

Título: A atividade do Córtex Cingulado Anterior é recuperada por mecanismos de reconsolidação após sua inibição antes do treino promovendo a expressão de memórias remotas aversivas

Título abreviado: Recuperando memórias remotas por meio de reconsolidação

Nome dos Autores: Roberto E. Fonseca¹, Rodrigo O. Sierra^{1,3}, Lizeth K. Pedraza^{2,3}, Fabiana Santana^{1,3}, Flávia Z. Boos^{1,3}, Ana P. Crestani^{1,3}, Josué Haubrish^{1,3}, Lucas de Oliveira Alvares^{2,3} and Jorge A. Quillfeldt^{1,3}

Filiação institucional: Laboratório de Neurobiologia da Memória¹ e Laboratório de Neurobiologia da Memória², Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, 91.501-970, e ³Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 90.046-900, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

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

Numero de Palavras: Resumo (212), Introdução (699), Resultados (1201), Discussão (1101).

Numero de Figuras: 3

Formatação: Artigo a ser submetido na forma de “brief communication” na revista “Journal of Neuroscience”.

Objetivos Gerais

Avaliar o papel do Córtex Cingulado Anterior (ACC) durante o treino do condicionamento aversivo ao contexto (CAC) na futura expressão da memória recente e remota.

Objetivos específicos

- 1- Avaliar se inibição do ACC antes do treino no CAC prejudica a expressão da memória remota (**Figura 1a**);
- 2- Avaliar se inibição do ACC antes do treino no CAC prejudica a expressão da memória recente (**Figura 1b**);
- 3- Avaliar se a reativação da memória pode influenciar o efeito da inibição do ACC na expressão da memória remota (**Figura 1b**);

- 4- Se a reativação da memória influencia o efeito da inibição do ACC na expressão da memória remota: Avaliar se dito fenômeno pode estar mediado por mecanismos de reconsolidação (**Figura 2**);

- 5- Avaliar o papel da atividade do ACC durante a reativação da memória após sua inibição durante o treino no CAC (**Figura 3**).

Resumo

A consolidação sistêmica é um processo de reorganização dependente do tempo envolvendo redes corticais e do hipocampo que suportam a recuperação da memória. Os eventos de aprendizagem desencadeiam alterações celulares em áreas do hipocampo e do córtex, resultando em armazenamento simultâneo de memórias de longa duração. No entanto, o papel da atividade cortical durante a aquisição na estabilidade de memórias remotas é pouco compreendido. Neste trabalho usamos inibição temporal do córtex cingulado anterior durante a aquisição do condicionamento aversivo ao contexto a fim de avaliar o papel da atividade cortical precoce na estabilidade de memórias remotas. Nossos resultados mostram que a inibição transitória do córtex cingulado anterior antes do treino do condicionamento aversivo ao contexto prejudica a expressão da memória remota; no entanto, este efeito foi prevenido por uma única sessão reativação. O efeito da reativação promovendo a formação da memória remota depende de mecanismos de reconsolidação. Durante a reativação, a atividade do córtex cingulado anterior é necessária a fim de resgatar a expressão da memória remota, que de outra forma, não se expressa corretamente. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a reconsolidação da memória induz modificações plásticas ao longo das conexões entre hipocampo e córtex que favorecem o curso normal da consolidação sistêmica e a persistência de memórias emocionais relevantes.

Introdução

O processo pelo qual as memórias se tornam independente do hipocampo e são armazenadas no neocórtex é chamado de consolidação sistêmica. De acordo com esta reorganização dependente do tempo, memórias inicialmente requerem estruturas do lobo temporal medial para a aquisição e recuperação de novas memórias declarativas. Subsequentemente, estas estruturas não são mais envolvidas na recuperação de memórias remotas (Markowitschet al., 1993, Teng e Squire, 1999).

Em animais treinados em uma tarefa de aprendizagem espacial dependente do hipocampo, que tiveram a sua atividade cerebral monitorizada utilizando (14C) a 2-desoxiglucose, foi mostrado que as memórias espaciais recentes produziram uma ativação mais robusta do hipocampo que as memórias remotas. Em contraste, várias áreas diferentes do córtex pré-frontal medial, incluindo o córtex cingulado anterior (ACC), mostraram o padrão oposto com mais ativação durante a recuperação de memórias remotas (Bontempiet al., 1999). De acordo com essas evidências, memórias recentes podem ser prejudicadas por tratamentos intrahipocampais enquanto memórias remotas são resistentes a estas manipulações (Beemanet al, 2013;. Kitamura e Inokuchi, 2014; Raybuck e Lattal, 2014).

Tomando em consideração que a consolidação sistêmica da memória enfatiza no fortalecimento gradual de conexões córtico-corticais e a eventual independência das redes do hipocampo para a recuperação da memória remota, o papel das estruturas corticais durante a aquisição e recuperação de memórias recentes é mal compreendida. Einarsson et al., (2012), utilizando o condicionamento aversivo ao contexto (CAC) em ratos, demonstraram que a infusão de antagonistas da subunidade NR2B do receptor de NMDA

Ro25-6981 e o inibidor de síntese de proteínas anisomicina antes ou imediatamente após o treino no ACC prejudicam a consolidação e reconsolidação da memória recente e remota. Este resultado sugere que o ACC participa de circuitos de apoio à aquisição e consolidação inicial de memórias de medo contextual. Uma questão importante surge a partir desta abordagem metodológica: qual pode ser o efeito da inibição farmacológica do ACC neste ponto inicial da consolidação da memória na estabilidade da memória remota?

Lesburgueres et al., (2011), utilizando um paradigma de transmissão social de preferência em ratos, mostraram que as estruturas corticais associadas à recuperação da memória remota devem ser submetidas a um processo de "marcação" no ponto inicial de consolidação da memória em que mecanismos de plasticidade dependentes hipocampo direcionam o armazenamento de memória remota em estruturas corticais. A infusão do antagonista do receptor de AMPA CNQX ou o antagonista do receptor de NMDA AP-5 no córtex orbitrofrontal antes do treino de transmissão social prejudica a recuperação da memória remota.

Como memórias biologicamente importantes podem ser perdidas pela manipulação do córtex durante o treino? Existe algum mecanismo para preservar as ditas memórias quando a marcação cortical é inibida? Prévios estudos do nosso laboratório têm mostrado que a reativação/evocação da memória pode mantê-la detalhada e dependente do hipocampo (de Oliveira Alvares et al., 2012). Outros autores sugerem que esse processo de reativação estaria associado com manter a relevância da memória, isto é, informações que são constantemente evocadas podem ser mais importantes que aquelas que não (Lee, 2009). Sob algumas condições, a evocação pode torna a memória lábil e susceptível a interferências farmacológicas e comportamentais. Em efeito, existem evidencias que após a

evocação a memória, é necessário um processo de estabilização dependente de síntese de proteínas para que a memória consiga persistir.

Poderia o processo de reativação/evocação influenciar o armazenamento da memória após a inibição cortical durante o aprendizado? Para tratar esta questão, foi utilizado um paradigma de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) em ratos e inibição temporal do ACC antes do treino para avaliar o efeito deste tratamento na expressão da memória remota em animais reativados e não reativados. Descobrimos que a inibição da ACC antes do treino de condicionamento aversivo ao contexto prejudica a expressão da memória recente e remota. No entanto, este efeito de perda de memória foi impedido por uma única reativação 2 dias após o treino. Estes resultados sugerem que a reativação pode resgatar a expressão da memória após a inibição do ACC. Para finalizar foi verificado que a atividade do ACC é necessária durante a reativação para o resgate da memória remota. Propomos um modelo de recuperação da marcação cortical por meio da reativação da memória e discutimos dito processo como um mecanismo para a manutenção de memórias biologicamente relevantes.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (270-320 g) do nosso ratário. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, quatro a cinco por gaiola, sob um ciclo luz / escuro de 12 h e a uma temperatura constante de 24 ° C, com água e alimento ad libitum antes do

início dos protocolos experimentais. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com (Lei Federal nº 11.794 / 2008) diretrizes locais e nacionais para o cuidado dos animais e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cirurgia estereotáxica e colocação de cânulas

Os ratos foram profundamente anestesiados com uma injeção i.p. de cetamina / xilazina (75 e 10 mg / kg, respectivamente) e foram colocadas duas cânulas nas coordenadas AP +0,27 mm (a partir do bregma), LL \pm 0,05 mm, DV - 0-16 acima do córtex cingulado anterior (Paxinos e Watson, 1998). Depois de uma recuperação de 1 semana da cirurgia, os animais foram submetidos aos procedimentos comportamentais. Após os experimentos comportamentais, os indivíduos foram sacrificados e seus cérebros dissecados e preservados em formol a 10% para verificar a posição da cânula. Apenas os animais com posicionamentos das cânulas corretas foram incluídos na análise estatística.

Drogas

Muscimol (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a uma concentração de 1ug / ul e infundida no ACC num volume de 0.5 μ l. A lidocaína (2%) foi dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e infundida num volume de 0.5 μ l.

Infusão intracerebral

Foi utilizado no processo de infusão uma agulha de calibre 30, que foi inserida dentro das cânulas, com a ponta saliente 1.0 mm para atingir o ACC. Um volume de 0,5 ul foi infundido bilateralmente a uma velocidade lenta (20 mL / h) e a agulha foi removida somente depois de esperar mais 30 segundos adicionais após a infusão.

Procedimento comportamental

Condicionamento aversivo ao contexto (CAC): A câmara de condicionamento consistiu de uma caixa de acrílico iluminado, 25x25 cm, com um piso metálico grade. Durante o treino, os ratos foram colocados na câmara durante 3 min, seguidos de 2 choques nas patas (0,7 mA; 2 s), passados 30s novamente 2 choques foram administrados e 60 segundos depois do último choque foram devolvidos às suas moradias. Dependendo da experiência realizada, a infusão intracerebral de muscimol ou lidocaína no ACC foi realizada 15min antes da sessão de treino.

Sessão de reativação: Os indivíduos foram expostos novamente ao contexto 2 dias após o treinamento sem choques nas patas durante 240 segundos para induzir a recuperação da memória. Dependendo da experiência realizada, a infusão intracerebral de muscimol ou lidocaína no ACC foi realizada 15min antes da sessão de reativação.

Sessão Teste de Memória remota: Os animais foram testados durante 4 min 40 dias após o treino no contexto original em uma condição livre de drogas.

Análise estatística

Comparações entre ou dentro dos grupos foram realizadas com ANOVA fatorial (aqui denominado análise de variância com medidas repetidas), seguido pelo teste de Fisher como post-hoc. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$.

Resultados

A reativação resgata a memória remota em animais com inibição do ACC antes do treino

Primeiramente foi avaliado o efeito da inibição do ACC antes do treino no CAC na expressão da memória remota aversiva. Os ratos foram submetidos a treino no CAC com infusão de muscimol ou veículo intra-ACC e testados 40 dias mais tarde. Animais tratados com muscimol mostraram níveis de congelamento menores quando comparados com o grupo controle ($t(15) = 2,324$; $p = 0,034$, teste t independente) (Fig. 1a). Atividade do ACC durante o treinamento do CAC parece ser necessária para a expressão de memória remota.

A fim de avaliar o efeito da inibição com muscimol do ACC na memória recente e os possíveis efeitos da reativação no tratamento, os animais foram testados 2 e 40 dias após o treino no CAC. ANOVA para medidas repetidas revelou efeitos significativos do fator grupo ($F_{1,18} = 9,465$, $p = 0,006$), mas não para o fator tempo ($F_{1,18} = 2,605$, $p = 0,123$) e interação entre fator grupo x tempo ($F_{1,18} = 2,073$, $p = 0,167$). A análise post-hoc mostrou

que os animais tratados com muscimol expressaram níveis de congelamento menores quando comparado ao grupo controle durante o teste 2 dias após o treino (reativação) ($p < 0,01$), porém não foram encontradas diferenças significativas durante o teste no dia 40. Além disso, o grupo controle expressa níveis mais baixos de congelamento durante os testes no dia 40 em comparação com o teste 2 dias após o treino (reativação) ($p < 0,05$) (Figura 1b). Estes resultados confirmam descobertas anteriores de Einarsson et al., (2012) sobre o papel crítico do ACC na consolidação de memórias aversivas ao contexto. Curiosamente, a reativação da memória 2 dias após o treino promove a expressão da memória remota em animais com inibição do ACC.

Tomados em conjunto, estes resultados mostraram que a aquisição da informação no CAC depende da integridade funcional do CCA, mostrando-se crucial para a posterior expressão da memória recente e remota. Além disso, mostramos que a memória remota pode ser resgatada por uma única sessão de reativação. Nossa hipótese é que a inibição do ACC pode prejudicar mecanismos de plasticidade associados com o estabelecimento de sistemas de comunicação entre o hipocampo e o córtex que direcionam o processo da consolidação sistêmica da memória.

O efeito do resgate da reativação é mediado por mecanismos de reconsolidação

O resgate da memória remota pela reativação pode estar associado com o simples fato de a memória ser evocada, independentemente de processos de reconsolidação. A reconsolidação de memória tem sido proposta como um mecanismo que permite o fortalecimento (Lee, 2008) e atualização do conteúdo da memória (Hupbach et al, 2008;..

Haubrich et al, 2015). Experimentos anteriores de nosso laboratório demonstraram que a sessão de reativação usada neste protocolo, é capaz de induzir labilidade do traço da memória, tornando-a suscetível a modificações e interrupção farmacológica via reconsolidação (de Oliveira Alvares et al., 2008). Se o efeito promotor de reativação da memória depende de reconsolidação, a inibição do processo de labilização, um passo necessário para a reconsolidação de memória, poderia então impedir o resgate da memória remota. Os animais foram infundidos com muscimol, tal como descrito acima, no entanto, 30 minutos antes da reativação da memória, os ratos foram administrados com nimodipina, um antagonista de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (LVGCCs). Prévios experimentos demonstraram que nimodipina impede a labilização / reconsolidação, mas não interfere com os processos de aquisição, consolidação ou evocação da memória (Suzuki et al., 2008).

ANOVA para medidas repetidas revelou efeitos significativos do fator tratamento pré-treino ($F_{1,44} = 12,617$, $p = 0,000$), mas não para o fator de tratamento pré-reativação ($F_{1,44} = 2,814$, $p = 0,100$), interação entre pré-treino x pré-reativação ($F_{1,44} = 0,971$, $p = 0,329$), o fator tempo ($F_{1,44} = 1,045$, $p = 0,312$), interação pré-treino x tempo ($F_{1,44} = 0,072$, $p = 0,789$), interação pré-reativação x tempo ($F_{1,44} = 3,186$, $p = 0,081$) e interação pré-treino x pré-reativação x tempo ($F_{1,44} = 2,563$, $p = 0,116$). Durante a sessão de reativação, a análise post-hoc mostrou que os animais tratados com muscimol antes do treino expressam menos congelamento que os grupos controle ($p < 0,05$) este efeito do tratamento pré-treino foi independente do tratamento pré-reativação. Durante o teste no dia 40, os animais com muscimol pré-treino e nimodipine pré-reativação expressaram níveis de congelamento menores quando comparados com todos os grupos ($p < 0,05$). Além disso, os animais com

muscimol pré-treino e nimodipina pré-reativação expressaram menos congelamento durante o teste no dia 40 quando comparados com a reativação ($p < 0,05$) (Figura 2). Os nossos resultados sugerem que o efeito da reativação sobre a expressão da memória remota é dependente de processos de labilização/reconsolidação da memória. Esta é a primeira evidência mostrando que a reconsolidação promove a formação da memória remota após a inibição cortical durante o aprendizado.

O Córtex Cingulado anterior é ativado durante a reativação a fim de resgatar a memória remota

A expressão da memória remota em animais reativados poderia ser produto da recuperação da atividade do ACC durante a reativação. Se a atividade ACC é crucial durante a reativação da memória, a dupla inibição da ACC antes do treino e antes da reativação afetaria a formação da memória remota. Para testar esta hipótese, os animais foram treinados como descrito acima, no entanto, o ACC foi inibido 15 minutos antes do treino e novamente 15 min antes da reativação. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram o estabelecimento do fenômeno de dependência de estado por influência de diferentes estados neuro-humorais induzidas durante o treinamento e reativação no CAC (Sierra et al., 2013). Para evitar esta possibilidade, o muscimol foi administrado antes do treino e lidocaína (que produz uma diminuição da atividade neuronal parecida ao muscimol por mecanismos diferentes) antes de reativação. ANOVA para medidas repetidas revelou efeitos significativos do fator tratamento pré-treino ($F_{1,26} = 13,849$, $p = 0,000$), interação entre tratamento pré-reativação x tempo ($F_{1,26} = 5,995$, $p = 0,021$) e a interação entre

tratamento pré-treino x pré-reativação x tempo ($F_{1,26} = 9,926$, $p = 0,004$), mas não para o fator tratamento pré-reativação ($F_{1,26} = 2,738$, $p = 0,110$), interação entre tratamento pré-treino x pré-reativação ($F_{1,26} = 1.203$, $p = 0,282$) e o fator tempo ($F_{1,26} = 1,279$, $p = 0,268$). Durante a sessão de reativação, a análise post-hoc mostrou que os animais tratados com muscimol antes do treino expressam menos congelamento que os grupos controle ($p < 0,05$) este efeito do tratamento pré-treino foi independente do tratamento pré-reativação. Durante o teste no dia 40, os animais com muscimol pré-treino e lidocaína pré-reativação expressaram níveis de congelamento menores quando comparado com todos os grupos ($p < 0,05$). Além disso, os animais com muscimol pré-treino e veículo pré-reativação expressaram menos congelamento durante a sessão de reativação que durante o teste no dia 40 ($p < 0,05$). Por outro lado, os animais tratados com muscimol pré-treino e lidocaína pré-reativação expressaram níveis mais baixos de congelamento durante o teste no dia 40 do que durante a sessão de reativação ($p < 0,05$) (Figura 3). Estes resultados confirmam a nossa hipótese inicial sobre a recuperação da atividade cortical durante a reativação, especificamente do ACC, promovendo a expressão memória remota.

Discussão

Nossos resultados mostraram que a inibição transitória do ACC antes do condicionamento aversivo ao contexto prejudica a expressão da memória remota (Fig 1a). Este efeito foi revertido por uma sessão de reativação (Fig 1b). Dito efeito de recuperação pode ser inibido pela administração sistêmica de nimodipina antes da reativação, sugerindo um fenômeno dependente de mecanismos de reconsolidação (Figura 2). Durante a reativação, o ACC

entra em atividade novamente a fim de promover a expressão da memória remota (Figura 3). Tomados em conjunto, os nossos resultados indicam que a reconsolidação promove a persistência da memória remota após a inibição cortical antes do aprendizado, mostrando um possível mecanismo para a manutenção de memórias emocionais relevantes.

Dash et al., (2004) sugerem que os eventos de aprendizagem desencadeiam alterações genômicas simultâneas em neurônios do hipocampo e áreas neocorticais resultando no desenvolvimento de múltiplos traços de memória. Em efeito, o condicionamento aversivo ao contexto gera um aumento imediato de atividade da Erk (que por sua vez promove a fosforilação de fatores de transcrição, incluindo o elemento de resposta ao cAMP -CREB-) no córtex pré-frontal medial e no hipocampo 1 h depois do treino. Inibição da Erk em ambas as estruturas, córtex pré-frontal e hipocampo, prejudicam a memória de longa duração para esta tarefa (Runyan et al., 2004). Após a formação de uma tarefa de transmissão social de preferência, o bloqueio da proteína cinase extracelular ativada por mitogênio (MAPK / ERK) no córtex orbitofrontal prejudica a formação da memória remota (Lesburgueres et al., 2011). Recentemente, Beroet et al., (2014) mostraram que a codificação da memória desencadeia um programa transicional associado com plasticidade sináptica que aumenta significativamente o tamanho das zonas ativas, densidades pós-sinápticas e o número de vesículas ancoradas dentro de sinapses individuais do córtex pré-frontal medial. Estes estudos, assim como o presente, apoiam a visão que mecanismos de plasticidade simultâneos são necessários no hipocampo e estruturas corticais para promover a formação da memória recente e remota. Atividade do ACC durante o aprendizado poderia agir como o andaime para direcionar a progressiva consolidação sistêmica entre o hipocampo e estruturas do córtex.

É bem importante salientar que em comparação com os resultados obtidos por Lesburgueres et al., (2011), a perda da memória remota após a inibição do ACC não foi tão robusta quanto a verificada na tarefa de transmissão social de preferência. Em efeito, nossos resultados mostraram que mesmo sendo significativo o déficit no dia 40, os animais tratados com muscimol, sem reativação, mantêm uma porcentagem elevada de congelamento (entre 20 e 30%) o que pode indicar que outras estruturas corticais ou mesmo o hipocampo podem dar conta da evocação parcial da memória, esta interpretação esta de acordo como a hipótese de “Múltiplos Traços” da consolidação sistêmica. Nadel e Moscovitch (1997) propõem que a formação e reativação da memória podem gerar múltiplas cópias do traço mnemônico, desde esta perspectiva, tratamentos locais ou sistêmicos que tem por objetivo prejudicar a memória por meio da consolidação ou reconsolidação, poderiam interferir em só uma parte desses traços, deixando outros com a capacidade de ser ativados para permitir a evocação da informação. Independente do marco teórico escolhido para a interpretação da memória remanescente no dia 40, nossa intervenção precoce na atividade cortical prejudica a expressão da memória remota, no entanto o efeito não pode ser interpretado como uma perda total ou esquecimento.

Nossos resultados replicam achados de Einasson et al., (2012) mostrando que a infusão do inibidor de síntese de proteínas anisomicina no ACC depois do treino no condicionamento aversivo ao contexto prejudica a consolidação da memória e posteriormente a expressão da memória recente. Com os resultados aqui obtidos e junto com as evidencias na literatura é possível sugerir que a consolidação sináptica da memória ocorre em diferentes circuitos ao longo das conexões entre hipocampo e córtex, interferir na função desses circuitos antes ou depois do treino ou durante a reconsolidação podem prejudicar a memória recente e remota,

mesmo com o hipocampo funcionando normalmente, área que já foi mostrada como essencial para a consolidação inicial da memória (Moscovitch and Nadel, 1998; Lee and Hynds, 2013). Circuitos corticais e provavelmente também estruturas intermediárias que mediam a comunicação entre hipocampo e córtex podem entrar no processo de marcação sugerido por Lesburgueres et al., (2011), marcação esta que foi mostrada como mudanças na transcrição gênica e morfologia de sinapses de estruturas neocorticais, no entanto, em nossos experimentos não foi testada essa possibilidade o que limita nossas conclusões ao papel da atividade do ACC sem aprofundar em aquilo que representaria dita atividade. Próximos experimentos poderiam ser direcionados para estabelecer as mudanças moleculares e estruturais produto do condicionamento aversivo ao contexto no ACC.

Em prévios experimentos de nosso laboratório, fornecemos evidências que a reconsolidação desempenha um papel importante na atualização da memória (a capacidade de permitir a incorporação de novas informações no traço reativado) e na manutenção da força e precisão da memória (de Oliveira Alvares et al., 2013). O presente estudo amplia o fenômeno da atualização mediada pela reconsolidação a um mecanismo que também promove a persistência de memórias emocionais relevantes. A reativação da memória poderia restaurar a comunicação em vias entre o hipocampo e o córtex quando a atividade do ACC foi inibida durante o treino. Nossa sugestão é semelhante à suposição da reverberação de atividade neuronal associada com novos aprendizados durante períodos de sono e vigília que poderiam permitir o estabelecimento gradativo de conexões entre hipocampo e córtex promovendo a consolidação da memória (Diekelmann et al, 2009;. Diekelmann e Born, 2010). No caso dos resultados aqui mostrados, a reativação da memória, induzida pela exposição ao contexto de aprendizado, poderia promover a

manutenção de circuitos que sustentam a consolidação sistêmica. Nesta interpretação, memórias reativadas poderiam indicar uma importância maior para o organismo que aquelas não reativadas, como sugerido por Lee (2009), garantindo assim a sua persistência por meio do remodelamento de circuitos que a sustentam. No entanto, esta interpretação levanta mais perguntas do que respostas, por exemplo, por que apenas estímulos externos (contexto) induzem a atualização da comunicação entre hipocampo e córtex e não a reativação espontânea (replay) durante as fases de sono e vigília? Uma hipótese especulativa poderia ser que a inibição do ACC antes do treino prejudica o curso natural da consolidação sistêmica da memória e estes mecanismos *off-line*, restaurando estas funções após a atualização de comunicação córtico-hipocampal induzida pela reativação ao contexto.

Nossos resultados sugerem um papel essencial do ACC durante o aprendizado do condicionamento aversivo ao contexto para a futura expressão da memória recente e remota. A reconsolidação da memória pode ser um mecanismo de plasticidade para o remodelamento constante dos circuitos entre hipocampo e córtex facilitando a consolidação sistêmica e a manutenção da memória ao longo do tempo. Este mecanismo pode contribuir ao entendimento dos mecanismos por trás da persistência de memórias aversivas.

Conclusões e resumo dos resultados

- 1- Nossos experimentos mostraram que a atividade do ACC durante o treino no CAC é essencial para a estabilidade de memórias aversivas recentes e remotas (**Objetivos 1 e 2; Fig 1a e b**). Isto sugere que o ACC está envolvido em processos de consolidação sináptica e sistêmica que ocorrem em paralelo durante o aprendizado;
- 2- A reativação da memória promove a expressão da memória remota após a inibição do ACC antes do treino (**Objetivo 3; Fig 1b**);
- 3- O efeito da reativação promovendo a expressão da memória remota é dependente de mecanismos de reconsolidação. A inibição do processo de desestabilização por meio da administração de nimodipina impede a expressão da memória remota (**Objetivo 4; Fig 2**);
- 4- A reativação promove a expressão da memória remota por meio da recuperação da atividade do ACC. Uma nova inibição da atividade do ACC antes desta sessão impede a expressão da memória remota (**Objetivo 5; Fig 3**).

Legenda das Figuras

Figura 1 – A reativação promove a expressão da memória remota após a inibição do ACC. Todos os gráficos apresentam porcentagem do tempo de congelamento, expressos como média \pm SEM. O desenho experimental é mostrado na parte superior de cada figura. (a) Animais tratados com muscimol no ACC antes do treino apresentam menos congelamento quando comparados ao grupo controle durante o teste no dia 40 (Veículo n = 8, Muscimol n = 9). (b) Os animais tratados com muscimol no ACC antes do treino expressaram níveis de congelamento menor quando comparados ao grupo controle durante o teste 2 dias após o treino (reativação), no entanto não foram encontradas diferenças significativas durante o teste no dia 40 (Veículo n = 10, Muscimol n = 8). Codificação: grupos marcados com a mesma letra (por exemplo, "a") são estatisticamente iguais um ao outro, e diferentes dos marcados com letras diferentes (por exemplo, grupos com "a" diferem dos grupos com "b"), com nível de significância de $p < 0,05$.

Figura 2 - O efeito de resgate da memória pela reativação é mediado por mecanismos de reconsolidação. Todos os gráficos apresentam porcentagem do tempo de congelamento, expressos como média \pm SEM. O desenho experimental é mostrado na parte superior de cada figura. Durante a sessão de reativação, ambos os grupos tratados com muscimol no ACC antes do treino expressaram níveis de congelamento menores quando comparados aos dois grupos tratados com o veículo antes do treino. Durante o teste no dia 40, os animais tratados com muscimol no ACC antes do treino e nimodipina antes da reativação

expressaram níveis de congelamento menor quando comparado com todos os grupos (entre veículos n = 10, Veículo-Nimodipine n = 14, Muscimol-Veículo n = 12, Muscimol-nimodipina n = 12). Codificação: grupos marcados com a mesma letra (por exemplo, "a") são estatisticamente iguais um ao outro, e diferentes dos marcados com letras diferentes (por exemplo, grupos com "a" diferem dos grupos com "b"), com nível de significância de $p < 0,05$.

Figura 3 – A atividade do Córtex cingulado anterior durante a reativação é necessária para o resgate da memória remota. Todos os gráficos apresentam porcentagem do tempo de congelamento, expressos como média \pm SEM. O desenho experimental é mostrado na parte superior de cada figura. Durante a sessão de reativação, ambos os grupos tratados com muscimol no ACC antes do treino expressaram níveis de congelamento menor quando comparados aos dois grupos tratados com o veículo antes do treino. Durante o teste no dia 40, os animais tratados com muscimol e lidocaína antes da reativação expressaram níveis de congelamento menor quando comparados a todos os grupos (Vehicle (ACC) Veículo de (ACC) n = 10, Veículo (ACC) -Lidocaine (ACC) n = 14, Muscimol (ACC) Veículo de (ACC) n = 12, Muscimol (ACC) -Lidocaine (ACC) n = 12). Codificação: grupos marcados com a mesma letra (por exemplo, "a") são estatisticamente iguais um ao outro, e diferentes dos marcados com letras diferentes (por exemplo, grupos com "a" diferem dos grupos com "b"), com nível de significância de $p < 0,05$.

Conflito de interesse: Não há conflitos de interesse entre os autores do presente artigo.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pela CAPES (MEC), CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), e FINEP (“Rede Instituto Brasileiro de Neurociências”, IBN-Net, No. 01.06.0842-00). Gostaria agradecer a Zelma Regina V. de Almeida pela ajuda técnica durante o desenvolvimento destes experimentos.

Referencias

- Beeman CL, Bauer PS, Pierson JL, Quinn JJ (2013). Hippocampus and medial prefrontal cortex contributions to trace and contextual fear memory expression over time. *Learn Mem* 20:336-343.
- Bero AW, Meng J, Cho S, Shen AH, Canter RG, Ericsson M, Tsai LH (2014) Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:11852-11857.
- 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.
- de Oliveira Alvares L, Einarsson EO, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA (2012). Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092-1095.
- de Oliveira AL, Pasqualini GB, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA (2008). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154:1648-1655.
- de Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244:42-48.

Dash PK, Hebert AE, Runyan JD (2004). A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Brain Res Rev* 45:30-37.

Diekelmann S, Born J (2010). The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11:114-126.

Diekelmann S, Wilhelm I, Born J (2009). The whats and whens of sleep-dependent memory consolidation. *Sleep Med Rev* 13:309-321.

Einarsson EO, Nader K (2012). Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 19:449-452.

Kitamura T, Inokuchi K (2014). Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain* 7:13.

Lesburgueres E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifilieff P, Bontempi B (2011). Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science* 331:924-928.

Lee JL (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264-1266.

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

Lee JL, Hynds RE (2013) Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23:233-244.

- Markowitsch HJ, Calabrese P, Liess J, Haupts M, Durwen HF, Gehlen W (1993). Retrograde amnesia after traumatic injury of the fronto-temporal cortex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:988-992.
- Moscovitch M, Nadel L (1998) Consolidation and the hippocampal complex revisited: in defense of the multiple-trace model. *Curr Opin Neurobiol* 8:297-300.
- Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7:217-227.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego
- Raybuck JD, Lattal KM (2014). Differential effects of dorsal hippocampal inactivation on expression of recent and remote drug and fear memory. *Neurosci Lett* 569:1-5.
- Runyan JD, Moore AN, Dash PK (2004). A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning. *J Neurosci* 24:1288-1295.
- Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S (2008). Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem* 15:426-433.
- Teng E, Squire LR (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400:675-677.

