grande assombro. “Nunca ouvi falar de tal coisa!”

“Mas há uma grande vantagem nisso: a nossa memória funciona nos dois sentidos.”

“Tenho certeza que a minha só funciona em um”, Alice observou. “Não posso lembrar coisas antes que elas aconteçam.”

“Pobre memória, que só anda de marcha a-ré”, a Rainha observou.

“De que tipo de coisas VOCÊ se lembra melhor?” Alice se atreveu a perguntar.

“Oh, das que aconteceram daqui duas semanas”, a Rainha respondeu num tom displicente.

À primeira vista a observação da Rainha Branca, personagem do livro *Alice Através do Espelho*, de Lewis Carroll (1871, capítulo 5), sobre a memória pode parecer absurda, mas por trás dessa ideia desconcertante existem pelo menos três verdades fundamentais acerca da sua natureza. Primeiro, entre o momento de aprendizagem e o futuro existe um período de amadurecimento do traço de memória que possibilita que este seja armazenado e evocado em longo prazo. Segundo, experiências vividas transformam-se qualitativamente com o passar do tempo, o que faz da memória uma das mais vantajosas ferramentas cognitivas, capaz de antecipar e lidar com um futuro incerto. Por último, o tempo é uma variável importante para que esse armazenamento e essas mudanças qualitativas aconteçam.

A personagem da Rainha com a sua memória excêntrica em que o passado e futuro se mesclam foi de fato presciente com sua afirmação. Quase 150 anos após o Carroll ter escrito a obra, vários neurocientistas têm refletido sobre essas e outras questões (Suddendorf & Corballis, 2007; Dudai, 2009; Mullally & Maguire, 2014), e vários estudos surgiram lançando luz sobre os mecanismos neurobiológicos que se dão em certos processos de memória tanto a curto como a longo prazo (Frankland & Bontempi, 2005; McGaugh, 2000; Dudai, 2004; Kandel, 2013).

A memória foi, é e será um assunto de curiosidade para muitos, mas afinal, o que é memória e o que acontece com ela com o passar do tempo?

1.1 Definição da memória

Em geral, temos uma noção intuitiva de que é memória, mas realmente defini-la talvez não seja algo trivial. O pai da psicologia, William James, escreveu em 1890 que, “só se pode provar que houve retenção quando a evocação ocorre”. Mais de 100 anos após, essa observação ainda é válida mesmo com tudo que a neurociência da memória e aprendizagem avançou nesse tempo todo, principalmente em testes experimentais em que é feita uma avaliação se um animal ou pessoa lembra de uma informação previamente adquirida (Quillfeldt, 2006).

Outro psicólogo, Robert Sternberg, definiu a memória como meio pelo qual um animal recorre às suas experiências passadas a fim de usar essas informações no presente (Sternberg, 2000). Ou seja, a memória tem um grande valor adaptativo e é a previsão precisa do futuro, mais do que a memória precisa do passado em si, que transmite vantagem adaptativa (Suddendorf, 2006). Animais como roedores e seres humanos são ótimos reconhecedores de padrões e estão sempre traçando associações entre aprendizados passados para se comportarem de maneira mais adequada em um determinado contexto no momento presente, o que lhes conferem uma vantagem num ambiente dinâmico e muitas vezes imprevisível.

Mais recentemente, um neurocientista e estudioso da memória, Iván Izquierdo definiu esse processo mnemônico como a “aquisição, formação, conservação e evocação de informações” (Izquierdo, 2011). Essas informações são adquiridas através dos sentidos e armazenadas ou consolidadas no encéfalo, podendo ser evocadas posteriormente. Ao serem evocadas, podem se tornar lábeis e serem reconsolidadas ou extintas. Essa definição nos aproxima da ideia de que a memória não é um processo unitário, mas que ocorre em fases.

1.2 Memória ou memórias? Classificando as fases e os tipos

As experiências registradas no encéfalo podem ser didaticamente classificadas em diferentes fases do processo mnemônico (Fig. 1) e ainda em diferentes tipos de acordo com o tempo de duração e com base no conteúdo.

1.2.1 Fases da memória

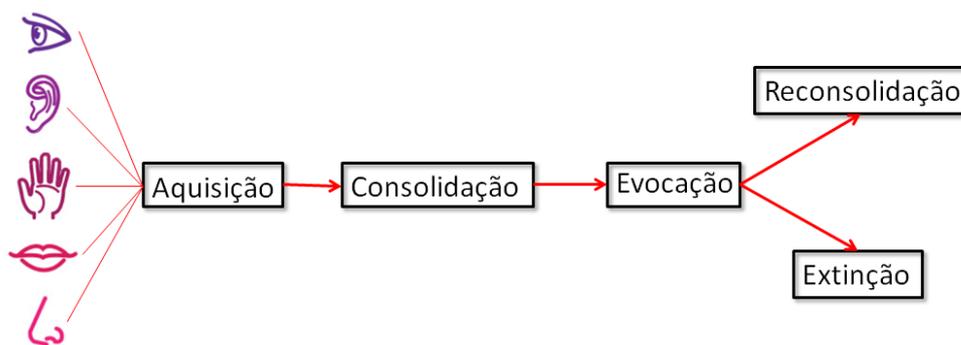


Figura 1. As fases da memória.

A primeira fase refere-se à aquisição de novas informações através dos sentidos. Estímulos externos chegam ao encéfalo e lá são codificados e armazenados, ou seja, consolidados. A consolidação sináptica é um fenômeno gradativo e dependente de tempo. Ocorre num período de algumas horas após a aquisição e é quando o traço (engrama) lábil/instável e suscetível a modificações ou interferências é estabilizado (McGaugh, 2000). Um processo relacionado ocorre numa escala de tempo maior, de dias até anos, conhecido como consolidação sistêmica (melhor descrita na seção “Consolidação da memória”). Posteriormente, memórias consolidadas podem ser evocadas. A evocação é um processo ativo e faz com que um traço mnemônico se torne novamente lábil e suscetível a interferências, sendo novamente necessário um processo de estabilização com síntese proteica *de novo*, a reconsolidação (Nader et al., 2000a; Suzuki et al, 2004), ou ocorre a aquisição de um novo traço que se sobrepõe a uma outra, temporariamente inibindo a sua expressão e ocasionando a extinção da resposta comportamental (Suzuki et al., 2004; Monfils et al., 2009). Em suma, a reconsolidação incorpora novas informações e atualiza

o traço da memória enquanto a extinção é a sobreposição de uma nova memória, mais fraca, sobre aquela que foi previamente aprendida.

1.2.2 Classificação quanto ao tempo de duração

O amante de cinema, curioso em termos neurocientíficos, sabe que assistir um filme é uma atividade que requer vários tipos de memória agindo em conjunto ou em sequência para construir uma representação mental duradoura da experiência.

Informações são captadas pelos receptores sensoriais e processadas pelo sistema nervoso central. A memória sensorial, embora seja um processo autônomo (sem controle consciente) e não é consolidada no encéfalo, permite que a sequência de fotografias apresentadas rapidamente na tela e sons associados às imagens dão ideias fluidas de movimento e continuidade. Esses registros são ultrarrápidos, não passando de alguns milissegundos para os visuais e poucos segundos para as auditivas, antes de decaírem (Öğmen & Herzog, 2016; Thaut, 2014).

Um segundo tipo de memória, embora tenha uma função bem diferente, similarmente persiste por pouco tempo (alguns segundos a minutos) e decai sem ser consolidada (Polti et al., 2018). Conhecida como a memória de trabalho ou memória operacional, esse tipo permite que informações recebidas são temporariamente manipuladas mentalmente e processadas principalmente no córtex pré-frontal e parietal (Ester et al., 2015). Neste exemplo da experiência no cinema, permite que se entende uma frase falada por um personagem ao manter cada palavra nessa memória de curtíssimo prazo o tempo suficiente para que um sentido geral seja extraído. Após isso, a exata segunda palavra da frase, por exemplo, poderá ser esquecida, enquanto o sentido geral do que foi falado perdura por mais tempo para ser inserido num contexto maior de lembranças.

Informações adquiridas que o encéfalo julga ser importantes são consolidadas na memória de curto e longo prazo, com a de curto podendo perdurar de minutos a horas enquanto a de longa persiste de dias a vida toda. Por exemplo, uma cena de um filme que chama a atenção ou que causa uma

reação emocional pode perdurar na memória por mais tempo comparados a uma cena neutra, sem esses moduladores (McGaugh, 2000).

Embora antigamente se acreditava que a memória de longo prazo necessariamente fosse expressa como de curto prazo (Hebb, 1949; Wickelgren & Berian, 1971; Dudai, 2009), existem alguns estudos que mostram que esses dois tipos são processos independentes com perfis bioquímicos e moleculares diferentes (Izquierdo et al., 1999; Medina et al., 1999; Vianna et al., 2000; Izquierdo et al., 2002). Isto é, memórias de curto prazo não necessariamente serão consolidadas em memórias de longo prazo e nem toda memória de longo será expressa como uma memória de curto prazo.

1.2.3 Classificação quanto ao conteúdo

Quanto ao conteúdo, as memórias de longo prazo podem ser divididas em dois grupos, as declarativas ou explícitas e as não declarativas ou implícitas (Fig. 2). No primeiro grupo, são memórias conscientes, de fácil esquecimento, que podem ser declaradas, enquanto no segundo grupo são aquelas cujo conteúdo é inconsciente, mais difíceis de esquecer, e são essencialmente não declaráveis. Por exemplo, seria a diferença entre uma criança ditar quais são os passos para aprender a andar de bicicleta e ela adquirir a memória muscular ao tentar até conseguir.

Mas toda memória explícita é realmente declarável? Como a comunicação dos seres humanos difere do resto dos animais pelo uso da linguagem, as pessoas têm a capacidade adicional de declarar o que lembram enquanto outros animais expressam esse mesmo tipo de memória através de respostas comportamentais e fisiológicas a um estímulo. Principalmente por esta razão, serão utilizados os termos 'explícita' e 'implícita' nas seções seguintes para incluir os modelos animais, embora os termos 'declarativa' e 'explícita' ou 'não declarativa' e 'implícita' sejam intercambiáveis.

As memórias explícitas podem ser episódicas ou semânticas (Fig. 2). Lembrar com quem foi ver o filme 'Brilho eterno de uma mente sem lembranças' no cinema é uma memória episódica, um registro de uma experiência de um

evento que vivenciou pessoalmente, enquanto que saber que o Jim Carrey e a Kate Winslet são os atores principais nesse filme é lembrar de um fato, isto é, recordar uma memória semântica.

As memórias implícitas se dividem em vários subtipos, como a de procedimentos, que são as habilidades principalmente motoras, e hábitos. Também são incluídos nesse grupo as memórias de condicionamento clássico simples, o *priming* e memórias não associativas como as vias de reflexo (Squire & Zola, 1996).

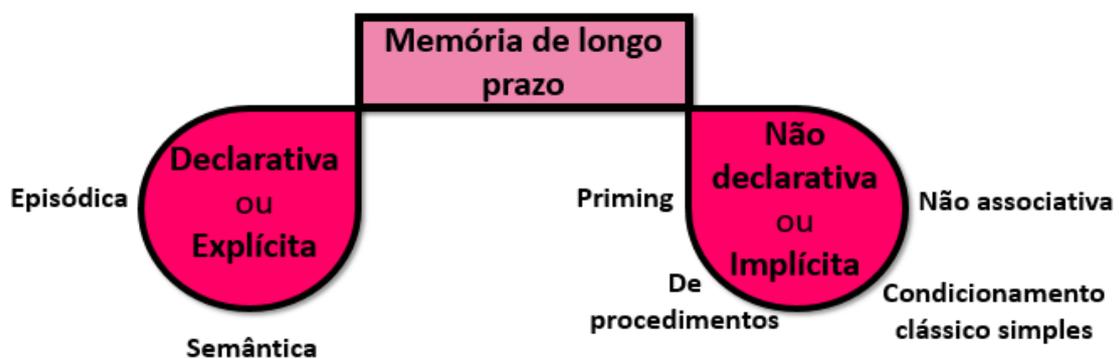


Figura 2. Classificação das memórias de longo prazo de acordo com o seu conteúdo.

1.3 Consolidação da memória

A noção de que o traço da memória leva um período para amadurecer precede a ciência. Filósofos gregos como o Aristóteles e oradores romanos como o Quintiliano e Cícero escreveram extensivamente sobre várias facetas da memória, ideias que mais tarde foram mais elaboradas por filósofos medievais (Dudai, 2004; Yates, 2011).

Ao final do século XIX, o psicólogo francês Théodule Ribot, em seu trabalho com pacientes com amnésia retrógrada, observou que há um gradiente temporal para as memórias, sendo que as mais antigas são menos propensas a interferências (Ribot, 1882), hipótese que mais tarde ficou conhecida como a Lei de Ribot. Alguns anos após, dois pesquisadores alemães Müller e Pilzecker

cunharam o termo *Konsolidierung* para descrever um processo dependente de tempo, em que memórias não são instantâneas nem permanentes (Lechner et al., 1999) mas são estabilizadas após a aquisição para depois poderem ser acessadas (McGaugh, 2000). Foi somente quase 50 anos mais tarde com os experimentos de Duncan (1949), usando um modelo animal, que o conceito de consolidação ganharia força com o posterior surgimento de vários estudos elucidando os mecanismos e fatores celulares da consolidação sináptica (Flexner et al., 1965; McGaugh, 1966; Kandel et al., 2014).

1.3.1 Consolidação sináptica: rápida e ao nível celular

Essa primeira fase da consolidação refere-se à transformação de informação adquirida em sua forma duradoura. É dependente de síntese proteica e ocorre num espaço de tempo curto após a aquisição, geralmente até 6 horas, com essa duração sendo modulada por fatores como glicocorticoides (Casagrande et al., 2018).

Na consolidação sináptica, espinhos dendríticos crescem e mudam morfológicamente para acomodar a inserção de receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA na membrana pós-sináptica (Kandel et al., 2014). Esse último receptor permite o influxo de Ca^{2+} na célula que modula cascatas de sinalização intracelulares dependentes de cálcio, como as cinases PKA, PKC e CAMKII (Malenka & Bear, 2004; Huang et al., 2013; Lisman et al., 2012; Kandel et al., 2014) Essas cinases por sua vez podem agir sobre receptores, fosforilando e promovendo o aumento da densidade na membrana pós-sináptica (Johansen et al., 2011), ou sobre fatores de transcrição para induzir a síntese proteica que permitirá a formação e estabilização de um traço físico a partir da formação de novas conexões entre neurônios e a reestruturação de conexões já existentes (Dudai, 2004; Kandel et al., 2014). Este período de estabilização pode sofrer interferências. Inibindo a síntese proteica ou a ação de cinases após a aquisição prejudica a consolidação, impedindo então que as informações sejam armazenadas no encéfalo para posteriormente serem evocadas (Kukushkin & Carew, 2017).

Além da consolidação sináptica ocorre um processo relacionado, com a reorganização gradual do engajamento de diferentes estruturas para memórias episódicas pós-codificação, um processo conhecido como consolidação sistêmica. Foco deste trabalho, o conceito seria ele próprio “consolidado” e “reconsolidado” na neurociência da memória, com o surgimento de modelos teóricos cada vez mais abrangendo o acúmulo de evidências (McClelland et al, 1995; Nadel e Moscovitch, 1997; Squire, 2004; Winocur, 2010).

1.3.2 Consolidação sistêmica: prolongada e ao nível de sistemas

Existem na pesquisa acontecimentos que impulsionam a ciência de modo imprevisto. Provavelmente um dos mais importantes casos de serendipismo na neurociência da memória foi caso do paciente H.M. (Henry Molaison, 1926-2008), um cidadão norte-americano que sofria de crises epilépticas frequentes e resistentes a tratamentos farmacológicos. Ainda jovem, Henry Molaison foi submetido a uma cirurgia de remoção bilateral do lobo temporal medial para conter as crises. Testes neuropsicológicos posteriores à cirurgia constataram que Molaison perdera a capacidade de formar novas memórias declarativas embora tivesse sua personalidade, QI, a linguagem e outros tipos de memórias preservados, como a de trabalho e de procedimentos (Milner, 1962 apud. Josselyn et al., 2017). Além disso, Molaison teve amnésia retrógrada para memórias declarativas recentes enquanto ainda conseguia evocar memórias similares mais antigas, revelando que além da memória não ser um processo unitário, é dinâmica nas diferentes estruturas envolvidas na sua sustentação ao longo do tempo (Frankland & Bontempi, 2005).

1.3.2.1 O engrama dinâmico: lançando luz sobre os caminhos da consolidação sistêmica

Tomando em consideração o caso de pacientes como o Henry Molaison e inúmeros estudos com lesões (Kim & Fanselow, 1992), inibição farmacológica, genética (ver Frankland & Bontempi, 2005 para uma revisão que lista mais de 30

estudos), mapeamento metabólico (Bontempi et al., 1999) e mais recentemente optogenética (Goshen et al., 2011; Cowensage et al., 2014) em modelos animais, a importância do hipocampo para a formação de memórias espaciais e explícitas é um fato bem estabelecido (Dudai, 2015; Frankland & Bontempi, 2005, Squire, 2004). Por outro lado, a participação do neocórtex na evocação de memórias remotas também é bem descrita na literatura (Haubrich et al., 2016; Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004), mas seria este o repositório final e único do engrama? Qual seria o papel do hipocampo para memórias remotas? E de outras estruturas funcionalmente distintas?

O modelo teórico mais antigo, e provavelmente o mais simples, é a Teoria Standard (McClelland et al., 1995; Squire & Alvarez, 1995). Resumidamente, essa teoria propõe que todas as memórias de longo prazo recentes dependem do hipocampo para a sua evocação, mas com o passar do tempo o engrama no hipocampo decai e os processos mnemônicos passam a depender inteiramente do neocórtex (Fig. 3).

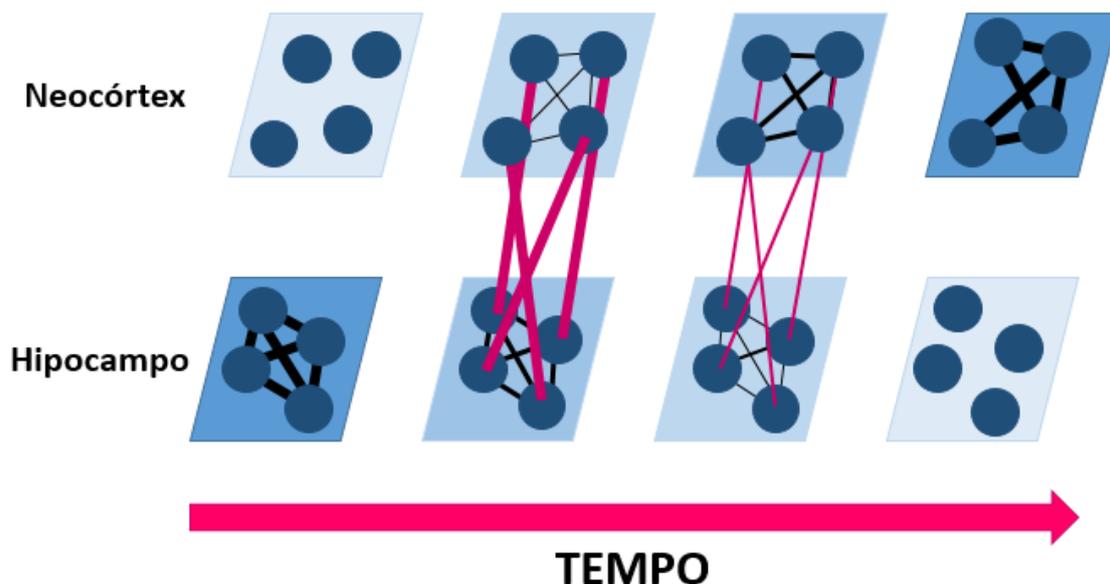


Figura 3. Esquema representando a Teoria Standard da consolidação sistêmica.

Porém, baseado em observações incompatíveis com esse modelo tanto em humanos quanto modelos animais, Nadel e Moscovitch (1997) propuseram um modelo alternativo, a Teoria dos Múltiplos Traços. Enquanto a Teoria Standard descreve um destino para todas as memórias explícitas, a dos Múltiplos Traços considera dinâmicas diferentes para memórias episódicas e semânticas, em que as episódicas remotas necessitam do hipocampo para a sua evocação (Quillfeldt, 2019). Após a aquisição, o hipocampo rapidamente codifica as informações episódicas, que atuam como índices para neurônios neocorticais (Tyler & Rudy, 2007). A assembleia neuronal hipocampal-neocortical resultante seria o traço mnemônico para o episódio. Como reativações subsequentes no mesmo contexto seriam experiências similares, mas não idênticas, outros índices seriam criados no hipocampo à cada exposição, fazendo com que surjam novos traços hipocampo-neocorticais interlaçados e resultando em múltiplos traços que codificam e compartilham informações sobre o episódio vivido (Fig. 4). Dessa forma, o hipocampo sempre será necessário para a evocação de memórias episódicas contextualmente ricas e ao mesmo tempo suporta a corticalização que produz memórias generalizadas ou pobres em detalhamento contextual.

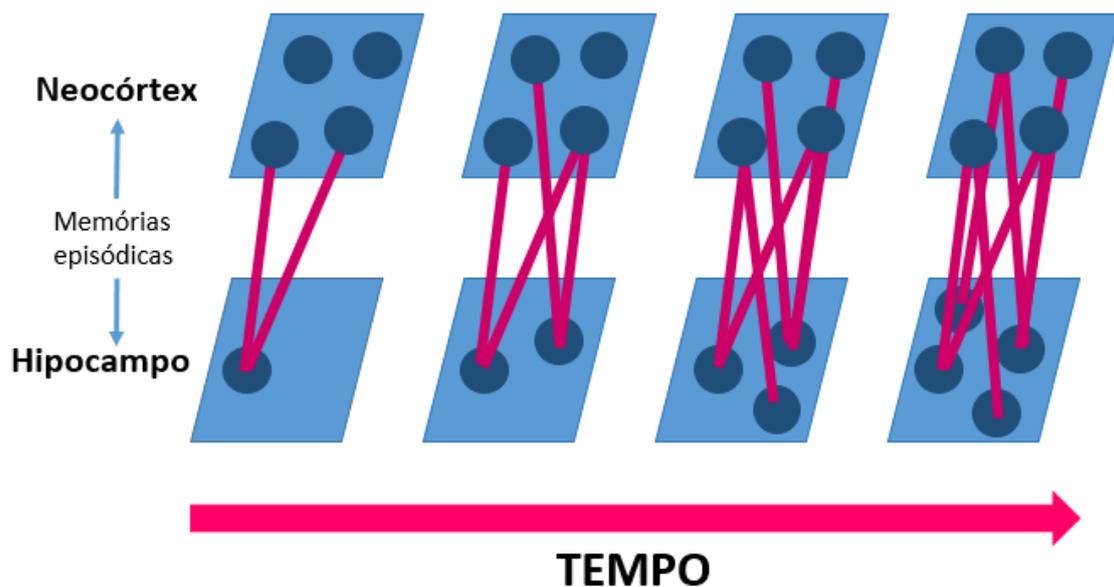


Figura 4. Esquema representando a Teoria dos Múltiplos Traços.

Esse modelo seria mais tarde atualizado por Winocur e colaboradores (2010) em um novo modelo conhecido como a Teoria da Transformação do Traço que abrange observações que sugerem que as memórias episódicas contextualmente detalhadas dependentes do hipocampo e as semantizadas associadas ao neocórtex coexistem, interagindo e competindo por dominância (Fig. 5). Dependendo das condições limitantes ou *boundary conditions* (características da memória como a idade, força e tipo de tarefa comportamental em que foi adquirida) presentes durante a evocação, uma representação pode ser favorecida ao invés da outra (Sekeres et al., 2018). Esse modelo enfatiza os paralelos entre as características neuroanatômicas das estruturas encefálicas que sustentam a memória e as qualitativas das informações evocadas (Quillfeldt, 2019).

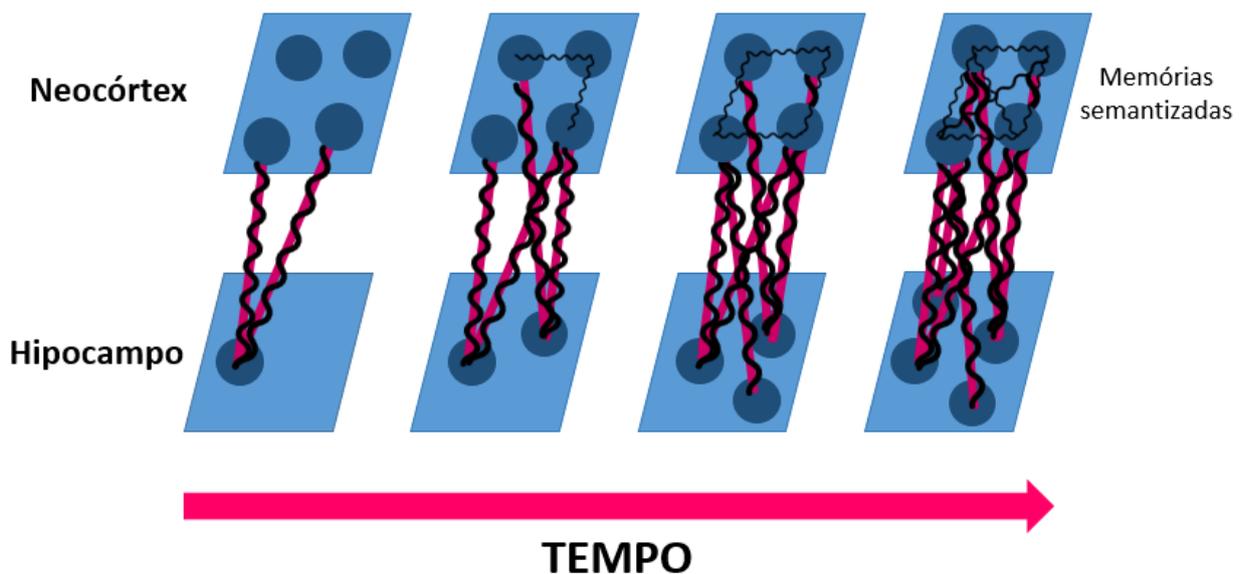


Figura 5. Esquema representando a Teoria da Transformação dos Traços.

Levando em conta essa hipótese, a transformação na qualidade da memória ocorre concomitantemente à consolidação sistêmica.

Dessa forma, com o passar do tempo a memória se torna semantizada, ou generalizada, ao ser reorganizada e passa a depender de estruturas corticais para a sua evocação.

1.4 O tempo como elemento de transformação

“Das que aconteceram daqui duas semanas”, respondeu a Rainha Branca quando Alice lhe perguntou das coisas que ela se lembrava melhor. Tanto no País das Maravilhas do outro lado do Espelho quanto no mundo real, o tempo é um dos motores da transformação de memórias de experiências vividas. Em humanos, a capacidade de abstrair para imaginar um acontecimento futuro permite planejar para o que está por vir. Em modelos animais como roedores, não há certezas se estes são capazes dessa mesma façanha cognitiva, mas demonstram ter respostas comportamentais complexas e adaptativas para lidar com situações novas baseadas em aprendizados passados.

1.4.1 Do valor adaptativo da generalização ao mal-adaptativo

A realidade é dinâmica e muitas vezes imprevisível, e a capacidade de o indivíduo inferir consequências baseado no repertório mnemônico aumenta as chances de sobrevivência. Porém, ter somente memórias episódicas muito precisas necessitaria com que o animal passasse por experiências novas para atualizar o repertório comportamental. Dessa forma, generalizar uma memória episódica aversiva para outros estímulos tem grande valor adaptativo pois permite que o animal antecipe situações adversas baseadas em dicas presentes.

O valor adaptativo de uma memória aversiva depende muito do contexto ambiental em que o animal está inserido (Asok et al., 2019) e uma mesma resposta comportamental pode salvar a vida em um conjunto de circunstâncias e ser um impedimento em outras. Por isso, deve se levar em consideração esses parâmetros ao declarar que uma memória aversiva é adaptativa ou não.

Levando em conta o acima, como exemplo simples de uma resposta adaptativa, uma criança pequena, inexperiente e curiosa decide colocar os dedos uma tomada e recebe um choque. Agora com medo de tomadas em geral, ela nunca mais coloca os dedos em uma e não arrisca se lesionar. Essa criança não precisaria testar todas as tomadas que encontra pela sua frente para aprender que vai levar choque, basta generalizar a experiência de uma.

Em um segundo exemplo, um soldado vivencia os traumas da guerra num país distante. Ao voltar para a sua terra, passa a desenvolver respostas fisiológicas de estresse e ansiedade ao ouvir quaisquer barulhos altos repentinos ao seu redor. Associa o fogo do seu churrasco às chamas de destruição da guerra. Um buraco na estrada evoca memórias de vestígios de minas terrestres explodidas.

No exemplo acima, a hipergeneralização de memórias aversivas é um sintoma caracteristicamente associado aos transtornos de ansiedade e associados a estressores como o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) e Transtorno Pós-Traumático (TEPT) (Lissek et al., 2010; Lissek, 2012; Keiser et al., 2016). Em ambientes seguros se caracteriza, portanto, como mal-adaptativa (Jasnow et al., 2017) pois a pessoa não consegue mais dissociar estímulos neutros de memórias robustas e patológicas, afetando negativamente tanto a saúde mental quanto física (Besnard & Sahay, 2016).

1.4.2 A generalização e consolidação sistêmica como dois lados de uma mesma moeda

Vários estudos sugerem que os dois fenômenos – consolidação sistêmica e generalização -- são processos temporalmente entrelaçados (Wiltgen et al., 2010; Pedraza et al., 2016). O seu curso natural pode ser antecipado ou retardado dependendo de variáveis não-temporais como o sexo (Lynch III et al., 2013; 2016; Keiser et al., 2016), a idade (Crestani & Lotz et al, 2021, manuscrito em fase de pré-submissão), intensidade do treino aversivo (Pedraza et al., 2016), reativações periódicas (De Oliveira Alvares et al., 2012) segundos aprendizados e aprendizados novos (Haubrich et al., 2016; Pedraza et al., 2017; Crestani et al., 2018). Além disso, a atividade neural aumenta no mPFC em paralelo com a emergência da generalização do medo para as memórias remotas (Cullen et al., 2015) enquanto que diminui nas regiões hipocampais (Bontempi et al., 1999), sugerindo que o mPFC tem um papel ativo na generalização da memória. Mas o que acontece com a qualidade da memória episódica com o passar do tempo?

O nome dado ao fenômeno em que uma dica nova evoca uma resposta comportamental aprendida foi generalização do estímulo. Foi observado por Pavlov (1927) mas seriam mais três décadas até surgir o primeiro estudo que demonstrou que o nível de generalização da memória mudava de acordo com o intervalo de retenção (Perkins & Weyant, 1958). No Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC), o *freezing*, que é tomado como índice da expressão de medo, varia de acordo com o intervalo de tempo quando roedores são testados em um contexto distinto daquele onde foram treinados (Wiltgen & Silva, 2007; Wiltgen et al., 2010; Jasnow et al., 2017). Animais testados horas ou poucos dias após o treino em um contexto novo demonstram ter a memória contextual ainda precisa, isto é, conseguem discriminar os contextos e o nível de *freezing* é baixo. Aumentando o intervalo de tempo entre o treino e teste, a memória perde detalhamento contextual e se torna generalizada, ou seja, há perda de precisão e os animais não discriminam mais entre contextos.

A perda de detalhamento contextual para memórias aversivas remotas foi demonstrada inúmeras vezes, mas ainda é pouco conhecido os mecanismos por trás deste fenômeno.

1.4.3 Mecanismos por trás da perda de precisão

A Teoria da Transformação do Traço oferece uma explicação para as mudanças qualitativas que ocorrem com memórias episódicas quando são consolidadas sistemicamente. De memórias contextualmente ricas e dependentes do hipocampo, passam a depender de estruturas corticais e se tornam mais semantizadas ou esquemáticas.

Esse tipo de memória requer vários processos, duas das quais é a discriminação entre experiências similares, denominada separação de padrões (*pattern separation* em inglês) e a evocação multidimensional de experiências, conhecido como integração de padrões (*pattern completion* em inglês) a partir de dicas parciais (Rolls, 2013). *Pattern separation* é favorecido no hipocampo onde há menor sobreposição de traços enquanto que no neocórtex, onde há

maior sobreposição de traços, predomina o *pattern completion*, e o nível de sobreposição de traços define a interferência entre eles.

Tomando como base essas ideias, Hardt et al. (2013) propuseram que na generalização dependente de tempo, o decaimento do índice hipocampal enfraquece as representações contextuais e, portanto, aumenta a interferência entre os traços corticais que estão amplamente sobrepostos, resultando na semantização da memória. De acordo com os autores, é o nível de interferência no hipocampo que determina a troca qualitativa em memórias consolidadas de precisa à generalizada. Esta hipótese prevê que desacelerando a interferência no hipocampo também terá o mesmo efeito sobre o decaimento do índice hipocampal e, portanto, resultaria em representações mais precisas da memória episódica. (Besnard & Sahay, 2016).

A estabilidade dos receptores AMPA na membrana contendo a subunidade GluA2 foi proposto como um possível mecanismo para a mediação de traços mnemônicos (Hardt et al., 2013). Num estudo do grupo do Hardt, a Miguez et al. (2016) demonstraram que a internalização dos AMPAR contendo a subunidade GluA2 pode ser um mecanismo molecular que acarreta em esquecimento. A estabilidade destes receptores mantém a potenciação de longa duração (LTP) (Kim et al., 2007) e a infusão do peptídeo GluA23Y efetivamente bloqueia a internalização dos AMPAR. Um achado interessante deste experimento é que treinando os animais em um contexto e infundindo este peptídeo no dHPC 13 dias após, a expressão de medo em um contexto alternativo neutro foi atenuada quando os animais foram testados 2 semanas após treino (Miguez et al., 2016).

Estes achados são de certa forma compatíveis com uma hipótese mais antiga que foi proposta por Riccio et al. (1992). Nesta, a generalização seria produto de esquecimento dos atributos do estímulo, ou seja, em intervalos longos entre o treino e teste os animais esquecem características específicas dos estímulos presentes no treino embora uma representação mnemônica geral persiste e pode ser acessada no teste. Porém, existem evidências que sugerem que o traço detalhado no hipocampo permanece e pode ser recuperado após manipulações comportamentais e farmacológicas. Em um estudo anterior do nosso laboratório, reexposições ao contexto treino durante três semanas após o

treino mantiveram a memória precisa e a expressão dessa memória de medo remota não foi sensível à infusão do agonista GABA_A muscimol quando testado no mesmo contexto treino, indicando que reativações periódicas retardem a corticalização da memória (De Oliveira Alvares et al., 2012).

Indo um passo além, Einarsson e colaboradores (2015) demonstraram que até 6h após uma sessão de reativação de uma memória remota, quando o ACC é inibido o hipocampo pode voltar a ficar suscetível à manipulação farmacológica. Em outro experimento deste estudo, inibindo o ACC 6 horas após a reativação de uma memória remota no contexto treino e testando os animais logo após em um contexto alternativo, os ratos expressaram menos *freezing* comparado ao controle, indicando que a memória neste grupo era contextualmente precisa. Este estudo sugere que mesmo num período em que a memória seria expressa como generalizada (30 dias após o treino), o HPC pode se tornar ativamente e transitoriamente envolvido quando há uma sessão de reativação. Foi somente com a supressão simultânea do dHPC e do ACC que houve prejuízo na memória contextual remota reativada, indicando que mesmo no caso de memórias que passaram por uma reativação, qualquer das duas estruturas é suficiente para suportar a evocação de uma memória remota.

Baseado nesses estudos com perda de função temporária (lesão ou inibição farmacológica) é possível que haja um mecanismo compensatório para que a memória remota precisa volta a se expressar. Outro estudo interessante recente (Sekeres et al., 2020) investigando a atividade neuronal no dHPC e ACC em encéfalos intactos e sem o efeito de fármacos mostrou que houve a expressão de c-fos no CA1 após exposição no contexto original, mas não no contexto novo, independentemente de ter tido uma sessão de reativação entre o treino e teste. Adicionalmente, c-fos foi altamente expresso no ACC após a sessão de teste em ambos os contextos, independente das condições de reativação. Esses resultados mostram que, de fato, o CA1 retém a especificidade contextual e o ACC suporta representações generalizadas que são insensíveis a reativações.

A maioria dos estudos verifica o papel do hipocampo e do neocórtex na expressão de memórias recentes precisas e remotas generalizadas, mas entre

essas duas áreas cerebrais existem outras estruturas no lobo temporal medial que são importantes na memória, uma das quais é o córtex entorrinal.

1.5 O córtex entorrinal: Interface entre o hipocampo e o neocórtex

Na virada do século passado, Santiago Ramón y Cajal (1902) em seus estudos sobre a neuroanatomia descreveu uma parte do córtex temporal posterior que estava fortemente conectado através de fibras nervosas angulares ao subiculum da formação hipocampal (Witter et al., 2017). O gânglio do córtex esfenoide/angular, como foi chamado por Cajal, foi rebatizado de córtex entorrinal (EC) nos anos seguintes. Cajal sugeriu que essa área cerebral tivesse a mesma função fisiológica que o hipocampo devido a conectividade entre as duas estruturas e que tanto o EC quanto o HPC seriam parte do córtex olfatório. Embora a ideia de que estas duas estruturas processavam estímulos olfatórios não tenha sido muito bem aceita nos anos 50 com o trabalho de Scoville e Milner (1957), o interesse no EC foi renovado com trabalhos neuroanatômicos em macacos rhesus (Van Hoesen & Pandya, 1975; Van Hoesen et al., 1975) e pouco mais tarde, com estudos sobre a importância do EC na instalação da doença de Alzheimer (Braak & Braak, 1985; de Toledo-Morrell et al., 2004) e na epilepsia do lobo temporal (Du et al., 1993; Bonilha et al., 2003). Em 2014, Moser, Moser e O'Keefe foram agraciados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por descrever as *place cells* (células de lugar) no hipocampo (O'Keefe & Dostrovsky, 1971) e as *grid cells* (células de grade) no córtex entorrinal medial (Hafting et al., 2005; Fyhn et al., 2007).

As células de lugar no hipocampo são provavelmente um nível acima na escala de integração de informações que as células de grade no entorrinal medial. O *loop* da hierarquia de processamento de informações entre o neocórtex e o HPC, passa pelo EC (Fig. 6). Pelas suas características neuroanatômicas e de conectividade entre neurônios, o hipocampo é o maior integrador de informações convergentes provenientes de córtices de associação. Recebe e processa informações através de duas vias principais, o "*what*" *stream* e o "*where*" *stream*, para gerar uma representação de contexto (Lavenex & Amaral, 2000; Eichenbaum et al., 2007).

1.5.1 Divisão anatômica e conexões com outras estruturas

O EC deriva o seu nome por estar parcialmente envolto pelo sulco rinal e faz parte dos córtices rinais: entorrinal, perirrinal e pós-rinal (parahipocampal em primatas), localizados na região parahipocampal do lobo temporal medial. Possui 4 camadas, sendo, portanto, classificado como paleocórtex, uma área filogeneticamente intermediária entre o arquicórtex (3 camadas) e o neocórtex (6 camadas).

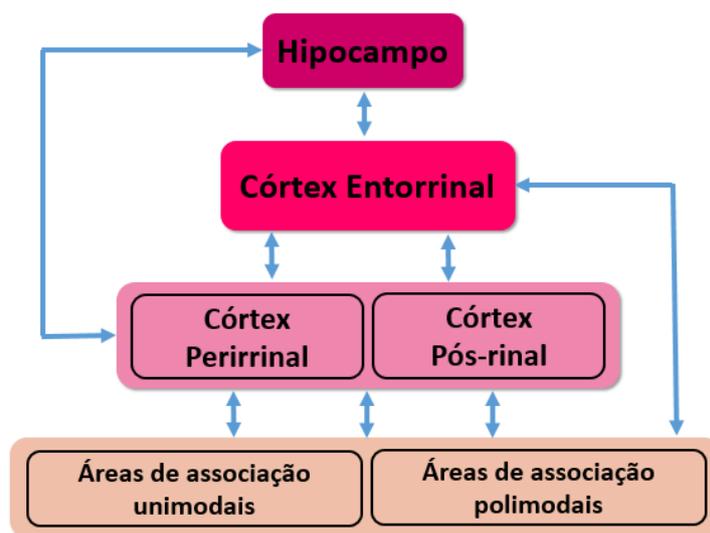


Figura 6. Diagrama esquemático simplificado das principais projeções do lobo temporal medial com os córtices de associação. O hipocampo (arquicórtex) seria o destino das informações convergentes provenientes do neocórtex e o mais alto nível de integração dessas informações. Informações processadas no hipocampo fluem de volta para o neocórtex. Adaptado e modificado de Lavenex & Amaral (2000)

O EC recebe as principais aferências do córtex perirrinal (informações sensoriais unimodais sobre objetos discretos; “*what*”) e do córtex pós-rinal (informações espaciais polimodais; “*where*”) (Lavenex & Amaral, 2000; Lee & Lee, 2013) que convergem no hipocampo para se ter uma representação integrada de contexto (Eichenbaum et al., 2007). Também recebe projeções diretas do giro temporal superior, córtex insular, córtex orbitofrontal, córtex cingulado e o córtex retrosplenial (Insausti et al., 1987). Essa estrutura pode ser dividida em córtex entorrinal lateral (LEC) e medial (MEC) baseada em seu

padrão de conectividade (Dolorfo & Amaral, 1998; Kerr et al., 2007) e a informação das diferentes camadas do MEC e LEC flui para a formação hipocampal (Asok et al., 2019), onde então chegam no giro denteado dorsal, região CA3, CA1 e subiculum (Fig. 7). As principais vias de entrada de informações polimodais para o MEC são provenientes do córtex pós-rinal enquanto o LEC recebe principalmente informações dos córtices de associação unimodal por meio do córtex perirrinal (Suzuki & Amaral, 1994; Eichenbaum et al., 2007).

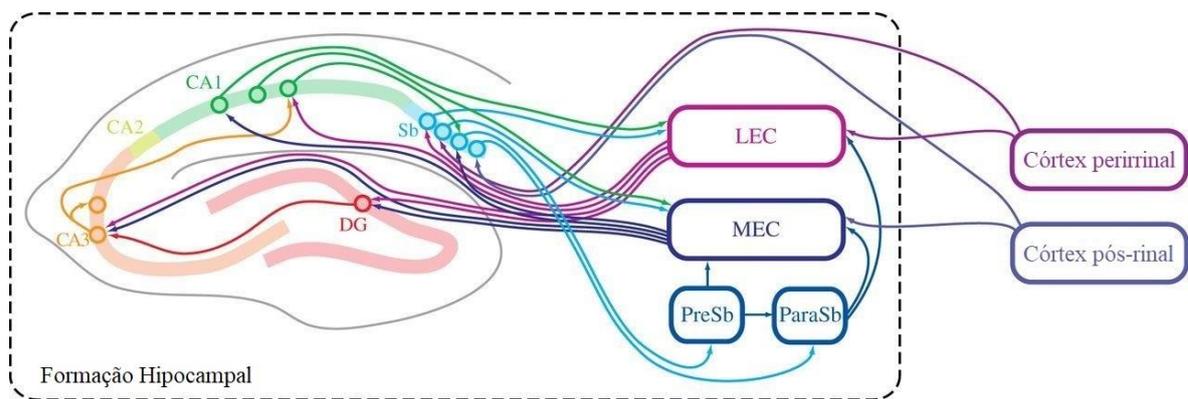


Figura 7. Representação esquemática das principais vias anatômicas da formação hipocampal e lobo temporal medial do rato. CA: Corno de Ammon; DG: Giro Denteado; Sb: Subiculum; LEC: Córtex Entorrinal Lateral; MEC: Córtex Entorrinal Medial. Adaptado de Hartley et al. (2014)

As divisões lateral e medial podem ser diferenciadas com base nas diferenças morfológicas como tipo de neurônios, densidade celular, tamanho e formato das células (Canto et al., 2008) sendo estas diferenças caracterizadas principalmente pela conectividade das aferências e eferências (Witter et al., 2000) (Fig.8).

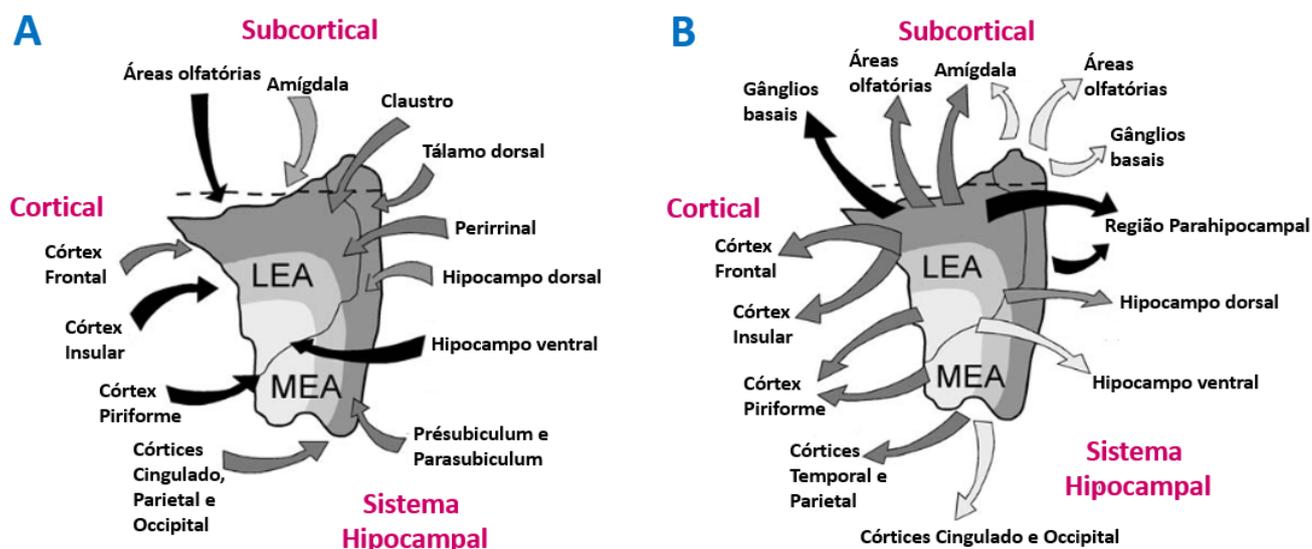


Figura 8. Resumo das principais aferências (A) e eferências (B) do córtex entorrinal, nas suas divisões de área lateral (LEA) e medial (MEA). Setas pretas representam maior força de conectividade. Setas cinzas, força média e setas brancas, fraca. Traduzido de Kerr et al. (2007).

Que o hipocampo e neocórtex são importantes na consolidação sistêmica e transformação qualitativa da memória são fatos bem estabelecidos (Frankland & Bontempi, 2005), mas menos é conhecido sobre o papel do EC nesses processos.

1.5.2 O córtex entorrinal lateral na consolidação sistêmica e generalização de memórias episódicas

Evidências experimentais em modelos animais sugerem que o EC não somente é uma interface entre o hipocampo e o neocórtex, mas que é um nóculo importante na rede que medeia processos mnemônicos, participando da codificação rápida de associações novas. Além disso, embora seja essencial para a aquisição da memória, o EC contribui para a evocação até quando o hipocampo não é mais necessário (Takehara-Nishiuchi, 2014). Isso indica que o EC participa ativamente da consolidação sistêmica. Para testar essa ideia, Quillfeldt et al., (1996) treinaram ratos na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA e infundiram o antagonista AMPAR, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), no hipocampo mais amígdala, no córtex entorrinal lateral e no córtex parietal

posterior, 1, 31 e 60 dias após o treino. A esQUIVA inibitória é, como o CAC, uma tarefa dependente do hipocampo. Os autores mostraram que as quatro estruturas participam da evocação da memória aversiva 1 dia após o treino. Aos 31 dias, o hipocampo não participa mais e aos 60 dias, somente o córtex parietal posterior continua sendo necessário para a expressão da memória contextual aversiva, mostrando de forma elegante a dinâmica de diferentes estruturas na evocação da memória ao longo do tempo.

Estudos eletrofisiológicos também oferecem evidências sobre a importância do LEC na estabilização e na consolidação de memórias episódicas recentes e remotas. A atividade do HPC é dominada por oscilações theta durante uma sessão de aquisição e imediatamente após, *sharp waves* sincronizadas são gerados pelos neurônios hipocampais e podem se propagar para outras estruturas. Por outro lado, durante a evocação de memórias remotas, neurônios no mPFC disparam seletivamente para a associação formada durante o treino (Takehara-Nishiuchi & McNaughton, 2008). Takehara-Nishiuchi et al. (2012) analisaram a sincronização theta entre o HPC-LEC, e LEC-mPFC e mostraram que treinando ratos numa tarefa de *trace eyeblink conditioning* e testando em diferentes intervalos de tempo, as oscilações e sincronização theta mudavam. Durante o treino, a amplitude das oscilações theta no HPC e a sincronização theta no HPC-LEC estavam aumentadas. Esse efeito gradativamente se perdeu com o passar do tempo, em que na sessão de teste da memória remota, a amplitude das oscilações theta no HPC e a sincronização theta no HPC-LEC estavam atenuadas. Também observaram que a amplitude no LEC-mPFC ficava gradativamente aumentada em ratos que tiveram a resposta condicionada. Além disso, a sincronização se manteve elevada entre essas duas áreas durante sessões de teste da memória remotas. Estes resultados são consistentes com a teoria da consolidação sistêmica, e com intrigantes evidências apontando o papel do LEC como uma estação de relé entre o HPC e o mPFC que ativamente regula a evocação dependendo da idade da memória (Fig. 9).

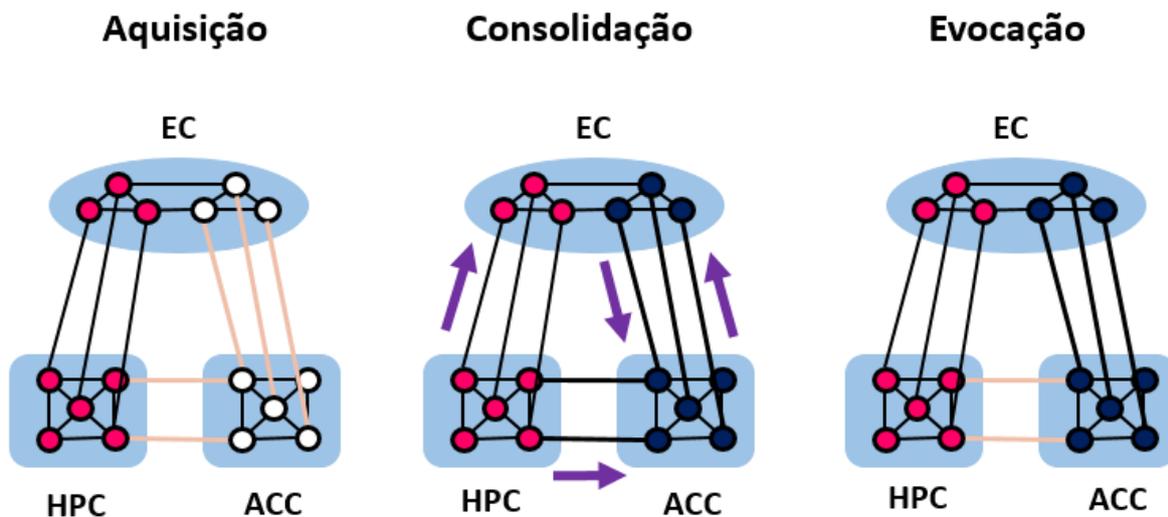


Figura 9. Esquema representando o EC como estação de relé entre o HPC e o ACC. A evocação de memórias recentes seria principalmente pela interação HPC-EC enquanto que as conexões EC-ACC seriam fortalecidas com o passar do tempo. Adaptado e modificado de Takehara-Nishiuchi (2014).

Essa característica sugere que uma pequena mudança na conectividade do EC pode ter um impacto em como a rede cortical opera durante a evocação de uma memória contextual. Baseado em estudos passados, Takehara-Nishiuchi (2014) hipotetizou que a conectividade entre o EC e o HPC ou ACC muda com a consolidação sistêmica e que o EC tem uma função duradoura na evocação da memória ao primeiro interagir com o HPC e depois com o mPFC/ACC.

Se existem relativamente poucos trabalhos na literatura sobre o papel do córtex entorrinal na consolidação sistêmica, menos se sabe sobre a sua participação na discriminação contextual. Em um estudo avaliando a precisão da memória contextual, lesões neurotóxicas tanto no perirrinal e entorrinal lateral ou no pós-rinal e entorrinal medial produziram uma rápida generalização 1 dia após o treino, sugerindo que a região parahipocampal é necessária para a codificação de memórias contextualmente precisas (Burwell et al., 2004), porém com a extensão da lesão não fica claro a contribuição do LEC na precisão ou generalização da memória. Em outro, os autores registraram disparos neuronais nas camadas profundas do EC, alvos de conexões provenientes do hipocampo, enquanto os animais exploraram um labirinto e verificaram que essas camadas do EC mantêm o mesmo padrão de atividade mesmo quando o contexto muda

(Frank et al., 2000). Os autores sugerem que esse padrão de disparo poderia favorecer a generalização entre contextos já que o EC representa as regularidades entre trajetórias diferentes. Analisando o MEC, Kitamura et al. (2015) viram que células específicas da camada II do MEC (*Ocean Cells*) que projetam diretamente para o DG são essenciais para a formação rápida de representações contextuais distintas.

Partindo destes resultados anteriores do nosso e de outros laboratórios, e justificando-se pelos vazios na literatura acerca da participação do LEC na consolidação sistêmica e precisão da memória aversiva contextual, nossa hipótese de trabalho é de que, em função de suas conexões e funções específicas, o LEC poderá exibir um perfil temporal distinto do HPC na dinâmica da consolidação sistêmica e generalização.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar, por meio da inibição farmacológica pré-teste com o agonista GABA_A muscimol, o perfil temporal da participação de duas áreas corticais – o hipocampo dorsal e o córtex entorrinal lateral – na evocação da memória de longo prazo na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto, em diferentes intervalos treino-teste. Paralelamente ao envolvimento da estrutura em questão (mediante essa inativação farmacológica), avaliar a qualidade da memória nos diferentes intervalos temporais. Isto é, verificar se os animais são capazes de discriminar entre o contexto onde foram condicionados e contextos neutros similares ao treino.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar os efeitos da inibição reversível do hipocampo dorsal (dHPC) mediante a infusão bilateral de muscimol ou seu veículo 15 minutos antes da sessão de teste realizada 2 ou 28 dias após o treino no mesmo contexto do condicionamento (Contexto A).

2.2.2 Avaliar os efeitos da inibição reversível do córtex entorrinal lateral (LEC) mediante a infusão bilateral de muscimol ou seu veículo 15 minutos antes da sessão de teste realizada 2 ou 28 dias após o treino no mesmo contexto do condicionamento (Contexto A).

2.2.3 Não havendo participação do LEC nos dois tempos, será repetido o protocolo acima para 14 dias após o treino. Havendo participação dessa estrutura nos dois tempos, será repetido 45 dias após o treino.

2.2.4 Avaliar os efeitos da inibição reversível do hipocampo dorsal (dHPC) mediante a infusão bilateral de muscimol ou seu veículo 15 minutos antes da sessão de teste realizada 2 ou 28 dias após o treino no contexto alternativo, com dicas espaciais e tácteis similar ao do condicionamento (Contexto B).

2.2.5 Avaliar os efeitos da inibição reversível do córtex entorrinal lateral (LEC) mediante a infusão bilateral de muscimol ou seu veículo 15 minutos antes da sessão de teste realizada 2 ou 28 dias após o treino no contexto alternativo, com dicas espaciais e tácteis similar ao do condicionamento (Contexto B).

2.2.6 Avaliar os efeitos da inibição reversível do córtex entorrinal lateral (LEC) mediante a infusão bilateral de muscimol ou seu veículo 15 minutos antes da sessão de teste realizada 2 ou 28 dias após o treino no contexto alternativo com dicas visuais similares ao do condicionamento (Contexto C).

3. Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 70 e 75 dias no começo dos procedimentos (pesos entre 300 e 450g) fornecidos pelo CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e mantidos durante o período dos experimentos no Ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC). Os ratos foram acondicionados em gaiolas de plexiglass, até 4 por caixa-moradia, com assoalho de maravalha. O ratário é climatizado (22-26°C com umidade constante) e submetido a um ciclo de iluminação de 12h claro/12h escuro (luzes acesas das 7h às 19h). Os ratos receberam água e comida *ad libitum*. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com a legislação vigente (Lei Federal 11794/2008) e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (Projeto UFRGS #35969).

3.2 Aparatos

O Contexto A era uma caixa de acrílico (33 x 22 x 22 cm) iluminada internamente, com listras verticais em preto e branco nas quatro paredes. O chão era uma grade de barras de aço inoxidável paralelas de calibre 0,1 cm, espaçadas 1 cm umas das outras. Os ratos foram observados através de uma webcam montada na tampa opaca.

O contexto alternativo B era uma caixa retangular (22 x 22 x 25 cm) com três paredes bege opacas e uma transparente. Uma lâmpada de mesa colocada ao lado da parede transparente iluminava a câmara. O Contexto B continha um chão de grade similar de barras de cobre paralelas de calibre 0,1 cm, espaçadas 1 cm umas das outras.

O contexto alternativo C foi um cano de PVC circular cortado (diâmetro: 25 cm; altura: 22 cm) com listras verticais em preto e branco. O chão liso consistia em vidro preto temperado e a tampa, vidro transparente.

Os contextos B e C foram colocados em uma sala adjacente ao contexto de condicionamento (A). Os ratos foram habituados dentro das suas caixas

moradia à sala com ruído constante de fundo do aparelho de ar condicionado por 30 min antes de cada sessão de teste. As câmaras de condicionamento e teste foram limpas com solução de etanol a 70% antes de cada animal.

3.3 Procedimentos Experimentais

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento. Os grupos foram divididos em experimentos avaliando o papel do LEC (Experimento 1) e do dHPC (Experimento 2) na consolidação sistêmica e na precisão da memória.

3.3.1 Condicionamento aversivo ao contexto (CAC)

Todos os grupos experimentais foram treinados no contexto de condicionamento (Contexto A). Durante a sessão de condicionamento, os animais foram habituados ao contexto por 3 minutos antes de receber dois choques contínuos de 0,5 mA com duração de 2 s, separados por um intervalo de 30 s. Após 5 segundos adicionais após o segundo choque, os ratos foram removidos do contexto e retornados às suas caixa-moradias.

3.3.2 Sessões de teste

3.3.2.1 Consolidação sistêmica

Na sessão de teste, muscimol ou PBS foram infundidos bilateralmente no LEC ou dHPC 15 minutos antes dos animais serem reexpostos ao contexto de condicionamento (Contexto A). As sessões de teste duraram 5 minutos, durante as quais a resposta de *freezing* do rato foi cronometrada por um observador experiente, usando um cronômetro. O comportamento de *freezing*, definido como a ausência de todos os movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração (Blanchard & Blanchard, 1969), foi usado como um índice de retenção de memória e expresso como porcentagem do tempo total da sessão. Todos os ratos foram testados novamente por 5 min no mesmo contexto, 4 horas após a sessão de teste, na ausência de infusão intracerebral (reteste). As sessões de condicionamento e teste ocorreram no período da manhã, com sessões de reteste à tarde.

3.3.2.2 Precisão da memória

Sessões de teste para avaliar a precisão da memória foram realizadas em contextos alternativos (Contextos B e C). Os protocolos de infusão, duração da sessão e protocolo de reteste foram os mesmos dos citados acima.

3.3.3 Cirurgia estereotáxica, canulação e cuidados pós-operatórios

Os ratos foram anestesiados com uma injeção IP contendo uma associação de cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Cânulas-guia de calibre 22 foram implantadas bilateralmente nas coordenadas do hipocampo dorsal ou córtex entorrinal lateral (de acordo com Paxinos & Watson, 2007) posicionadas apenas 1,0 mm acima da região alvo. As cânulas foram posicionadas nas seguintes coordenadas em relação ao Bregma (mm): -7,0 AP, \pm 5,0 LL, -8,4 DV (da superfície do crânio) para LEC e -4,0 AP, \pm 3,0 LL, -1,6 DV (da superfície do crânio) para a região CA1 do dHPC. Os ratos se recuperaram por um período pós-operatório de 5 a 7 dias antes das tarefas comportamentais. Imediatamente antes da cirurgia e uma vez ao dia por dois dias consecutivos após a cirurgia, os animais receberam injeção subcutânea de medicamento anti-inflamatório (meloxicam - 1,5 mg/kg) e monitorados quanto à dor usando a *Rat Grimace Scale* (Sotocinal et al., 2011).

3.3.4 Drogas e infusão

O muscimol (1 μ g/ μ l, Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e infundido bilateralmente na região LEC ou CA1 15 min antes do teste no Contexto A, B ou C. O agonista GABA_A muscimol suprime temporariamente reversivelmente o disparo neuronal, inativando a área do cérebro alvo. O grupo veículo recebeu apenas PBS. Muscimol ou veículo foi infundido bilateralmente na região de interesse com cânulas de injeção de calibre 27 (*mizzy*) usando uma microbomba de duas seringas a uma taxa lenta (20 μ l/h) em um volume de 0,5 μ l/hemisfério. A ponta da agulha de injeção se projetava 1,0 mm além da ponta da cânula guia, voltada para a região de interesse. Após a infusão, as cânulas de injeção permaneceram por mais 30 segundos para permitir a difusão antes de serem removidas e o animal retornado à sua caixa-moradia.

3.3.5 Histologia

Ao final de cada experimento, os cérebros foram removidos e imersos em uma solução de sacarose a 20% e paraformaldeído a 4% por pelo menos dois dias. Os cérebros foram então congelados e cortados em seções coronais de 50 μm usando um criostato (Leica). As seções foram montadas na lâmina e coradas com violeta cresil para posterior verificação. Animais com colocação incorreta de cânulas, lesões macroscópicas e gliose foram excluídos das análises estatísticas.

3.3.6 Análises estatísticas

Tendo passado os testes de normalidade e homocedasticidade, os resultados foram analisados usando teste t de Student bicaudal não pareado, ANOVA independente de uma via ou duas vias. O teste post-hoc de Bonferroni foi então usado para identificar diferenças significativas. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$. A quantificação dos tamanhos dos efeitos entre os grupos experimentais muscimol e veículo foram calculados usando o g de Hedges.

4. Resultados

4.1 Experimento Piloto

Antes de começar os experimentos era necessário verificar se existia uma gradação de generalização entre os dois contextos alternativos, B e C. Para isso, ratos foram treinados no contexto de condicionamento (A) e testados 28 ou 45 dias após no mesmo contexto (A) ou em um dos alternativos (B ou C).

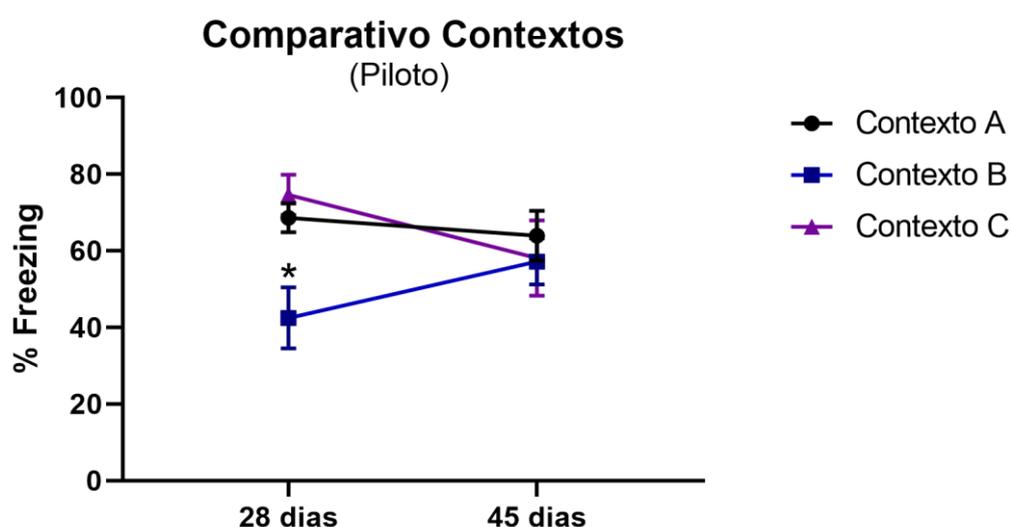


Figura 10. Comparação entre os três contextos para verificar o grau de generalização. Dados expressos como Média \pm SEM. O n foi de 6, 7 e 7 para Contexto A, B e C respectivamente. Os animais não foram canulados para este experimento.

Foi encontrado com o teste da ANOVA independente de duas vias um efeito de Contexto ($F_{(2,34)}=3,773$; $p=0,033$) mas não de Tempo ($F_{(1,34)}=0,139$; $p=0,710$) ou Interação Contexto x Tempo ($F_{(2,34)}=2,666$; $p=0,084$). O teste pós-hoc de Bonferroni revelou que aos 28 dias o Contexto B difere do Contexto A ($p=0,027$).

A partir deste experimento piloto foi escolhido o Tempo de 28 dias para os experimentos de generalização subsequentes. No entanto, analisando os dados obtidos nos testes de experimentos posteriores com animais canulados essa

gradação não foi encontrada. Comparando os grupos PBS nos Contextos A, B e C, a ANOVA independente de 1 via revelou que não tinha efeito de Contexto ($F_{(2,22)}=3,371$; $p=0,052$) embora o p pequeno é sugestivo. Indica que aos 28 dias os animais do grupo PBS de ambos os contextos alternativos generalizaram a memória.

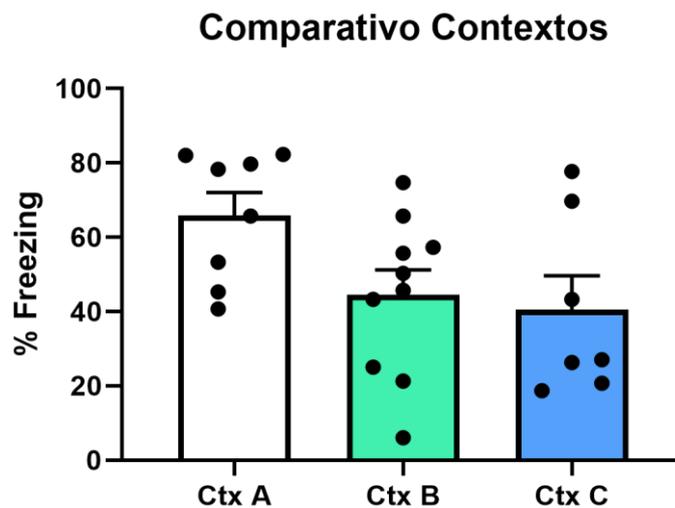


Figura 11. Comparativo entre os grupos PBS (LEC) nos três contextos aos 28 dias. Gráfico mostrando porcentagens de *freezing* dos três grupos controle obtidos nos experimentos com o LEC aos 28 dias para a verificação da gradação da generalização da memória. Os dados são expressos como Média \pm SEM e os pontos representam o comportamento individual dos ratos. ANOVA independente de uma via. Os tamanhos das amostras dos grupos são: 8,10 e 7 para Ctx A, B e C respectivamente.

4.2 Consolidação sistêmica

No primeiro conjunto de experimentos, os ratos foram treinados no Contexto A e testados no mesmo contexto 2 e 28 dias (HPC e LEC) e 45 dias (LEC) após o condicionamento. 15 minutos antes do teste, os animais receberam infusão intracerebral bilateral de muscimol (MUS) ou seu veículo (PBS). Os animais foram reexpostos ao contexto 4 h mais tarde para uma sessão de reteste sem infusão.

4.2.1 Participação do hipocampo dorsal na evocação da memória 2 e 28 dias após o treino

Existem amplas evidências mostrando que o dHPC participa da evocação de memórias contextuais recentes e que deixa de participar com um intervalo de tempo maior (Frankland & Bontempi, 2005). Para validar os nossos resultados experimentais do LEC, infundimos muscimol ou PBS na área CA1 do dHPC antes do teste no contexto de condicionamento 2 e 28 dias após o treino para verificar se a consolidação sistêmica havia ocorrido nesse período. Ao contrário do esperado, a ANOVA independente de duas vias não revelou um efeito significativo do Tempo ($F_{(1,23)}=4,115$; $p=0,054$), Droga ($F_{(1,23)}=1,519$; $p=0,230$) ou Interação Tempo x Droga ($F_{(1,23)}=3,071$; $p=0,093$). Embora não obtivemos um p significativo para 2 dias, o cálculo do g de Hedges revelou um tamanho de efeito grande ($g=1,136$), o que não foi encontrado para 28 dias ($g=0,0409$).

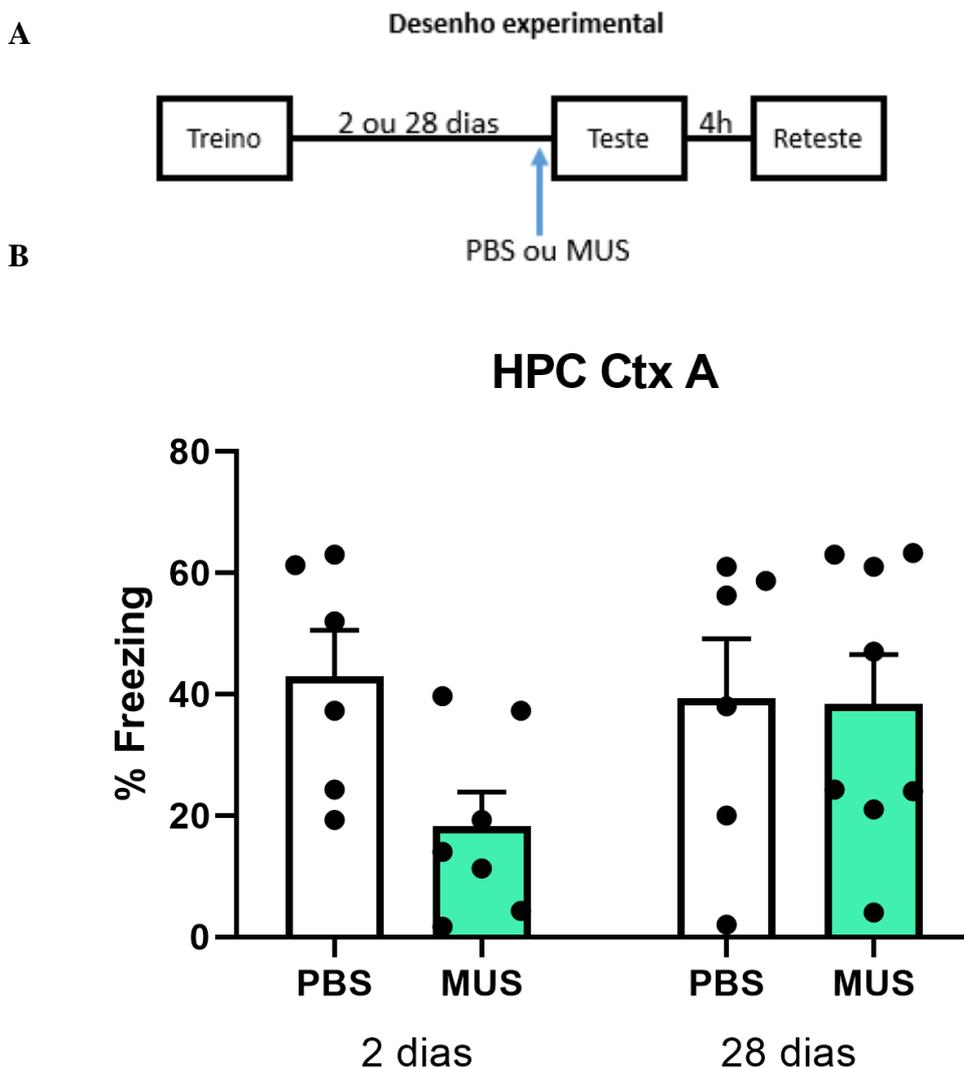


Figura 12. O hipocampo pode estar participando da evocação da memória 2, mas não 28 dias após o treino no contexto original. A: desenho experimental. B: Gráfico mostrando porcentagens de *freezing* na sessão de teste para memória recente (2 dias) e remota (28 dias). Os dados são expressos como Média \pm SEM e os pontos representam o comportamento individual dos ratos. ANOVA independente de duas vias não revelou diferenças significativas para 2 e 28 dias. O *g* de Hedges = 1,136 (2 dias) e 0,0409 (28 dias). Os tamanhos das amostras dos grupos são: 6,7 e 6,8 para 2 e 28 dias, respectivamente. Dados do reteste são mostrados no texto e no Apêndice.

Como esperado, na sessão do reteste, sem o efeito do fármaco, não houve diferença significativa entre os grupos tanto para 2 dias ($t_{(11)}=0,699$; $p=0,498$) quanto para 28 dias ($t_{(12)}=0,321$; $p=0,753$). Para comparações entre os grupos teste e reteste aos 2 dias, a ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou uma interação Droga x Sessão ($F_{(1,11)}= 7,778$; $p=0,017$) porém o teste pós-hoc de Bonferroni revelou que a diferença entre o grupo MUS do teste e reteste não era significativa ($p=0,053$).

Estes resultados são bastante sugestivos de que o muscimol teve efeito quando infundido pré-teste no dHPC no mesmo contexto treino, em concordância com estudos anteriores. É provável que o efeito estatístico significativo seja encontrado aumentando o n dos animais já que o tamanho da amostra é baixo.

4.2.2 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória 2 e 28 dias após o treino

Para replicar os resultados encontrados por Quillfeldt et al. (1996) e comparar com os resultados obtidos no HPC, infundimos muscimol ou seu veículo no LEC para verificar se essa estrutura participa da evocação da memória contextual 2 dias e 28 dias após o treino.

ANOVA independente de duas vias revelou um efeito do Tempo ($F_{(1,32)}=6,611$; $p=0,015$) e Droga ($F_{(1, 32)}=12,410$; $p=0,001$) mas não para a Interação Tempo x Droga ($F_{(1,32)}=0,03977$; $p=0,843$). Comparações múltiplas com o teste pós-hoc de Bonferroni revelou uma diferença significativa entre os grupos MUS e PBS tanto 2 dias ($p=0,030$) e 28 dias ($p=0,043$). Foi encontrado um tamanho de efeito grande nos dois tempos ($g= 1,1338$ para 2 dias e $g=1,1204$ para 28 dias).

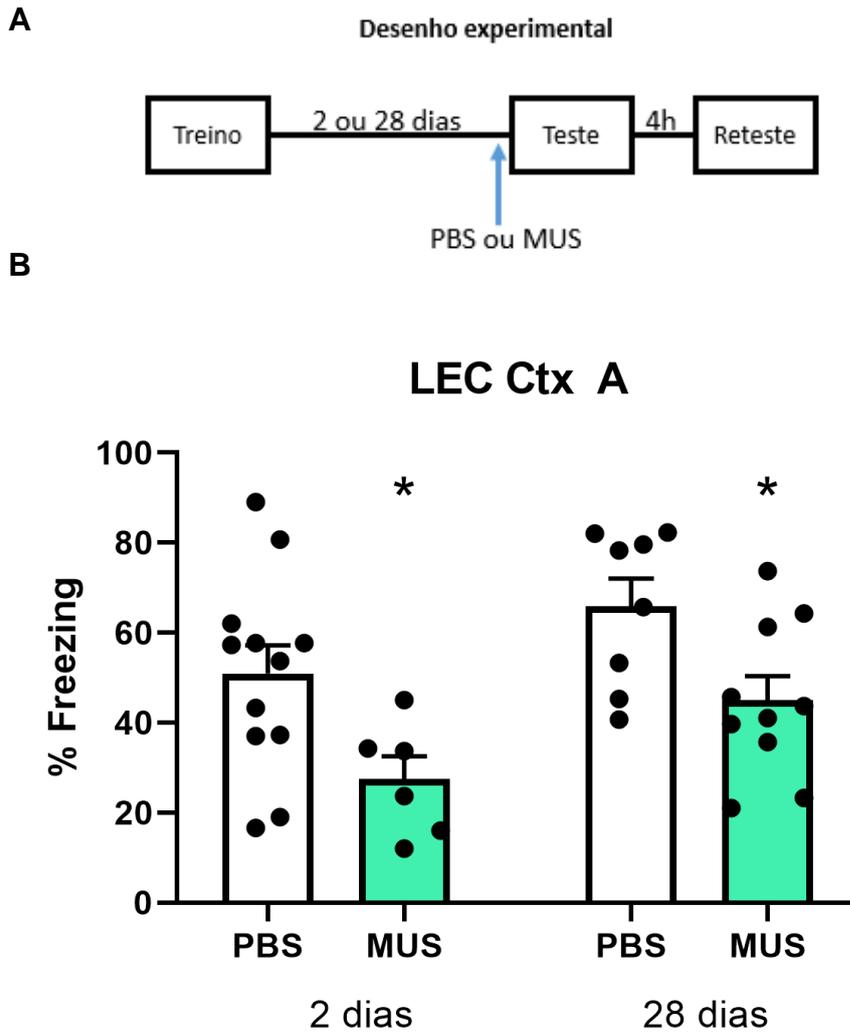


Figura 13. O LEC participa da evocação da memória aos 2 e 28 dias após o treino no contexto original. A: Desenho experimental. B: Gráfico mostrando porcentagens de *freezing* na sessão de teste para memória recente (2 dias) e remota (28 dias). Os dados são expressos como Média \pm SEM e os pontos representam o comportamento individual dos ratos. ANOVA independente de duas vias com asteriscos indicando $p < 0,05$ (teste pós-hoc de Bonferroni). O g de Hedges = 1,1338 (2 dias) e 1,1204 (28 dias). Os tamanhos das amostras dos grupos são: 12,6 e 8,10 para 2 e 28 dias, respectivamente. Dados do reteste são mostrados no texto e no Apêndice.

No reteste, grupos MUS e PBS não diferiram entre si tanto aos 2 dias ($t_{(15)}=1,707$ $p=0,108$) quanto aos 28 dias ($t_{(16)}=0,619$; $p=0,544$). Estes resultados sugerem que, embora neste intervalo de tempo o HPC não seja mais recrutado para a evocação da memória contextual, ainda não ocorreu a consolidação sistêmica no LEC.

4.2.3 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória remota 45 dias após o treino

Como o LEC ainda é necessário aos 28 dias, nos perguntamos se estendendo o intervalo de tempo para 45 dias essa estrutura ainda seria recrutada para a evocação de uma memória contextual.

Não encontramos uma diferença significativa entre os grupos MUS e PBS para a memória remota nem para o teste ($t_{(15)}=0,897$; $p=0,383$) quanto para o reteste ($t_{(15)}=1,022$; $p=0,323$), indicando que a memória foi consolidada sistemicamente em algum momento entre 28 e 45 dias.

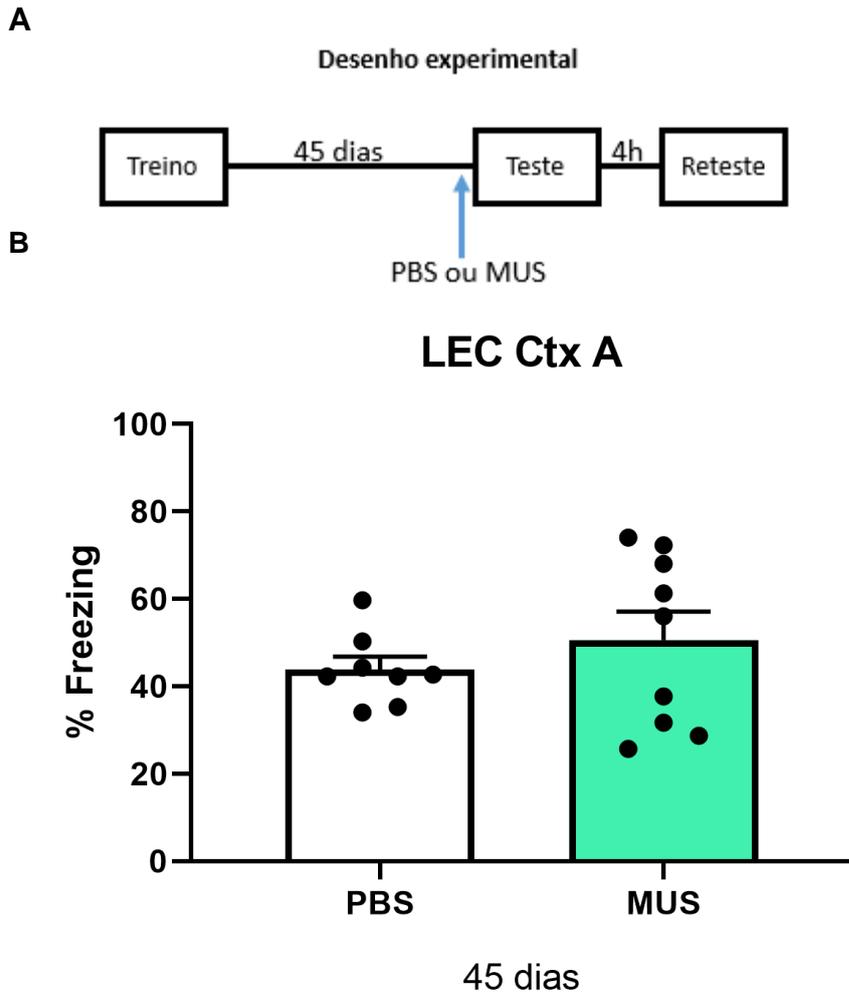


Figura 14. O LEC não participa mais da evocação de uma memória contextual remota (45 dias). A: Desenho experimental. B: Gráfico mostrando porcentagens de *freezing* na sessão de teste para a memória remota (45 dias). Os dados são expressos como Média \pm SEM e os pontos representam o comportamento individual dos ratos. Não houve diferença estatística entre grupos (teste t de Student não pareado; $p > 0,05$). O g de Hedges = 0,445. Os tamanhos das amostras dos grupos são: 8 e 9. Dados do reteste são mostrados no texto e no Apêndice.

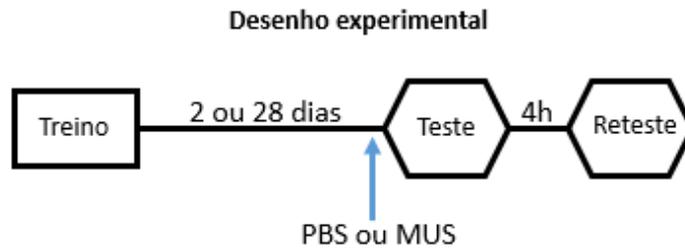
4.3 Generalização da memória

No segundo grupo de experimentos, os ratos foram treinados no Contexto A e testados 2 ou 28 dias após em um dos contextos alternativos B (HPC e LEC) ou C (LEC) para verificar a discriminação contextual. 15 minutos antes do teste, os animais receberam infusão intracerebral bilateral de muscimol (MUS) ou seu veículo (PBS). Ratos foram reexpostos ao mesmo contexto do teste 4 h mais tarde para uma sessão de reteste sem infusão.

4.3.1 Participação do hipocampo dorsal na evocação da memória no contexto alternativo B

Estudos anteriores mostraram que a generalização da memória pode ocorrer em paralelo com a consolidação sistêmica (Pedraza et al., 2016; Crestani & Lotz et al., 2021 – manuscrito em fase de submissão). Dessa forma, testamos para verificar se uma memória remota independente do hipocampo seria sensível ao efeito inibitório do muscimol. ANOVA independente de duas vias revelou um efeito bem significativo para Tempo ($F_{(1,29)}=20,48$; $p<0,0001$) mas não para Droga ($F_{(1,29)}=0,6966$; $p=0,410$) ou Interação Tempo x Droga ($F_{(1,29)}=0,9848$; $p=0,329$). O teste pós-hoc Bonferroni revelou que não houve diferenças entre os grupos MUS e PBS para 2 dias ($p>0,999$) e 28 dias ($p=0,343$). Para esses grupos, obteve-se um tamanho de efeito pequeno para 2 dias ($g=0,048$) e para 28 dias ($d=0,733$).

A



B

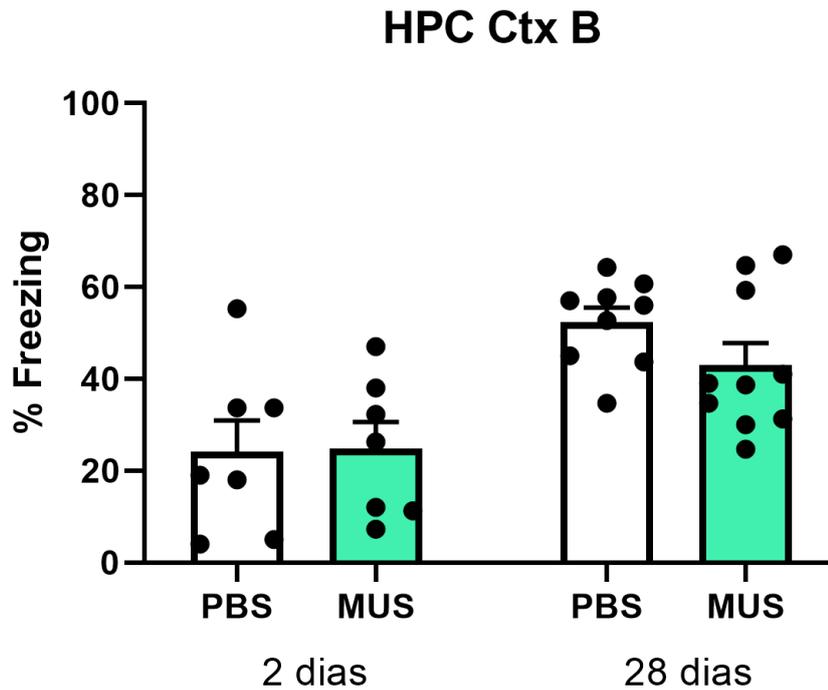


Figura 15. Muscimol não teve efeito aos 28 dias, quando testados no contexto alternativo B. A: Desenho experimental. B: Gráfico mostrando porcentagens de *freezing* na sessão de teste para a memória recente (2 dias) e remota (28 dias). Os dados são expressos como Média \pm SEM e os pontos representam o comportamento individual dos ratos. Não houve diferença estatística entre grupos (ANOVA independente de duas vias com teste pós-hoc de Bonferroni). O g de Hedges = 0,048 (2 dias) e 0,733 (28 dias). Os tamanhos das amostras dos grupos são: 7,7 e 9,10 para 2 e 28 dias, respectivamente. Dados do reteste são mostrados no texto e no Apêndice.

Uma diferença significativa entre os grupos MUS e PBS não foi encontrada no reteste para 2 dias ($t_{(12)}=1,352$; $p=0,201$) e 28 dias ($t_{(17)}=0,240$; $p=0,812$). Estes resultados indicam que a memória generalizada aos 28 dias não é mais dependente do hipocampo, congruente com os resultados obtidos no experimento da consolidação sistêmica (Fig. 10).

4.3.2 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória no contexto alternativo B

A inibição do LEC 28 dias após o treino em um contexto similar surpreendentemente resultou no prejuízo da memória de medo generalizada. A ANOVA independente de duas vias revelou um efeito significativo para o Tempo ($F_{(1,30)}=6,294$; $p=0,017$) mas não para Droga ($F_{(1,30)}=1,955$; $p=0,172$). Uma Interação Tempo x Droga foi encontrada ($F_{(1,30)}=9,240$; $p=0,004$). O teste pós-hoc subsequente revelou que não houve diferença entre os grupos MUS e PBS 2 dias após o treino ($p=0,562$) e houve uma diferença bem significativa aos 28 dias ($p=0,004$). Os tamanhos do efeito encontrados foram $g=0,801$ (2 dias) e $g=1,269$ (28 dias).

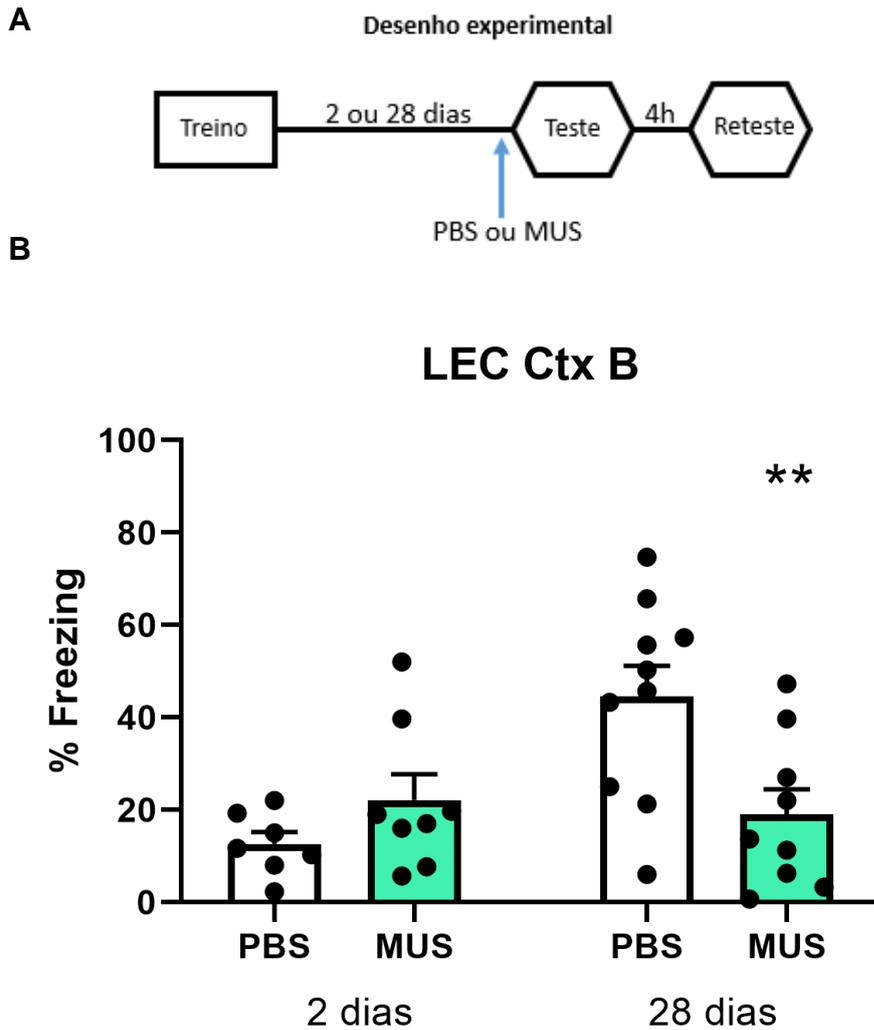


Figura 16. A inibição do LEC 28 dias após o treino no contexto alternativo B resultou no prejuízo da memória de medo generalizada. A: Desenho experimental. B: Gráfico mostrando porcentagens de *freezing* na sessão de teste para a memória recente (2 dias) e remota (28 dias). Os dados são expressos como Média \pm SEM e os pontos representam o comportamento individual dos ratos. Houve diferença estatística entre grupos aos 28 dias (ANOVA independente de duas vias com teste pós-hoc de Bonferroni; asterisco duplo indica $p < 0,01$). O g de Hedges = 0,0801 (2 dias) e 1,269 (28 dias). Os tamanhos das amostras dos grupos são: 7,8 e 10,9 para 2 e 28 dias, respectivamente. Dados do reteste são mostrados no texto e no Apêndice.

No reteste não houve diferença entre os grupos MUS e PBS para 2 dias ($t_{(13)}=0,475$; $p=0,642$) e o efeito encontrado no teste ao 28 dias desapareceu no reteste ($t_{(16)}=0,364$; $p=0,720$). Levando em conta que o LEC ainda participa da memória contextual aos 28 dias no contexto treino (Fig. 11), este resultado pode ter algumas implicações interessantes.

4.3.3 Participação do córtex entorrinal lateral na evocação da memória no contexto alternativo C

Testando os animais em um contexto alternativo C, 2 e 28 dias após o treino, não encontramos um efeito para Tempo ($F_{(1,31)}=0,044$; $p=0,834$), Droga ($F_{(1,31)}=2,214$; $p=0,146$) ou Interação Tempo x Droga ($F_{(1,31)}=0,371$; $p=0,546$). Os tamanhos do efeito obtidos foram pequenos, com $g=0,257$ para 2 dias e $g=0,648$ para 28 dias.

No reteste também não encontramos diferença entre os grupos MUS e PBS para 2 dias ($t_{(11)}=0,840$; $p=0,418$) e 28 dias ($t_{(15)}=0,610$; $p=0,550$).

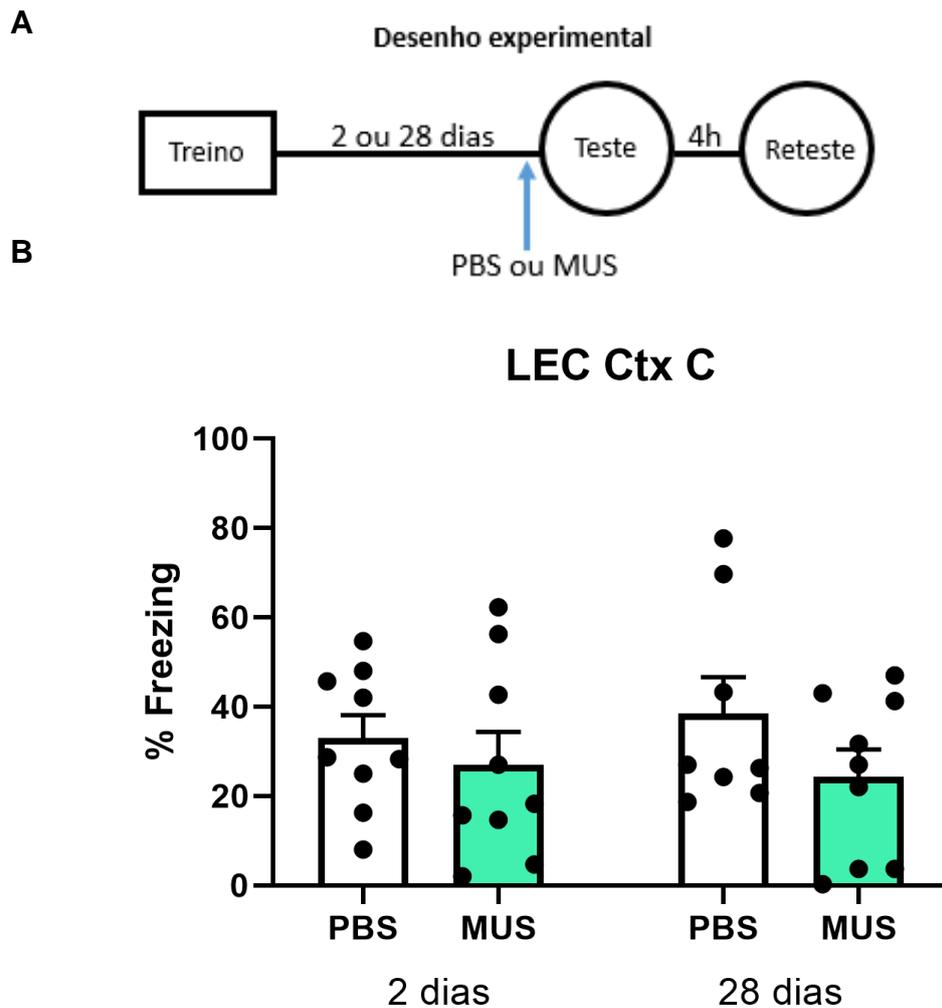


Figura 17. Muscimol não teve efeito aos 2 ou 28 dias, quando testados no um contexto alternativo C. A: Desenho experimental. B: Gráfico mostrando porcentagens de *freezing* na sessão de teste para a memória recente (2 dias) e remota (28 dias). Os dados são expressos como Média \pm SEM e os pontos representam o comportamento individual dos ratos. Não houve diferença estatística entre grupos (ANOVA independente de duas vias). O g de Hedges = 0,257 (2 dias) e 0,648 (28 dias). Os tamanhos das amostras dos grupos são: 9,9 e 8,9 para 2 e 28 dias, respectivamente. Dados do reteste são mostrados no texto e no Apêndice.

5. Discussão geral

A Teoria da Transformação do Traço postula que memórias episódicas ricas em detalhamento contextual e dependentes do hipocampo coexistem com as genéricas, ou semantizadas, associadas ao neocórtex, e que esses dois traços competem por dominância (Fig. 5) (Winocur et al., 2010). Embora testar essa hipótese não foi um dos nossos objetivos, nossos resultados favorecem essa interpretação.

O fato de que o HPC é importante na evocação de memórias recentes e contextualmente precisas é um fato bem estabelecido (Frankland & Bontempi, 2005; De Oliveira Alvares et al., 2012). Os resultados aqui apresentados mostram que quando a memória não é mais dependente do hipocampo para a sua expressão (Fig. 12), se encontra também generalizada (Fig. 15), em concordância com outros experimentos que sugerem que, sem outras intervenções farmacológicas e comportamentais que podem acelerar ou retardar o processo, a consolidação sistêmica e generalização da memória ocorrem em paralelo.

Existem poucos estudos verificando o papel do LEC na consolidação sistêmica. Em um dos primeiros (Quillfeldt et al., 1996), os autores treinaram ratos na esQUIVA inibitória e testaram em diferentes intervalos após o condicionamento. Viram que o LEC tem uma participação mais prolongada em comparação com o HPC – embora não fosse maior que a de áreas neocorticais como o córtex parietal posterior - indicando uma dinâmica temporal na evocação de estruturas do lobo temporal medial. De fato, outros estudos dão peso a essas observações (Takehara-Nishuichi, 2014). Usando outra tarefa comportamental (CAC), também dependente do HPC, replicamos, aqui, os resultados encontrados por Quillfeldt et al. (1996). Verificamos que o LEC participa aos 2 dias e aos 28 dias após o treino (Fig.13), mesmo quando já tinha um desengajamento do HPC 28 dias após o condicionamento (Fig. 12), e que a participação do LEC não é tão duradoura pois aos 45 dias não é mais necessário para a expressão da memória (Fig. 14). Nossos resultados mostram que, enquanto que a memória contextual aversiva é consolidada sistemicamente do

HPC antes dos 28 dias, essa memória continua sendo dependente do LEC até algum momento entre 28 e 45 dias após o condicionamento.

Da interação anatômica emerge a qualitativa ou psicológica, como sugere a Teoria da Transformação do Traço (Quillfeldt, 2019). Em nosso trabalho, testando os animais em um contexto com dicas espaciais e tácteis similares ao do treino (Contexto B), verificamos que a infusão pré-teste de muscimol no dHPC não teve efeito aos 28 dias (Fig. 15), que era esperado pois no mesmo intervalo de tempo a memória já foi consolidada sistemicamente do HPC (Fig. 12). Como controle adicional, testamos também no contexto alternativo 2 dias após o treino e, como esperado, o *freezing* foi baixo tanto para o grupo MUS quanto o grupo PBS, indicando que os animais mantinham uma representação contextualmente precisa (Fig. 15). O mesmo ocorreu para o LEC aos 2 dias (Fig. 16). Quando temporariamente inativamos o LEC 28 dias após o treino no Contexto B, surpreendentemente a expressão da memória generalizada também foi inibida (Fig. 16) e essa memória generalizada voltou a ser expressa na sessão do reteste (Apêndice Fig.9), indicando que o *freezing* baixo visto no grupo MUS foi devido ao efeito do fármaco. O reteste sem o efeito do fármaco é um importante controle em experimentos com inativação farmacológica temporária, e se espera que os grupos veículo e droga não diferem estatisticamente entre si. Levando isso em consideração, no experimento no Contexto B aos 28 dias, podemos dizer que o LEC, como outras áreas neocorticais, participa da generalização da memória, já que no teste o muscimol teve efeito e esse efeito não perdurou na sessão do reteste.

Este resultado foi inesperado pois aos 28 dias a infusão de muscimol no dHPC não teve efeito, indicando que esta área já não participa mais da evocação. Como, então, que a memória volta a ser aparentemente precisa quando o LEC está inibido? Seria um problema de armazenamento ou de evocação?

As propriedades anatômicas do EC e o neocórtex sugerem que o EC não só seria uma interface entre o HPC e áreas corticais, mas também entre o ACC e outras regiões neocorticais (Burwell, 2000; Agster & Burwell, 2009). Se esse for o caso, a interação entre o EC e essas áreas neocorticais deve ter papel fundamental na expressão da memória consolidada (Takehara-Nishuichi, 2014).

Para testar essa ideia, Tanninen et al., (2013) treinaram ratos numa tarefa de *trace eyeblink conditioning*, uma tarefa dependente do HPC, EC e várias regiões neocorticais, e testaram os animais 1 dia (recente) ou 30 dias (remota) após, com infusão unilateral e contralateral de muscimol ou aCSF no LEC e no prélimbico. Verificaram que o LEC participa tanto da expressão da memória recente dependente do HPC, quanto da remota associada ao mPFC. Estes resultados sugerem que o envolvimento do LEC na expressão da memória recente pode ser atribuído às interações com o HPC, enquanto que a remota com suas interações com o mPFC.

Embora tenhamos usado outra tarefa comportamental aversiva (o condicionamento aversivo ao contexto em vez da esquiva inibitória), uma hipótese para explicar este resultado encontrado (Fig 16) é que o HPC volta a ser necessário para a expressão da memória contextualmente precisa quando o LEC é inibido, como um mecanismo compensatório, já que as conexões entre o LEC e o neocórtex talvez não estejam fortalecidas o suficiente para suportar a memória corticalizada e generalizada (Fig. 9). Se esse for o caso, a inativação bilateral simultânea do LEC e do dHPC antes do teste da memória remota provavelmente resultaria na expressão da memória generalizada.

Outros achados que suportam essa hipótese podem ser encontrados nos trabalhos de Sutherland et al. (2010). Analisando tratamentos com perda de função, como lesões ou inativação farmacológica reversível, cunharam o termo *Distributed Reinstatement Theory* (DRT), ou Teoria da Reinstalação Distribuída em português, como hipótese *ad hoc* que postula que, ao invés de uma reorganização gradual e prolongada de um traço mnemônico, ocorre a criação rápida de um traço duplo no hipocampo e áreas corticais. O traço hipocampal seria uma representação fortalecida enquanto que o cortical, mais fraca (Quillfeldt, 2019). Tomando isso em consideração, possivelmente o HPC poderia ser favorecido quando o LEC é inibido pois a representação mnemônica hipocampal ainda está fortalecida e favorecida após este período de tempo. É necessário, também, testar com infusão pré-teste de muscimol no LEC em um período mais longo após o treino no Contexto B para melhor elucidar este resultado dos 28 dias.

Uma outra hipótese para explicar este resultado dos 28 dias no Contexto B é a função desempenhada pelos córtices rinais (entorrinal, perirrinal e pós-rinal) na memória de reconhecimento e a sensação de familiaridade (Fig. 19). O LEC recebe principalmente projeções do córtex perirrinal (Fig. 7), que por sua vez, recebe principalmente projeções do neocórtex por onde fluem informações unimodais sensoriais (Suzuki & Amaral, 1994; Lee & Lee, 2013). Trabalhos com foco no perirrinal mostram que lesionando essa estrutura resulta em um déficit no reconhecimento visual dos estímulos, prejudicando o reconhecimento de objetos discretos (Liu & Bilkey, 1999; Kesner et al., 2001) e na ausência da atividade do perirrinal a representação é generalizada no CAC (Bucci et al., 2002). Embora essa estrutura não seja o foco desse trabalho, levando em conta as conexões que o córtex perirrinal faz com o HPC e o LEC, este último também tendo papel na familiaridade, no reconhecimento de itens discretos e a localização destes no espaço (Deshmukh & Knierim, 2011; Wilson et al., 2013), há a possibilidade de que também exista um mecanismo compensatório que favoreça as conexões diretas perirrinal-hipocampo quando o LEC deixa de intermediar essa conexão, embora esse efeito, se existe, não parece se generalizar ao contexto com dicas visuais similares ao do treino, o Contexto C (Fig.17). Mais experimentos são necessários para elucidar o papel dessa estrutura na discriminação contextual, porém.

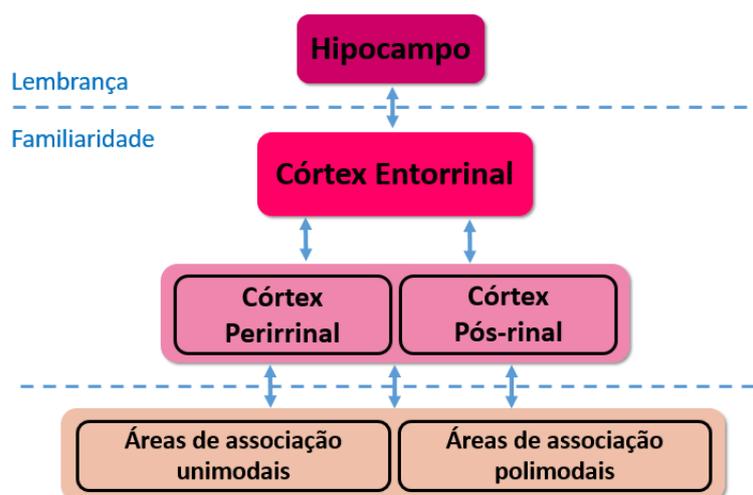


Figura 18. Sensações de familiaridade são atribuídas aos córtices rinais enquanto as de lembrança ao hipocampo. Adaptado de Lavenex & Amaral (2000) e Shimamura (2010).

Estudos eletrofisiológicos mostram que os neurônios do LEC não são espacialmente seletivos (Hargreaves et al., 2005) nem em contextos contendo várias dicas (Yoganarasimha et al., 2011). Porém, essa estrutura pode estar participando da transmissão de dicas visuais para o hipocampo (Scaplen et al., 2017). Neste último estudo, verificaram que a inativação do LEC resultou na maior influência de dicas visuais na atividade das células de lugar no HPC, indicando que o LEC está envolvido na modulação da utilização de dicas visuais pelo dHPC. Em nosso contexto alternativo C, utilizamos um cilindro com dicas visuais bem explícitas (listras pretas e brancas na parede, igual ao contexto treino). Verificamos que, aos 2 dias, animais PBS e MUS tinham uma representação generalizada quando infundimos o LEC com PBS ou MUS, o que foi verificado também aos 28 dias. (Fig. 17). Sendo que ratos têm uma preferência por estímulos olfatórios e táteis ao invés de visuais, e albinos têm uma visão relativamente pobre, este resultado de memória remota é interessante, porém problemático porque a generalização foi rápida aos 2 dias (quando se espera que os animais discriminam entre contextos) e, ao contrário do teste aos 28 dias no Contexto B (Fig. 16), o muscimol não teve efeito quando testado nesse mesmo intervalo no Contexto C.

Antes de iniciar os experimentos de generalização, foi verificado se havia uma gradação entre contextos (Fig. 10). Porém, analisando os níveis de *freezing* entre os grupos PBS do LEC aos 28 dias nos contextos A, B e C, essa gradação não foi confirmada (Fig.11). O Contexto C se mostrou ser muito similar ao do condicionamento A, mesmo aos 2 dias após o treino, quando se espera que os ratos discriminam bem entre contextos, houve *freezing* alto tanto para o grupo controle quanto para o muscimol (Fig. 17), tornando a utilização desse contexto problemático. Uma diferença entre os animais do experimento piloto com os outros é o fato de que estes primeiros não foram canulados, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos. Também, será interessante testar os ratos nos três contextos para verificar se existe gradação aos 2 dias, um experimento que não foi feito. Além disso, será necessário tornar o Contexto C menos similar ao de condicionamento (A), possivelmente adicionando um estímulo olfatório diferente.

6. Conclusões

O córtex entorrinal lateral faz conexões com várias estruturas importantes no processo mnemônico, mas o papel do LEC na consolidação sistêmica e generalização de memórias contextuais aversivas ainda é pouco conhecido. Os resultados aqui apresentados fortalecem a visão do LEC como um importante nódulo nesses circuitos e oferecem uma visão intrigante do papel dessa estrutura na generalização dessas memórias.

Dada a importância dessa estrutura em várias doenças neurológicas e psiquiátricas, e da generalização para transtornos como o TEPT, é importante elucidar os mecanismos por trás desses processos, possivelmente abrindo um caminho para estratégias de atenuação de memórias hipergeneralizadas e patológicas que prejudicam a saúde mental de tantos.

7. Perspectivas imediatas e de longo prazo

1. Refazer o teste com o n aumentado no contexto treino aos 2 dias com infusão no dHPC;
2. Realizar a infusão bilateral e simultânea de muscimol ou veículo no dHPC e LEC antes do teste aos 28 dias no contexto alternativo B;
3. Realizar um teste com infusão de muscimol ou veículo no LEC no Contexto B 45 dias após o treino;
4. Incorporar dicas olfatórias diferentes para tornar o Contexto C menos similar ao contexto treino e verificar se tem uma gradação entre A, B e C aos 2, 28 e 45 dias.
5. Havendo gradação da generalização, repetir os experimentos no Contexto C com inativação do LEC 2 e 28 dias após o treino.

8. Referências bibliográficas

- Agster, K.L. & Burwell, R.D. 2009. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 19, 1159–1186.
- Asok, A., Kandel, E. R., Rayman, J. B. 2019. The Neurobiology of Fear Generalization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(329), 1–15.
- Besnard A, Sahay A. 2016. Adult hippocampal neurogenesis, fear generalization, and stress. *Neuropsychopharmacology* 41:24–44.
- Blanchard, R. J. & Blanchard, D. C. 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 68(1), 129–135.
- Bonilha, L., Kobayashi, E., Rorden, C., Cendes, F., Li, L.M. 2003. Medial temporal lobectomy in patients with refractory temporal lobe epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 1627–1630.
- 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.
- Braak, H. & Braak, E. 1985 On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 68:325-332.
- Bucci DJ, Saddoris MP, Burwell RD. 2002. Contextual fear discrimination is impaired by damage to the postrhinal or perirhinal cortex. *Behav Neurosci* 116:479-488.
- Burwell, R.D. 2000. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 911, 25–42.
- Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ, Wiig KA .2004. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci* 24: 3826-3836.
- Canto, C.B., Wouterlood, F.G., Witter, M.P. 2008. What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? *Neural Plasticity*.
- Carroll, L. 1871. *Through The Looking Glass And What Alice Found There*. Philadelphia. Henry Altemus Company (livro).
- Casagrande, M.A., Haubrich, J., Pedraza, L.K., Popik, B., Quillfeldt, J.A., 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.
- Cowensage, K.K., Shuman, T., Dillingham, B.C., Chang, A., Golshani, P., Mayford, M. 2014. Direct reactivation of a coherent neocortical memory of context. *Neuron* 84: 432–441.
- Crestani, A.P., Sierra, R.O., Machado, A., Haubrich, J., Scienza, K.M., de Oliveira Alvares, L., Quillfeldt, J.A. 2018. Hippocampal plasticity mechanisms mediating experience-dependent learning change over time. *Neurobiol Learn Mem*, 150:56-63.

- Cullen, P. K., Gilman, T. L., Winiacki, P., Riccio, D. C., Jasnow, A. M. 2015. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol. Learn. Mem.* 124, 19–27.
- De Oliveira Alvares, L., Einarsson, E. Ö., Santana, F., Crestani, A. P., Haubrich, J., Cassini, L. F., Nader, K., Quillfeldt, J. A. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*.
- Deshmukh, S.S. & Knierim, J.J. 2011. Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Front Behav Neurosci* 5:69.
- De Toledo-Morrell, L., Stoub, T.R., Bulgakova, M., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Leurgans, S., Wu, J., Turner, D.A. 2004. MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiol Aging* 25:1197-1203.
- Dolorfo CL & Amaral DG. 1998. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol.* 398(1):49-82.
- Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol.*
- Dudai, Y. 2009. Predicting not to predict too much: how the cellular machinery of memory anticipates the uncertain future. *Phil. Trans. R. Soc. B.*
- Dudai, Y., Karni, A., Born, J. 2015 The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron.* 88(1):20–32.
- Du, F., Whetsell, W.O., Abou-Khalil, B., Blumenkopf, B., Lothman, E.W., Schwarcz, R. 1993. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 16:223-233.
- Duncan CP. 1949. The retroactive effect of electroshock on learning. pp 32-44.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A.R., Ranganath, C. 2007. The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. *Annu Rev Neurosci.*; 30: 123–152.
- Einarsson EÖ, Pors J, Nader K. 2015. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology.* 40(2):480-7.
- Ester, E.F., Sprague, T.C., Serences, J.T. 2015. Parietal and Frontal Cortex Encode Stimulus-Specific Mnemonic Representations during Visual Working Memory. *Neuron.*
- Flexner, L. B., Flexner, G. de L. H., Roberts, R. B. 1965. Loss of memory in mice as related to regional inhibition of cerebral protein synthesis. *Journal of Neurochemistry,* 12, 535–541.
- Frankland P.W. & Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci.*
- Frankland, P.W, Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., Silva, A.J. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science,* 304:881–883.

- Frank, L. M., Brown, E. N. & Wilson, M. 2000. Trajectory encoding in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuron* 27:169–178.
- Fyhn, M., Hafting, T., Treves, A. Moser, M.B., Moser, E.I. 2007. Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex. *Nature* 446, 190–194.
- 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.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.B., Moser, E.I. 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801–806.
- Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., O'Keefe, J. 2014 Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition *Phil. Trans. R. Soc.*
- Hargreaves, E.L., Rao, G., Lee, I., Knierim, J.J. 2005. Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* 308:1792–1794.
- Hardt, O., Nader, K., Nadel, L. 2013. Decay happens: the role of active forgetting in memory. *Trends Cogn Sci* 17: 111–120.
- Haubrich, J., de Freitas, C.L., Diehl, F., Santana, F., de Oliveira, L.F., de Oliveira A, L., Quillfeldt, J.A. 2016. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus* 26:924–932.
- Hebb D.O. 1949. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. 1949. New York, NY:Wiley.
- Huang, W., Zhu, P.J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., Krnjević, K., Roman, G., Costa-Mattioli, M. 2013. mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nat. Neurosci.* 16, 441–448.
- Insausti, R., Amaral, D.G., Cowan, W.M. 1987. The entorhinal cortex of the monkey. II. Cortical afferents. *J Comp Neurol* 264:356 –395.
- Izquierdo, I. A. 2011. *Memória*. Editora Artmed, 2011 (livro).
- Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:1-11.
- Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna, M.R., Coitinho, A., deDavid e Silva, Choi, H., Moletta, B., Medina, J.H., Izquierdo, I. 2002. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol* 22:269-287.
- Jacobsen, B., Nilssen, E.S., Ohara, S. 2017. Architecture of the Entorhinal Cortex: A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front. Syst. Neurosci.* 11:46.
- James, W. 1890. *The Principles of Psychology*. Henry Holt. New York, NY (livro).
- Jasnow, A.M., Lynch, J.F., III, Gilman, T.L., Riccio, D.C. 2017. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 95: 821-835.

- Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., LeDoux, J.E. 2011. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory, *Cell*, Volume 147, Issue 3.
- Kandel, E. 2013. *Principles of Neuroscience* (5th edition) (livro).
- Kandel, E.R., Dudai, Y., Mayford, M.R. 2014. *The Molecular and Systems Biology of Memory*. *Cell*.
- Keiser, A.A., Turnbull, L.M., Darian, M.A., Feldman, D.E., Song, I., Tronson, N.C. 2016. Sex Differences in Context Fear Generalization and Recruitment of Hippocampus and Amygdala during Retrieval. *Neuropsychopharmacology*.
- Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*. 17(9):697-708.
- Kesner RP, Ravindranathan A, Jackson P, Giles R, Chiba AA. 2001. A neural circuit analysis of visual recognition memory: role of perirhinal, medial, and lateral entorhinal cortex. *Learn Mem* 8:87-95.
- Kim, J.J. & Fanselow, M.S. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675–677.
- Kim J, Lee S, Park Ketal .2007. Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20955–20960.
- Kitamura, T., Sun, C. Martin, J., Kitch, L.J. Schnitzer, M.J. Tonegawa, S. 2015. Entorhinal Cortical Ocean Cells Encode Specific Contexts and Drive Context-Specific Fear Memory. *Neuron*.
- Kukushkin., N.V. & Carew, T.J. 2017. Memory Takes Time. *Neuron*.
- Lavenex, P. & Amaral, D.G. 2000. Hippocampal-Neocortical Interaction: A Hierarchy of Associativity. *Hippocampus* 10:420–430.
- Lee, I. & Lee, C. H. 2013. Contextual behavior and neural circuits. *Front. Neural Circuits* 7:84.
- Lechner, H.A., Squire L.R., Byrne J.H. 1999. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem*.
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 169–182.
- Lissek, S. 2012. Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neutrally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned overgeneralization. *Depress Anxiety* 29: 257–263.
- Lissek S., Rabin S., Heller R., Lukenbaugh D., Geraci M., Pine D.S. Grillon, C. 2010. Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *Am J Psychiatry* 167: 47–55.
- Liu P, Bilkey DK. 1999. The effect of excitotoxic lesions centered on the perirhinal cortex in two versions of the radial arm maze task. *Behav Neurosci* 113:672-682.

- Lynch, J. III; Cullen, P. K., Jasnow, A. M., Riccio, D. C. 2013. Sex Differences in the Generalization of Fear as a Function of Retention Intervals. *Learning and Memory* 20(11), 628-632.
- Lynch J. III, Winiacki P., Vanderhoof T., Riccio D.C., Jasnow A.M. 2016. Hippocampal cytosolic estrogen receptors regulate fear generalization in females. *Neurobiol Learn Mem* 130: 83–92.
- Malenka, R.C., & Bear, M.F. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21.
- McClelland, J. L., McNaughton, B. L., O'Reilly, R. C. 1995. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol. Rev.* 102, 419–457.
- McGaugh, J. L. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153(3742), 1351–8.
- McGaugh J.L. .2000. Memory--a Century of Consolidation. *Science* Vol. 287.
- Medina, J.H., Schroder, N., Izquierdo, I. 1999. Two different properties of short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:119-121.
- Migues PV, Liu L, Archbold GE, Einarsson EÖ, Wong J, Bonasia K, Ko SH, Wang YT, Hardt O. 2016. Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *J Neurosci.* 36(12):3481-94.
- Milner, B. 1962. Les troubles de la memoire accompagnant des lesions hippocampiques bilaterales. *Physiologie de l'Hippocampe*, ed Passouant P, pp 257–272. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), apud. Josselyn, S.A., Köhler, S. Frankland, P.W. 2017. Heroes of the Engram. *The Journal of Neuroscience*, 37(18):4647– 4657.
- Monfils M.H., Cowansage, K.K., Klann E., LeDoux J.E. 2009. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. *Science*.
- Mullally, S. L. & Maguire, E. A. 2014. Memory, Imagination, and Predicting the Future: A Common Brain Mechanism? *The Neuroscientist*, 20(3), 220–234.
- Nadel L. & Moscovitch M. 1997. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7:217-227.
- Nader, K., Schafe, G., LeDoux, J. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726.
- Ögmen, H. & Herzog, M.H. 2016. A New Conceptualization of Human Visual Sensory-Memory. *Front Psychol.*, 7: 830.
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171–175.
- Pavlov I. 1927. *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological processes of the cerebral cortex*. London: Oxford University Press. (livro).

- Paxinos, G. & Watson, C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*, Elsevier Acad. Press. (livro).
- 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*.
- 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*.
- Perkins, C.C. Jr. & Weyant, R.G. 1958. The interval between training and test trials as a determiner of the slope of generalization gradients. *J Comp Physiol Psychol* 51:596–600.
- Polti, I., Martin, B., van Wassenhove, V. 2018. The effect of attention and working memory on the estimation of elapsed time. *Sci Rep* 8, 6690.
- Quillfeldt, J.A. 2006. Behavioral methods to study learning and memory in rats. *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*, 271-311. (livro).
- Quillfeldt, J.A. 2019. Temporal Flexibility of Systems Consolidation and the Synaptic Occupancy/Reset Theory (SORT): Cues About the Nature of the Engram. *Front. Synaptic Neurosci.* 11:1.
- Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Schmitz, P.K., Quevedo, J., Schaeffer, E., de Lima, J. B., Medina, J.H., Izquierdo, I. 1996. Different Brain Areas Are Involved in Memory Expression at Different Times from Training. *Neurobiology of Learning and Memory* 66, 97–101.
- Ramón Y Cajal, S. 1902. Sobre un ganglio especial de la corteza eseno-occipital. *Trab. del Lab. de Invest. Biol. Univ. Madrid* 1, 189–206. apud. Witter, M.P., Doan, T.P., Jacobsen, B., Nilssen, E.S., Ohara, S. 2017. Architecture of the Entorhinal Cortex: A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front. Syst. Neurosci.* 11:46.
- Ribot, T. 1882. *Diseases of the Memory: An Essay in the Positive Psychology*. New York, NY: D. Appleton and Company. Da Internet Archive: <https://archive.org/stream/diseasesofmemory00ribouoft#page>
- Riccio DC, Ackil J, Burch-Vernon A. 1992. Forgetting of stimulus attributes: methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychol Bull* 112:433–445.
- Rolls, E.T. 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.*
- Scaplen, K.M., Ramesh, R.N., Nadvar, N., Ahmed, O.J., Burwell, R.D. 2017. Inactivation of the Lateral Entorhinal Area Increases the Influence of Visual Cues on Hippocampal Place Cell Activity. *Front. Syst. Neurosci.* 11:40.
- Sekeres, M. J., Winocur, G., Moscovitch, M. 2018. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. *Neurosci. Lett.* 680,39–53.

- Sekeres, M.J., Moscovitch, M., Grady, C.L., Sullen, D.G., Winocur, G. 2020. Reminders reinstate context-specificity to generalized remote memories in rats: relation to activity in the hippocampus and aCC. *Learn. Mem.* 27: 1-5.
- Shimamura, A.P. 2010. Hierarchical Relational Binding in the Medial Temporal Lobe: The Strong Get Stronger. *Hippocampus* 20:1206–1216.
- Sotocinal, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., Tuttle, A.H., Martin, L.J., Wieskopf, J.S., Mapplebeck, J.C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J.J., King, O.D., Mogil, J.S. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 29;7:55.
- Squire, L. R. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82, 171–177.
- Squire, L. R. & Alvarez, P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 169–177.
- Squire, L.R. & Zola, S.M. 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (24) 13515-13522.
- Sternberg, R. J. 2000. *Psicologia Cognitiva*. Porto Alegre: Artes Médicas. (livro).
- Suddendorf, T. 2006. Foresight and evolution of the human mind. *Science* 312:1006–7.
- Suddendorf, T & Corballis, MC. 2007. The evolution of foresight: what is mental time travel, and is it unique to humans? *Behav Brain Sci* 30:299–313.
- Sutherland, R.J., Sparks, F.T., Lehmann, H. 2010. Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: a modest proposal for the situation of systems consolidation. *Neuropsychologia*;48(8):2357-2369.
- Suzuki, W.A., Amaral, D.G. 1994. Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices *J. Neurosci.*, 14:1856-1877
- Suzuki, W. A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A. J., Kida, S. 2004. Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *Journal of Neuroscience* 24 (20), 4787-4795.
- Takehara-Nishiuchi K. 2014. Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neurosci Res.* 2014;84:27-33.
- Takehara-Nishiuchi K, Maal-Bared G, Morrissey MD. 2012. Increased Entorhinal-Prefrontal Theta Synchronization Parallels Decreased Entorhinal-Hippocampal Theta Synchronization during Learning and Consolidation of Associative Memory. *Front Behav Neurosci.* 5;5:90.
- Takehara-Nishiuchi, K. & McNaughton, B. L. 2008. Spontaneous changes of neocortical code for associative memory during consolidation. *Science* 322, 960–963.

- Tanninen, S.E., Morrissey, M.D., Takehara-Nishiuchi, K. 2013. Unilateral Lateral Entorhinal Inactivation Impairs Memory Expression in Trace Eyeblink Conditioning. *PLoS ONE* 8(12): e84543.
- Thaut, M. H. 2014. Musical echoic memory training (MEM). In Thaut, M.H. & Hoemberg, V. (Eds.), *Handbook of neurologic music therapy* (p. 311–313). Oxford University Press. (livro).
- Tyler, T.J. & Rudy, J.W. 2007. The hippocampal indexing theory and episodic memory: updating the index. *Hippocampus* 17: 1158–1169.
- Van Hoesen, G. & Pandya, D.N. 1975. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. I. Temporal lobe afferents. *Brain Res* 95:1-24.
- Van Hoesen, G., Pandya, D.N., Butters, N. 1975. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. II. Frontal lobe afferents. *Brain Res* 95:25-38.
- Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Walz, R., Medina, J.H., Izquierdo, I. 2000. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An Acad Bras Cienc* 72:353-364.
- Wickelgren, W.A. & Berian, K.M. 1971. Dual trace theory and the consolidation of long-term memory, *Journal of Mathematical Psychology*, Volume 8, Issue 3, 1971, Pages 404-41.
- Wilson, D.I., Langston, R.F., Schlesiger, M.I., Wagner, M., Watanabe, S., Ainge, J.A. 2013. Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus* 23:352-366.
- Wiltgen, B.J. & Silva, A.J. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14:313–317.
- Wiltgen, B.J., Zhou, M., Cai, Y., Balaji, J., Karlsson, M.G., Parivash, S.N., Li, W., Silva, A.J. 2010. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *20:1336–1344*.
- Winocur, G., Moscovitch, M., Bontempi, B. 2010. Memory formation and long-term retention in humans and animals: convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48, 2339–2356.
- Witter, M.P., Doan, T.P., Jacobsen, B., Nilssen, E.S., Ohara, S. 2017. Architecture of the Entorhinal Cortex: A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front. Syst. Neurosci.* 11:46.
- Witter, M.P., Wouterlood, F.G., Naber, P.A., van Haeften, T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911:1-24.
- Yates, F. 2011. *The Art of Memory*. Ed. Random House, 2011 (livro).
- Yoganasimha, D., Rao, G., Knierim, J.J. 2011. Lateral entorhinal neurons are not spatially selective in cue-rich environments. *Hippocampus* 21:1363–1374.

9. Apêndice

9.1 Gráficos dos retestes

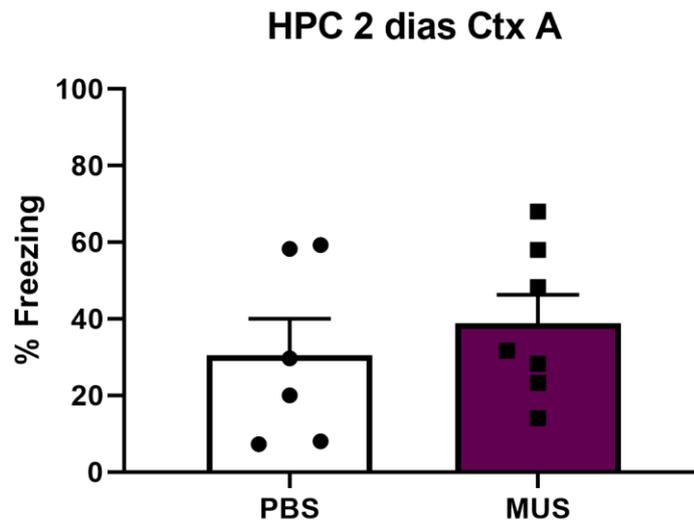


Figura 1. Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 2 dias após o treino no Contexto A.

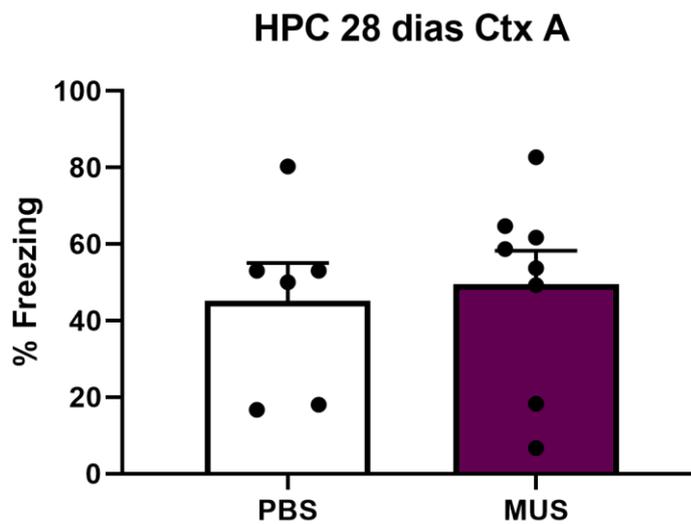


Figura 2. Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 28 dias após o treino no Contexto A.

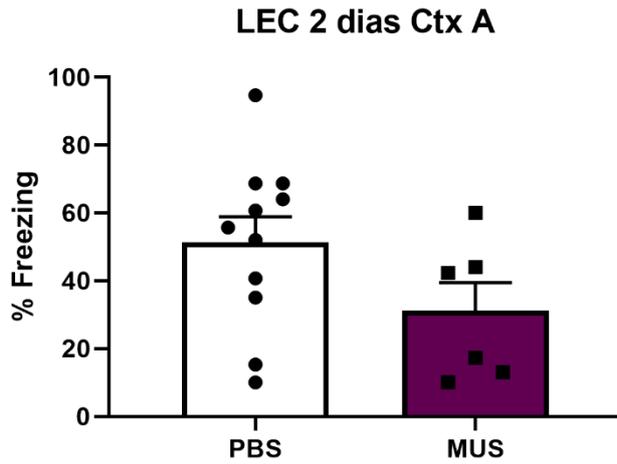


Figura 3. Infusão de PBS ou muscimol no LEC 2 dias após o treino no Contexto A.

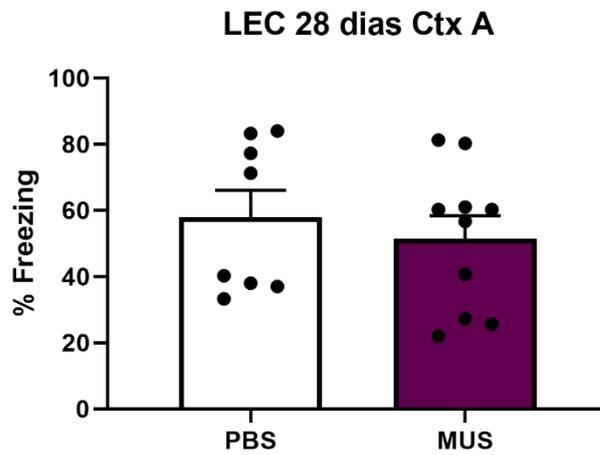


Figura 4. Infusão de PBS ou muscimol no LEC 28 dias após o treino no Contexto A.

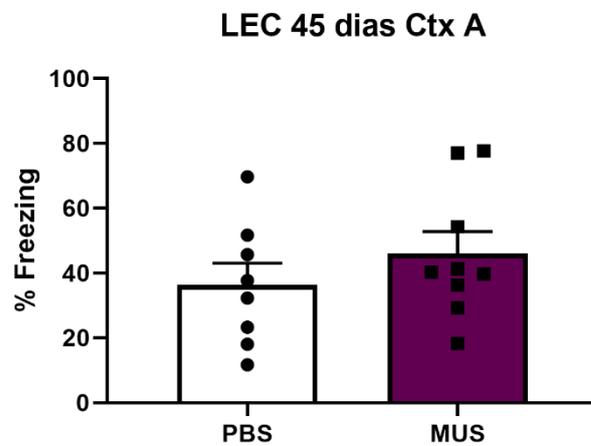


Figura 5. Infusão de PBS ou muscimol no LEC 45 dias após o treino no Contexto A.

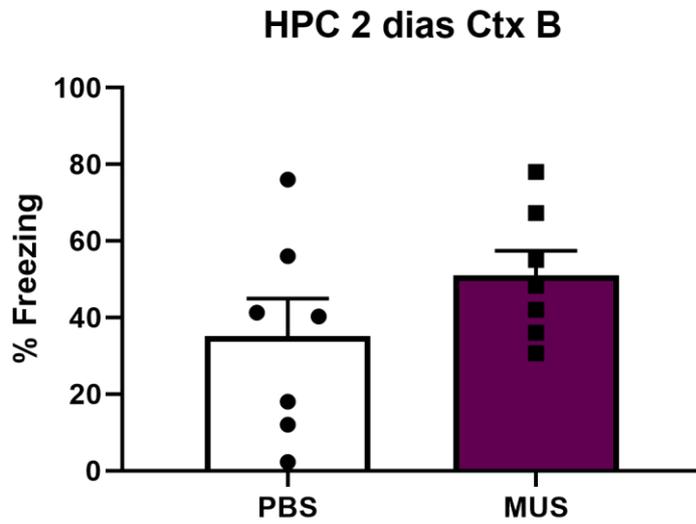


Figura 6. Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 2 dias após o treino no Contexto B.

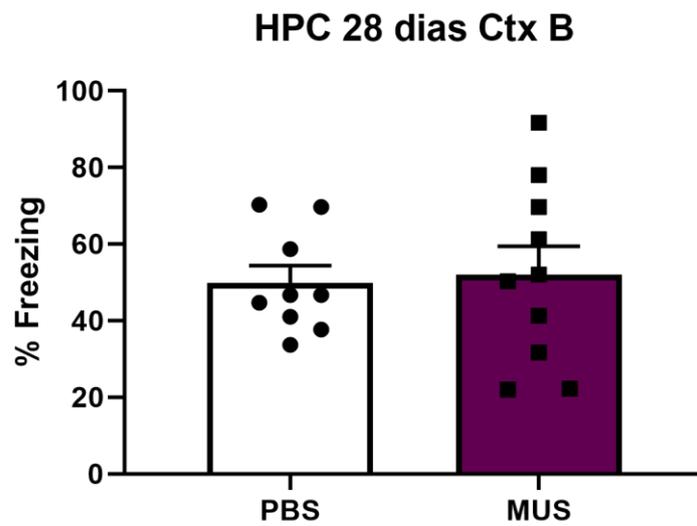


Figura 7. Infusão de PBS ou muscimol no dHPC 28 dias após o treino no Contexto B.

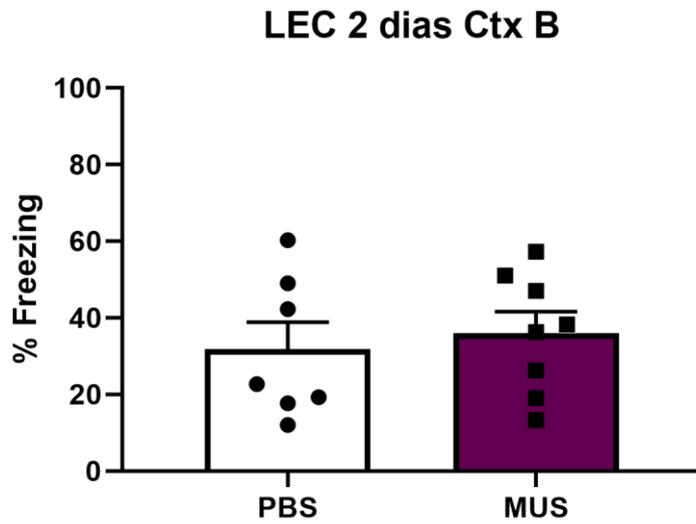


Figura 8. Infusão de PBS ou muscimol no LEC 2 dias após o treino no Contexto B.

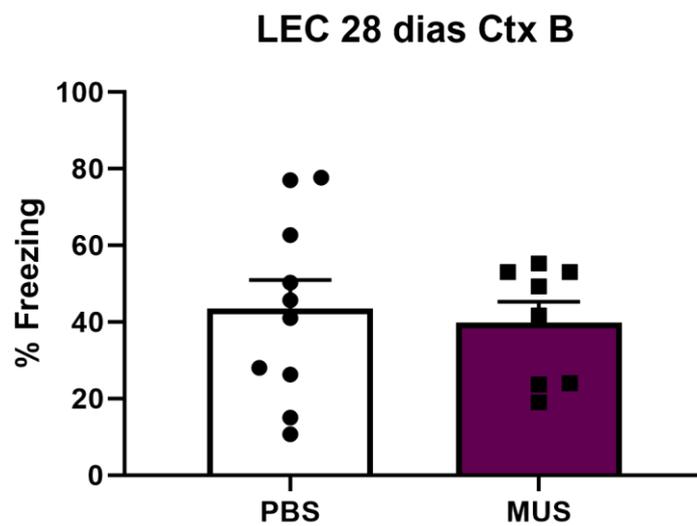


Figura 9. Infusão de PBS ou muscimol no LEC 28 dias após o treino no Contexto B.

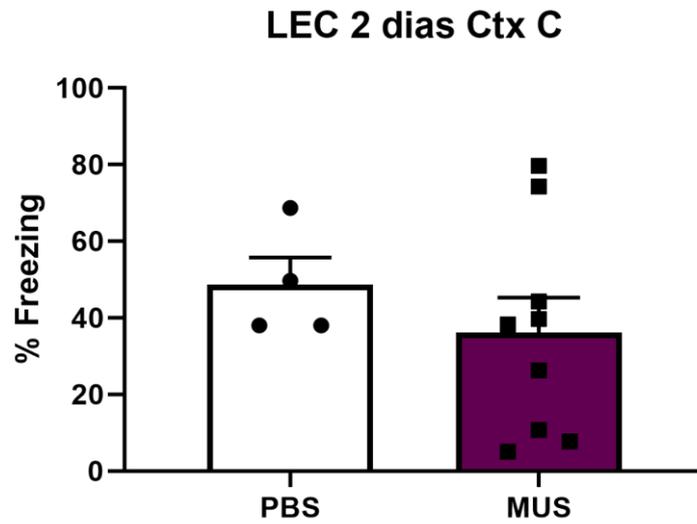


Figura 10. Infusão de PBS ou muscimol no LEC 2 dias após o treino no Contexto C. Não foi possível completar o grupo PBS por questões técnicas no dia do experimento (falta de energia elétrica).

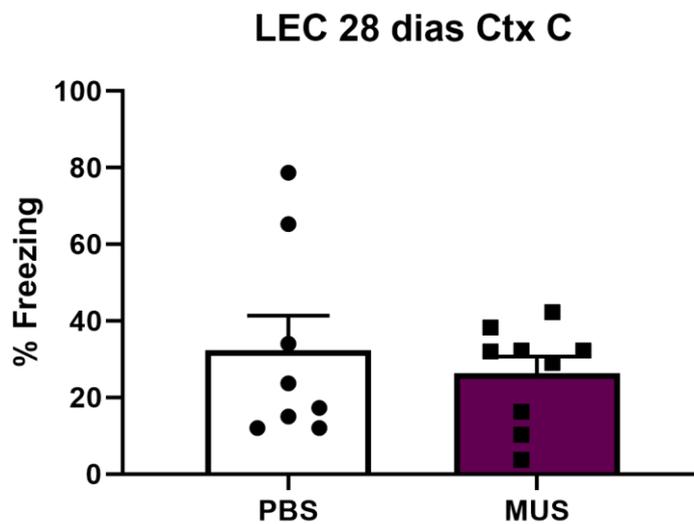


Figura 11. Infusão de PBS ou muscimol no LEC 28 dias após o treino no Contexto C.

9.3 Esquemas representativos das histologias

Figure 48

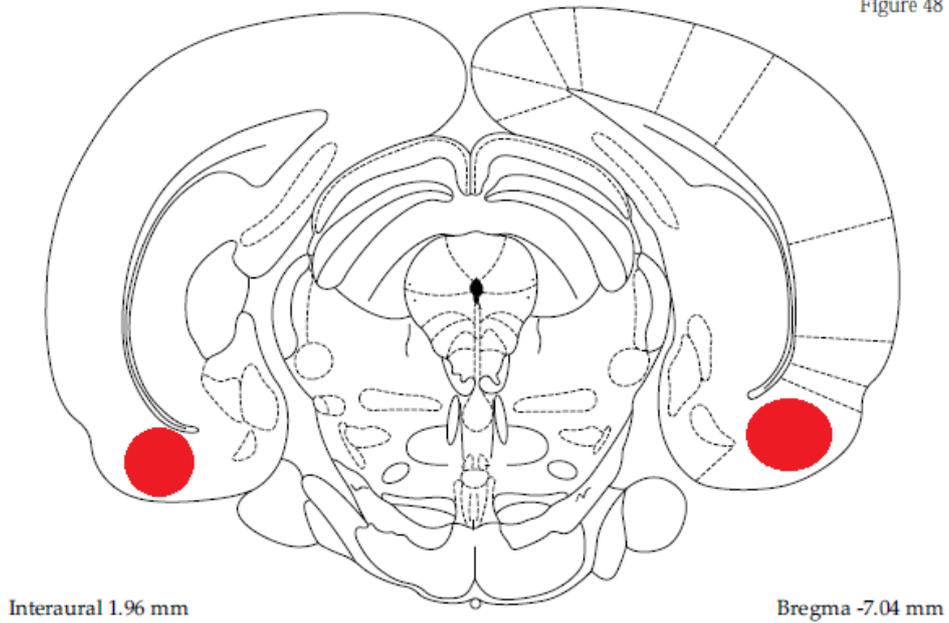


Figura 14. Esquema representativo do local de infusão de PBS ou muscimol no LEC.

Figure 35

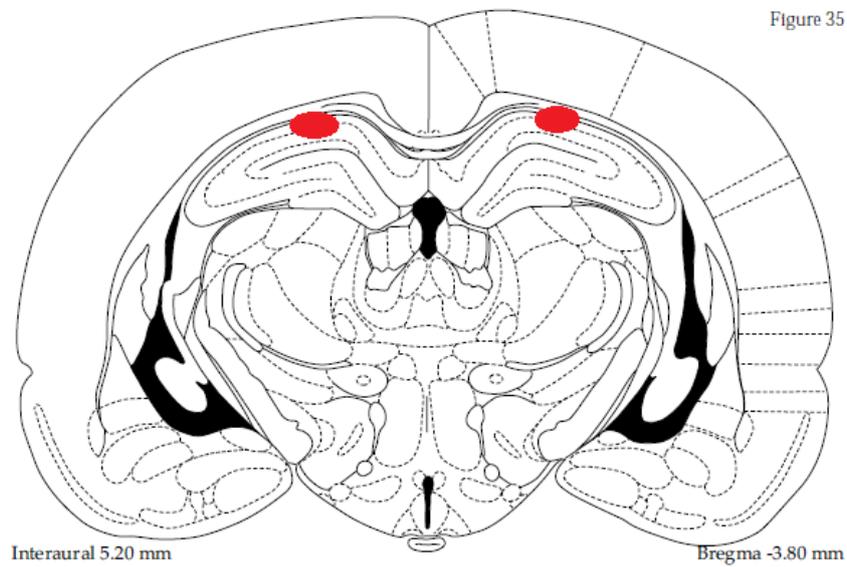


Figura 15. Esquema representativo do local de infusão de PBS ou muscimol no dHPC.