

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

Liane da Silva de Vargas

**ESTUDO DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DE
DIFERENTES ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA**

Porto Alegre

2019

Liane da Silva de Vargas

**ESTUDO DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DE
DIFERENTES ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor(a) em Fisiologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Pâmela Billig Mello Carpes

Porto Alegre

2019

Liane da Silva de Vargas

**ESTUDO DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DE
DIFERENTES ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA**

BANCA EXAMINADORA

Dra. Pâmela Billig Mello Carpes
(Presidente, orientadora)

Dra. Nadja Schröder
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS)

Dra. Jociane de Carvalho Myskiw
(Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS)

Dra. Mauren Assis de Souza
(Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Acredito que as coisas não acontecem ao acaso, da mesma maneira, as pessoas não entram em nossa vida sem um motivo. Por isso, gostaria de agradecer primeiramente a **Deus**, por ter permitido que eu encontrasse tantas pessoas especiais no meu caminho, as quais sem dúvida alguma contribuíram para que eu conseguisse realizar mais este sonho.

À minha **família** quero dedicar a minha mais profunda gratidão. Meus pais **Vanderlei e Celi**, meus irmãos, **Liziane e Rafael**, minha madrinha **Carmen**, obrigada por estarem sempre ao meu lado, incentivando-me, apoiando minhas decisões, além de serem meus exemplos e o motivo pelo qual busco sempre melhorar.

Com todo carinho, respeito e admiração, direciono agradecimentos especiais a minha querida mestre e orientadora **Pâmela**. Obrigada por ter me proporcionado grandes oportunidades, pelos seus ensinamentos, os quais eu levarei além da ciência, para vida. Obrigada também pela sua compreensão, paciência, apoio e confiança, não tenho palavras para descrever a admiração que tenho por você.

À minha amiga **Tânia Regina**, que se tornou minha segunda mãe em Uruguaiana, sempre me incentivando, apoiando e me dando muito carinho. Obrigada por tudo.

À equipe do **Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis)** da **unipampa**, os quais de alguma forma estiveram sempre ao meu lado, especialmente a **Karine** e o **Ben-Hur**, sou muito grata por tê-los comigo no dia a dia do lab.

Ao mestre **Ivan Izquierdo** e ao professor **Rudi D’Hooge**, pelas importantes colaborações feitas neste trabalho.

Ao Professor **Rafael** e a **Bruna** por conduzirem as análises de HPLC.

À **Universidade Federal Rio Grande do Sul** por tornar possível o sonho da pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

Ao **PPG Ciências Biológicas: fisiologia**, pela vaga no programa e por toda assistência dada pela coordenação, professores e funcionários.

Ao **CNPq** pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Existem diversos fatores capazes de modular a aquisição, a consolidação e a persistência da memória, como por exemplo, experiências prévias, drogas e outros tratamentos, emoções, entre outros. Assim, estratégias para modular a memória podem ser usadas para melhorar a mesma em diversas situações, tendo aplicabilidade em tratamentos de doenças relacionadas a um trauma ou em doenças neurodegenerativas, por exemplo. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos de diferentes estratégias comportamentais na modulação da memória, com enfoque nos processos de generalização e extinção da memória aversiva e na persistência da memória de reconhecimento de objetos, respectivamente. A tese é composta de três estudos principais que buscaram investigar: (i) o efeito da exposição a uma novidade sobre o processo de generalização da memória aversiva; (ii) o efeito da reativação no processo de extinção da memória aversiva; e, (iii) o efeito de uma sessão única de exercício físico na persistência da memória de reconhecimento. Todos os experimentos foram realizados utilizando animais de laboratório (ratos Wistar machos) e tarefas de memória padronizadas para este modelo. No primeiro estudo demonstramos que a exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva e que este efeito depende da síntese de proteínas no hipocampo. No segundo estudo demonstramos que a reativação, realizada previamente às sessões de extinção, facilita o processo de extinção da memória aversiva, e que este efeito depende do funcionamento das regiões infra e pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial. Por fim, no terceiro estudo demonstramos que a ativação dopaminérgica é necessária para que haja a persistência da memória de reconhecimento e que uma sessão única de exercício físico realizada logo após a aprendizagem é capaz de promover a persistência deste tipo de memória por meio da ativação do sistema dopaminérgico hipocampal. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que estratégias comportamentais como as aqui apresentadas podem ser utilizadas para modular os processos mnemônicos. A novidade e a reativação, considerando o contexto no qual foram estudadas (relacionado à memória aversiva) apresentam-se como potenciais estratégias auxiliares a serem empregadas no tratamento de doenças relacionadas à transtornos do medo, enquanto que o exercício agudo apresenta grande potencial para ser empregado como estratégia tanto no tratamento de doenças cuja persistência esteja comprometida, assim como, como uma estratégia comportamental auxiliar nos processos de aprendizagem.

Palavras-chave: Modulação da memória; Estratégias comportamentais; Generalização; extinção; persistência.

ABSTRACT

There are several factors that can modulate the acquisition, consolidation and persistence of memory, such as previous experiences, drugs and other treatments, emotions, among others. Thus, strategies to modulate memory can be used to improve memory in a variety of situations, having applicability in treatments such as in diseases pathologies. The objective of this work was to investigate the effects of different behavioral strategies in memory modulation, focusing on the processes of generalization and extinction of aversive memory and the persistence of object recognition memory, respectively. The thesis is composed of three main studies that sought to investigate: (i) the effect of exposure to a novelty on the generalization process of aversive memory; (ii) the effect of reactivation in the process of extinction of aversive memory; and (iii) the effect of a single session of physical exercise on the persistence of object recognition memory (RO) in rodents. In the first step, we demonstrated that the exposure to novelty hinders aversive memory generalization and that this effect depends on the synthesis of proteins in the hippocampus. In the second stage, we demonstrated that reactivation, before to extinguishing sessions, facilitates the extinction process, and that this effect depends on the functioning of the infra-and pre-limbic regions of the ventromedial prefrontal cortex. In the third phase we demonstrated that dopaminergic activation is necessary for the RO memory persistence and that a single session of physical exercise after learning is able to promote RO memory persistence through the activation of the hippocampal dopaminergic system. Based on the results obtained, we can conclude that behavioral strategies such as those presented here can be used to modulate the mnemonic processes. Novelty and reactivation, considering the context in which they were studied (related to aversive memory) are presented as potential auxiliary strategies to be used in the treatment of diseases related to fear disorders, whereas acute exercise presents great potential to be employed as a strategy both in the treatment of diseases whose persistence is compromised, as well as as an auxiliary behavioral strategy in the learning processes.

Keywords: Memory modulation; Behavioral strategies; Generalization; extinction; persistence.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
APRESENTAÇÃO	16
I INTRODUÇÃO	17
1.1 Memória	17
1.1.1 A memória aversiva	22
1.1.2 A memória de reconhecimento	23
1.2 Generalização da memória aversiva	23
1.3 Extinção da memória	24
1.4 Persistência da memória	27
1.5 Estratégias comportamentais que modulam a memória	28
1.6 Justificativa	30
1.7 Objetivos	32
1.8 Hipóteses	33
II MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Amostra	35
2.2 Desenho do estudo	35
2.2.1 Estudo 1: A exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva, efeito que é dependente da síntese de proteínas no hipocampo	35
2.2.2 Estudo 2: Participação das regiões infra-límbica (IL) e pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventro medial (CPFvm) no efeito facilitatório da reativação sobre a extinção da memória aversiva	37
2.2.3 Estudo 3: A ativação dopaminérgica hipocampal é necessária para modulação da persistência da memória de reconhecimento de objetos por uma sessão de exercício físico	39
2.3 Procedimentos experimentais	40
2.3.1 Cirurgia estereotáxica	40
2.3.2 Manipulação dos animais	42
2.3.3 Protocolos comportamentais e farmacológicos	42
3.4 Análises estatísticas	53
3.5 Aspectos éticos	54
III RESULTADOS	55
3.1 Estudo 1: A exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva, efeito que é dependente da síntese de proteínas no hipocampo	55

3.1.1 A exposição à novidade evita generalização da memória aversiva.....	55
3.1.2 Os efeitos da novidade na generalização da memória aversiva dependem da síntese proteica no hipocampo	56
3.1.3 As drogas e veículo infundidos no hipocampo e a exposição à novidade não aumentam a ansiedade nem alteram o comportamento locomotor e exploratório, ou a percepção nociceptora dos animais.....	58
3.2 Estudo 2: Participação das regiões infra-límbica (IL) e pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventro medial (CPFvm) no efeito facilitatório da reativação sobre a extinção da memória aversiva	59
3.2.1 A reativação facilita o processo de extinção da memória aversiva	59
3.2.2 As regiões Infralímbica (IL) e Pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventromedial (cPFvm) são essenciais para o efeito facilitatório da reativação na extinção da memória aversiva	60
3.2.3 A infusão intrahipocampal de salina ou muscimol não prejudica a ansiedade e os comportamentos locomotores e exploratórios, e a percepção nociceptora dos animais	62
3.3 Estudo 3: A ativação dopaminérgica hipocampal é necessária para modulação da persistência da memória de reconhecimento de objetos por uma sessão de exercício físico	63
3.3.1 Uma única sessão de exercício físico promove a persistência da memória de RO por meio da ativação dopaminérgica no hipocampo	63
3.3.2 Uma única sessão de exercício físico promove o aumento nos níveis de dopamina no hipocampo	67
3.3.3 As drogas e veículo infundidos via intrahipocampal e exercício físico não prejudicam a ansiedade e os comportamentos locomotores e exploratórios dos animais.....	68
V DISCUSSÃO	70
VI CONCLUSÕES.....	76
VII PERSPECTIVAS FUTURAS.....	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO I.....	88
ANEXO II.....	89
ANEXO III.....	90
ANEXO IV – Artigo: Estudo 1.....	91
ANEXO V – Manuscrito: Estudo 2	97
ANEXO VI – Manuscrito: Estudo 3.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de avaliação do nível de treinabilidade dos ratos durante o protocolo do bom corredor.....	48
Tabela 2. Nem a droga ou o veículo nem a novidade afetaram o desempenho no CA LCE e HP.....	58
Tabela 3. A infusão de muscimol, de salina e a exposição à reativação não afetaram o desempenho no CA, LCE e HP.....	63
Tabela 4. A infusão de dopamina, SCH-23390 ou salina e os demais procedimentos propostos no desenho do estudo não têm efeito no tempo total de exploração no treino e testes na tarefa de RO, na ansiedade no LCE e em atividades locomotoras e exploratórias no CA.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases do processo de formação da memória e os caminhos que a memória pode seguir após a sua evocação.....	18
Figura 2. Classificação da memória de acordo com a função, conteúdo e tempo de duração..	19
Figura 3. Formação hipocampal e suas principais conexões intrínsecas e extrínsecas.....	21
Figura 4. Mapa das principais regiões cerebrais envolvidas no processamento das memórias declarativas no cérebro humano.....	21
Figura 5. Modelo de condicionamento para memórias aversivas em roedores.....	25
Figura 6. Esquema ilustrando as regiões do córtex pré-frontal no cérebro humano.....	26
Figura 7. Desenho esquemático dos experimentos comportamentais da etapa 1 do estudo 1..	36
Figura 8. Desenho esquemático dos experimentos comportamentais da etapa 2 do estudo 1..	37
Figura 9. Esquema ilustrativo dos experimentos do estudo 2.....	38
Figura 10. Desenho experimental das etapas desse estudo e resumos dos procedimentos a serem realizados.....	39
Figura 11. Localização das regiões de implantação das cânulas via cirurgia estereotáxica no encéfalo do rato (corte coronal).....	41
Figura 12. Foto do aparato e do animal submetido à cirurgia estereotáxica.....	41
Figura 13. Ilustração do aparato da esQUIVA INIBITÓRIA e tarefa de condicionamento de medo.	43
Figura 14. Ilustração da esQUIVA INIBITÓRIA e esQUIVA INIBITÓRIA MODIFICADA.....	43
Figura 15. Ilustração da exposição à novidade previamente à exposição a EsQUIVA INIBITÓRIA MODIFICADA (EIM).....	44
Figura 16. Ilustração do aparato e sessões de extinção.....	45
Figura 17. Ilustração do aparato e reativação da memória aversiva.....	46
Figura 18. Ilustração da tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO).....	47
Figura 19. Ilustração do protocolo de exercício físico e sua execução.....	49
Figura 20. Localização das regiões de infusão das drogas e veículo de acordo com o estudo realizado.....	50
Figura 21. Ilustração da tarefa no campo aberto.....	52
Figura 22. Ilustração da tarefa no Labirinto em Cruz Elevado.....	52
Figura 23. A exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva.....	56

Figura 24. A infusão de anisomicina e rapamicina na região CA1 do hipocampo após a exposição à novidade impedem o efeito da novidade na prevenção de generalização de memória.....	57
Figura 25. A reativação facilita o processo de extinção da memória aversiva.....	60
Figura 26. As regiões Infralímbica (IL) e Pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventromedial (cPFvm) são essenciais para o efeito facilitatório da reativação na extinção da memória aversiva.....	62
Figura 27. Uma única sessão de exercício físico após o aprendizado promove a persistência da memória de RO; este efeito não ocorre com a infusão de SCH-23390; a infusão de DA tem um efeito semelhante ao do exercício.....	65
Figura 28. Uma única sessão de exercício físico e a infusão de dopamina (DA) intra-hipocampal após o aprendizado de RO promovem a persistência da memória.....	66
Figura 29. A familiarização prévia na esteira rolante e uma sessão de exercício físico após o aprendizado de RO promovem um aumento dos níveis de dopamina hipocampal.....	68

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ani – Anisomicina

ANOVA – Análise de Variância

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*

CA – *Campo aberto*

CA1 – Região CA1 do hipocampo dorsal, do latim Cornu ammonis (Corno de Ammon)

CA3 – Região CA3 do hipocampo dorsal, do latim Cornu ammonis (Corno de Ammon)

CREB – Elemento de ligação à proteína ligante responsivo ao AMPc do inglês, cAMP – *Responsive element-binding protein*

CPFvm – Córtex pré-frontal ventro medial

DA - dopamina

D1 – Receptor de dopamina tipo D1

EC – Estímulo condicionado

EI – Esquiva inibitória / Estímulo incondicionado

EIM – Esquiva inibitória modificada

GABA - ácido δ -aminobutírico

IL – infralímbica

HIPP – Hipocampo

HP - Hot plate

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High performance liquid chromatography*

LCE – *Labirinto em cruz elevado*

LTP – Potenciação de longa duração, do inglês *Long-term potentiation*

MCD – Memória de curta duração

Min - Minutos

MLD – Memória de longa duração

MT – Memória de trabalho

mTor – Proteína alvo de rapamicina em mamíferos, do inglês *Mammalian target of Rapamycin*

MUS - Muscimol

p – Significância estatística

PL- Pré-límbica

PRPs – Proteínas relacionadas à plasticidade sináptica

Rapa - Rapamicina

RO – Reconhecimento de objetos

s - Segundos

SNC – Sistema nervoso central

STC - Marcação e captura sináptica, do inglês *Synaptic Tagging and Capture*

TRIS – Abreviação do composto orgânico conhecido como tris(hidroximetil)aminometano, com a fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

VEH - Veículo

VTA – Área tegumentar ventral, do inglês *ventral tegmental area*

µg – Micrograma

µl - Microlitro

APRESENTAÇÃO

A presente tese é composta por três estudos principais, os quais buscaram investigar os efeitos de diferentes estratégias comportamentais na modulação da memória, com enfoque nos processos de generalização e extinção da memória aversiva e na persistência da memória de reconhecimento de objetos, respectivamente.

A tese é organizada em quatro partes principais. Na primeira parte (introdução) são abordados os temas que fundamentam a presente tese, incluindo a revisão de literatura e as hipóteses de trabalho, bem como os objetivos do estudo. A segunda parte da tese é composta pelos métodos, onde estão descritos detalhadamente o desenho experimental de cada estudo, bem como os diferentes procedimentos realizados. A terceira parte é composta pelos resultados, com a descrição dos achados encontrados nos três estudos. Por fim, a terceira parte da tese é composta pelas sessões de discussão e conclusão, nas quais apresentamos interpretações gerais dos estudos. Ao final desta tese, encontram-se as referências bibliográficas utilizadas na tese e em anexo os comprovantes de aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais e o artigo publicado e os manuscritos submetidos.

I INTRODUÇÃO

1.1 Memória

Entende-se por memória a capacidade de adquirir, formar e conservar uma informação, para posterior recordação (Squire 1986; Szapiro, Galante et al. 2002). Trata-se, portanto, de um processo de armazenamento de informações provenientes das experiências vivenciadas, as quais poderão, ou não, ser relembradas a qualquer instante (Izquierdo 1989; Squire 2004).

A memória pode ser dividida em três fases. A primeira delas, chamada de aquisição, refere-se ao momento em que a informação está sendo adquirida, e também é conhecida como aprendizagem (Izquierdo 1989; McGaugh 2000; Squire 2004). A segunda fase corresponde a consolidação, é nela que há o desencadeamento de processos neurobiológicos complexos que são necessários para que a informação seja armazenada e, portanto, requer um tempo maior para acontecer (Izquierdo 1989; Cahill and McGaugh 1998; Squire 2004). A terceira e última fase é chamada de evocação, momento no qual a informação é recordada, isto é, corresponde ao momento em que relembramos de algo que foi previamente aprendido (Izquierdo 1989; Squire 2004).

Uma vez consolidada, as memórias podem seguir diferentes caminhos. Algumas memórias, passam pelo processo que chamamos de esquecimento natural, onde a informação original não estará mais disponível para a recuperação. Trata-se de um esquecimento fisiológico e necessário, proveniente de um mecanismo de saturação da memória; a existência de certas memórias pode nos impedir de adquirir outras mais importantes, por isso, é necessário esquecer (Andersen 2015). Outro fator que leva ao esquecimento natural é o “desuso”, ou seja, as memórias não reativadas, não relembradas, desaparecem por falta de uso, como consequência de uma atrofia sináptica (Izquierdo 2018). Existem ainda, dois outros caminhos que as memórias podem seguir, um deles corresponde ao processo de extinção da memória e ou outro de reconsolidação. Na extinção, diferentemente do que o nome sugere, a memória original não é extinta, mas sim inibida por um novo aprendizado o qual se sobrepõe ao original, não permitindo a sua evocação desnecessária (Thompson 1976; Bouton 1993). Já a reconsolidação corresponde a um fenômeno que permite a incorporação de novas informações à memória original, ou seja, uma memória previamente consolidada sofre uma desestabilização durante a sua evocação seguida de posterior estabilização permitindo uma atualização da memória original (Dudai and Eisenberg 2004).

Sabe-se que o processo de consolidação da memória ocorre em uma janela temporal que corresponde aos primeiros minutos ou horas após a aquisição, e que diferentes fatores podem influenciar nesse processo, tanto de forma positiva como negativa. Nesse sentido, as memórias estão sujeitas à interferência de alguns fatores que podem influenciar tanto na sua consolidação, como também na persistência da memória, a citar: as experiências prévias, o uso de drogas e outros tratamentos, as emoções e o estresse, etc., (Cahill and McGaugh 1998; Izquierdo and McGaugh 2000; Vargas, Lara et al. 2014). A figura 1 ilustra as fases do processo de formação da memória e os momentos nos quais a memória pode sofrer interferências, bem como os diferentes caminhos que a memória poderá seguir após a sua evocação.



Figura 1. Fases da memória e os caminhos que a memória pode seguir após a sua formação. Durante a aquisição, bem como nos primeiros minutos ou horas após a aquisição, as memórias estão sujeitas à interferência de alguns fatores que podem influenciar sua consolidação e persistência. Após a evocação, as memórias podem seguir diferentes caminhos, como por exemplo, esquecimento, extinção ou reconsolidação. Fonte: adaptada de (Pâmela Billig Mello-Carpes 2010).

De um modo geral a memória pode ser classificada de acordo com a sua função, conteúdo ou com o tempo que dura, podendo, portanto, ser de diferentes tipos (Izquierdo 2018) (figura 2). De acordo com a sua função, temos a memória de trabalho (MT), também chamada de memória operacional, e a memória propriamente dita, a qual é abordada nas demais classificações. A memória de trabalho é extremamente breve e fugaz; é responsável por manter, durante a aquisição e mais alguns segundos ou no máximo poucos minutos, a informação que está sendo processada no momento, permitindo o que chamamos de “gerenciamento da realidade”, ou seja, é ela que permite uma avaliação do que está acontecendo, se vale a pena ou não formar uma nova memória, ou então se esse tipo de informação já consta nos nossos

arquivos mnemônicos (Barros, Pereira et al. 2002). A principal característica dessa memória é que ela não deixa traços, ou seja, não deixa arquivos (Dash, Moore et al. 2007).



Figura 2. Classificação da memória de acordo com a função, conteúdo e tempo de duração. Fonte: Adaptada de (Izquierdo 2018).

De acordo com o conteúdo, as memórias propriamente ditas (aquelas que são adquiridas, consolidadas e podem ser posteriormente evocadas) podem ser classificadas em declarativas ou procedurais (figura 2). As memórias declarativas são aquelas memórias que podemos declarar com facilidade e é subdividida em duas: episódicas, que correspondem a memória de fatos e eventos dos quais assistimos ou participamos, um exemplo é um aniversário, uma formatura; e as semânticas, que se referem às memórias de conhecimentos mais gerais, como um conceito de biologia, história, entre outros (Izquierdo 2018). O outro tipo de memória de acordo com o conteúdo é a memória procedural, também chamada de memória de procedimento, a qual necessita um aprendizado motor para que se forme, como por exemplo, andar de bicicleta, tocar um instrumento musical (Andersen 2015).

De acordo com o tempo as memórias podem ser classificadas em memória de curta e longa duração e memória remota (figura 2). A memória de curta duração (MCD) é a aquela que dura entre 1 e 6 horas; ela é responsável por manter a informação disponível enquanto a memória de longa duração (MLD) está sendo formada (Unsworth and Engle 2007). Estes dois tipos de memória passam pela consolidação em células especializadas do hipocampo e de áreas corticais com as quais ele se conecta (Izquierdo 2018). A MCD não causa mudanças permanentes, pois não necessita de mudanças na expressão gênica ou síntese proteica, diferentemente do que acontece na formação da MLD, onde essas alterações são necessárias para que se possa conservar estruturalmente a informação referente a elas em sinapses

modificadas em diversas regiões cerebrais (Izquierdo and Medina 1997; Izquierdo and McGaugh 2000). A MLD pode durar horas, dias ou até mesmo meses. Já as memórias de longa duração que permanecem por longos meses ou anos são chamadas de memórias remotas (Andersen 2015).

Ainda, a memória pode ser classificada de acordo com a natureza, podendo ser de duas formas: associativa e não associativa (Andersen 2015). A memória associativa provém de associações entre estímulos e respostas, ou entre dois estímulos. Em modelos animais, nas tarefas de memória associativa, o animal aprende a prever eventos futuros e expressar um comportamento adequado e antecipatório, como por exemplo, no condicionamento clássico pavloviano, onde um estímulo previamente inócuo (luz, som) adquire funções de controle de respostas que eram eliciadas apenas pelo estímulo incondicionado (choque) (Pavlov 2010), ou então no condicionamento operante, onde organiza-se o ambiente de modo a permitir que determinada resposta do animal seja necessária para obter algum resultado, como por exemplo, receber alimento (Skinner, 1937). Já a memória não associativa é formada a partir de um único estímulo, sendo este suficiente para promover um determinado comportamento, não havendo o estabelecimento de relações funcionais programadas entre estímulos e comportamento (Lent 2010). Em modelos animais, a exploração ou habituação de um novo contexto, exemplo em que o animal está exposto somente a um estímulo, corresponde a este tipo de aprendizagem (Andersen 2015).

Embora existam diferentes tipos de memórias, uma memória não é adquirida imediatamente na sua forma definitiva. No momento da aquisição, minutos ou horas depois, as memórias estão suscetíveis à interferência de outros fatores, como por exemplo, experiências vivenciadas, substâncias e outros tratamentos (Cahill and McGaugh 1998; Izquierdo and McGaugh 2000; Vargas, Lara et al. 2014; Izquierdo 2018). Sabe-se também que o hipocampo é a estrutura cerebral chave para a consolidação das memórias, mas além da formação hipocampal (hipocampo, giro denteado e subículo) (figura 3), a formação das memórias declarativas requer a participação de outras estruturas, como córtex parahipocampal e áreas conectadas ao hipocampo, como a amígdala, córtex entorrinal, córtex perirrinal, giro do cíngulo, área pré-frontal e córtex de associação parietal (Eric Kandel 2003) (Figura 4A).

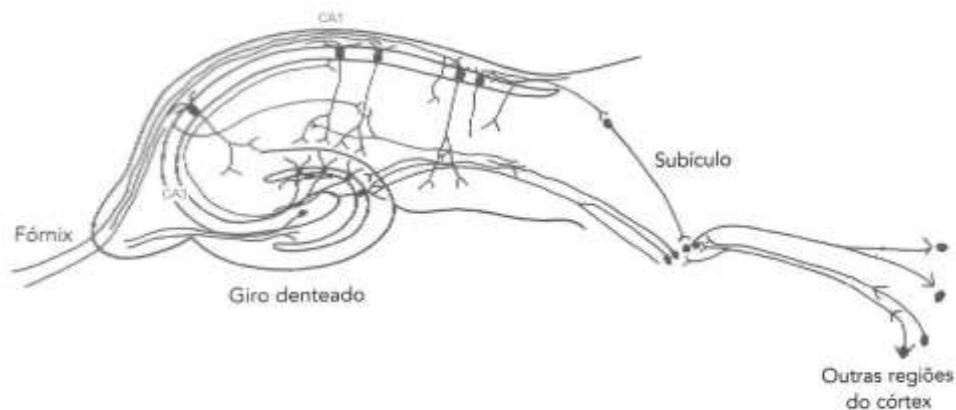


Figura 3. Formação hipocampal e suas principais conexões intrínsecas e extrínsecas. Fonte: Adaptada de (Izquierdo 2018).

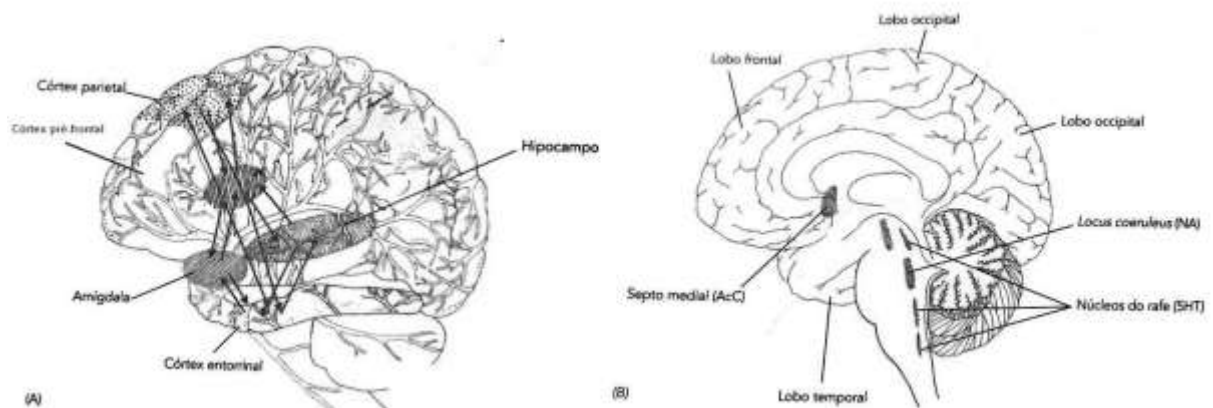


Figura 4. Mapa das principais regiões cerebrais envolvidas no processamento das memórias declarativas no cérebro humano. (A) Todas as regiões envolvidas no processamento da memória estão conectadas entre si e recebem inervação dos grandes sistemas moduladores: dopamina, noradrenalina, serotonina e acetilcolina. (B) Localização dos corpos celulares dos neurônios dos sistemas moduladores. Fonte: Adaptada de (Izquierdo 2018).

A formação das memórias, no entanto, não depende somente da integridade funcional anatômica e bioquímica dessas estruturas. Se pensarmos que o processo de formação da memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos nas estruturas cerebrais supracitadas, que compreendem diversas fases e que requerem um tempo entre 3 e 6 horas para acontecer (Izquierdo and Medina 1997; Izquierdo, Bevilaqua et al. 2006), fica claro imaginarmos o quanto este processo é lábil, e portanto, pode sofrer interferência de fatores diversos, não só no que diz respeito ao comportamento, como experiências prévias, uso de substâncias e medicamentos, mas também no que se refere a modulação que estes processos

sofrem mediante vias que tem ligação com outras estruturas cerebrais (figura 4A), como por exemplo, os diferentes sistemas de neurotransmissores, como sistema dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico e noradrenérgico (figura 4B) (McGaugh 2000; Izquierdo 2018).

1.1.1 A memória aversiva

A memória aversiva é aquela proveniente de uma experiência não agradável que envolve aversão, e pode variar desde uma experiência mais branda a uma experiência traumática, a qual pode oferecer risco à vida. Uma vez consolidada, esse tipo de memória permite a capacidade de discriminação entre uma situação neutra e uma situação perigosa, oferecendo a possibilidade da mesma ser evitada, capacidade esta importante para a sobrevivência (Costanzi, Cannas et al. 2011).

O estudo das bases biológicas da aprendizagem e memória teve início com Ivan Pavlov, o qual estabeleceu os preceitos do condicionamento associativo, também denominado condicionamento clássico ou Pavloviano (1927). Pavlov demonstrou que quando um estímulo condicionado (EC), que não produz uma resposta comportamental significativa, é pareado com um estímulo incondicionado (EI), que produz invariavelmente uma resposta, o mesmo passa a produzir uma resposta condicionada, dessa forma, se estabelece uma associação entre os dois estímulos (Maren 2001). O condicionamento Pavloviano constitui a base dos paradigmas comportamentais utilizados para o estudo dos processos relacionados a aprendizagem e memória e a tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA está entre os modelos mais utilizados.

Em roedores a memória aversiva pode ser mensurada a partir da tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA (Izquierdo and Medina 1997). Neste teste, associa-se a experiência de um estímulo neutro, mas que pode ser condicionado (estímulo condicionado - EC) à um estímulo aversivo, também chamado de estímulo incondicionado (EI). Coloca-se o animal no aparato de esQUIVA INIBITÓRIA (EC), que consiste em uma caixa, com uma plataforma à esquerda e um assoalho de ferro eletrificável (ver item 2.3.3.1). Ao colocar o animal na plataforma e ele descer com as quatro patas na base, e então recebe um estímulo elétrico (EI), sendo imediatamente retirado do aparato. No dia seguinte, o animal é colocado novamente no aparato e se observa quanto tempo o animal levará para descer da plataforma. O animal então associa o EC (plataforma da esQUIVA INIBITÓRIA) ao EI (choque), evitando descer da plataforma em nova exposição à esQUIVA INIBITÓRIA.

1.1.2 A memória de reconhecimento

A memória de reconhecimento é representada pela capacidade de discriminar entre pessoas ou objetos familiares e novos. Este tipo de memória exige que as características específicas de um determinado evento sejam identificadas, discriminadas e comparadas com as características de memórias previamente adquiridas (Steckler, Drinkenburg et al. 1998), sendo de extrema importância, pois esta proporciona uma vantagem adaptativa da experiência prévia para a solução de questões inerentes à sobrevivência.

Em roedores este tipo de memória pode ser avaliada por meio de tarefas de reconhecimento, como o teste de reconhecimento de objetos (Ennaceur and Delacour 1988). Existem diferentes protocolos para realização deste teste, mas o princípio básico é o mesmo. Nesta tarefa o animal é primeiramente habituado ao aparato, que consiste em uma caixa, geralmente de madeira (ver item 2.3.3.2). No dia do treino ele é colocado na mesma caixa contendo dois objetos novos, iguais ou diferentes entre si (A e B), e se observa o tempo de exploração dos dois objetos. No dia do teste, o animal é colocado na mesma caixa, contendo dois objetos, porém um deles é novo (A e C), observa-se novamente o tempo que o animal gasta explorando os dois objetos. Espera-se que no dia do treino o animal gaste tempo similares explorando os dois objetos, já que os dois são novos para ele, mas que no teste o animal dispenda um tempo maior explorando o objeto novo do que o familiar (visto no dia anterior) (Ennaceur and Delacour 1988).

1.2 Generalização da memória aversiva

A generalização da memória aversiva é definida como a transferência de medo de uma experiência traumática para condições que se assemelham ao contexto anteriormente vivenciado (Onat and Buchel 2015; Luyten, Schroyens et al. 2016). Generalizar faz parte do cotidiano, muitas vezes atribuímos a um certo grupo de coisas ou eventos algo que já sabemos, partindo de conhecimentos ou vivências prévias, o que importante para o cotidiano. No entanto, quando falamos de generalização de uma memória aversiva, essa habilidade deve ser conscientemente controlada, e o comportamento aversivo deve ser ressaltado somente quando necessário, pois, quando este for desenfreado, diferentes eventos podem ser percebidos como mais perigosos do que realmente são, levando o indivíduo a alterações do controle do medo, que, por sua vez, podem associar-se à fisiopatologia de doenças como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e a síndrome do pânico (Onat and Buchel 2015; Lopresto, Schipper et al. 2016).

Apesar da generalização do medo não ser um fenômeno novo, é recente a maior atenção ao estudo de seus mecanismos neurais. A partir da literatura existente, sabe-se que o hipocampo é uma das áreas que desempenha papel fundamental nos traços de memória que envolva informações contextuais específicas para este fenômeno (Jasnow, Lynch et al. 2017). Entretanto, ainda são relativamente pouco investigadas as influências comportamentais e sensoriais sobre a generalização, bem como mecanismos que possam minimizar seus efeitos (Jasnow, Lynch et al. 2017). Neste contexto se tem pensando em estratégias para o tratamento de doenças como o TEPT e seus sintomas e, sugere-se a diferenciação de situações semelhantes, mas não iguais, como fundamental, pois embora a generalização seja importante para o nosso dia a dia, ela precisa ser controlada.

1.3 Extinção da memória

O processo de extinção da memória é uma estratégia que tem sido utilizada na terapia comportamental para o tratamento do transtorno do estresse pós-traumático em humanos (Heim and Nemeroff 2009; Davis 2011). O objetivo da extinção como processo terapêutico não é apagar uma memória aversiva, uma vez que esta pode ser útil e até essencial para a sobrevivência. Seu objetivo é inibir a evocação desnecessária deste tipo de memória, permitindo ao indivíduo uma vida normal (Groblewski and Stafford 2010). Evidências clínicas, tais como a recuperação espontânea, demonstram que a extinção é uma forma de novo aprendizado que inibe a expressão da resposta condicionada (Milad, Rauch et al. 2006).

Na extinção o estímulo condicionado (EC) é apresentado na ausência do estímulo incondicionado (EI), fazendo com que a resposta ao EC diminua (figura 5), este tipo de condicionamento foi demonstrado pela primeira vez em 1927 pelo cientista russo Ivan Pavlov. Ele demonstrou que, após o condicionamento clássico, onde o EC, que inicialmente é considerado sem função para uma resposta de medo (como um som) quando pareado com um EI (como um choque) passa a estabelecer relação de contingência entre os estímulos, tornando o EC previamente inócuo aversivo. No entanto, se o EC for apresentado repetidamente sem o EI, o animal tenderá a produzir uma nova associação, diminuindo a resposta condicionada, o que se nomeia extinção. Apesar de utilizada clinicamente, os processos celulares e moleculares envolvidos na extinção mnemônica ainda não são totalmente entendidos (Berman, Hazvi et al. 2003). Protocolos de extinção de memórias de medo em animais são bastante similares à terapia utilizada no tratamento das desordens de medo em humanos e nos provêm modelos válidos para

o estudo da inibição das respostas aversivas (Corcoran and Maren 2004; Hermans, Craske et al. 2006; Menezes, Alves et al. 2015).

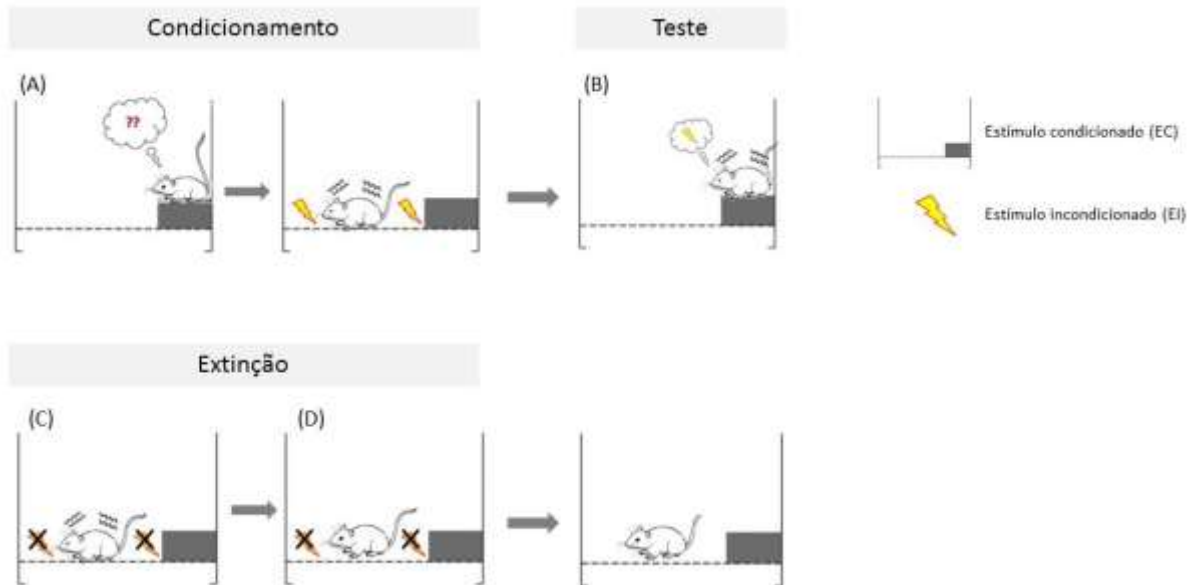


Figura 5. Modelo de condicionamento para memórias aversivas em roedores. (A) condicionamento: na sua apresentação, um estímulo neutro (caixa da esquivia inibitória) associa-se um estímulo incondicionado nocivo (estímulo elétrico nas patas), o qual gera uma resposta inata de defesa. Desta forma ambos os estímulos ficam associados na memória. (B) Após essa associação, o estímulo neutro passa a ser um estímulo condicionado, provocando uma reação aversiva, como comportamentos de congelamento, quando o animal é reexposto ao mesmo contexto, mesmo na ausência do estímulo incondicionado (C). Após sessões de extinção (C), o animal pode aprender que nem sempre que ele for exposto ao ambiente condicionado ele receberá o estímulo aversivo, comportando-se sem a expressão do medo (D). Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Já é consenso que várias regiões do cérebro estão notavelmente envolvidas no processo de consolidação da memória, tais como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal. As duas primeiras estruturas têm sido amplamente estudadas (Furini, Myskiw et al. 2014), enquanto menor atenção têm sido dada à compreensão do papel do córtex pré-frontal na extinção da memória. O córtex pré-frontal está localizado na parte anterior do lobo frontal, anteriormente ao córtex motor primário e ao córtex pré-motor e está envolvido em processos cognitivos de alta ordem, tais como memória de trabalho, tomada de decisão, atenção, planejamento de comportamentos e pensamentos complexos, expressão da personalidade, modulação de comportamento social, entre outros (Squire 2004; Yang and Raine 2009) (figura 6). Sabe-se que o córtex pré-frontal ventromedial (cPFvm) (Figura 6) tem extensa conexão com o sistema límbico e hipocampo, sendo sua função relacionada a processos emocionais, cognitivos e

mnemônicos, enquanto o córtex pré-frontal dorsomedial (cPFdm) (figura 6) está mais relacionado com as funções motoras (Heidbreder and Groenewegen 2003; Vertes 2006). Estudos anteriores também mostram que a inativação temporária do cPFvm reduz a expressão do medo condicionado em camundongos (Sierra-Mercado, Corcoran et al. 2006). Mais recentemente foi demonstrado que diferentes regiões do cPFvm podem exercer funções diferenciadas neste processo: Sierra-Mercado e cols. (2011) demonstraram que a inativação da região infra-límbica (IL) e da região supra-límbica (SL) pode ter efeitos opostos na expressão e extinção do medo condicionado, sendo que, no seu estudo, a inativação da primeira não prejudicou a expressão da memória de medo, mas sim a sua extinção; o oposto foi verificado para a inativação da região SL (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano et al. 2011).

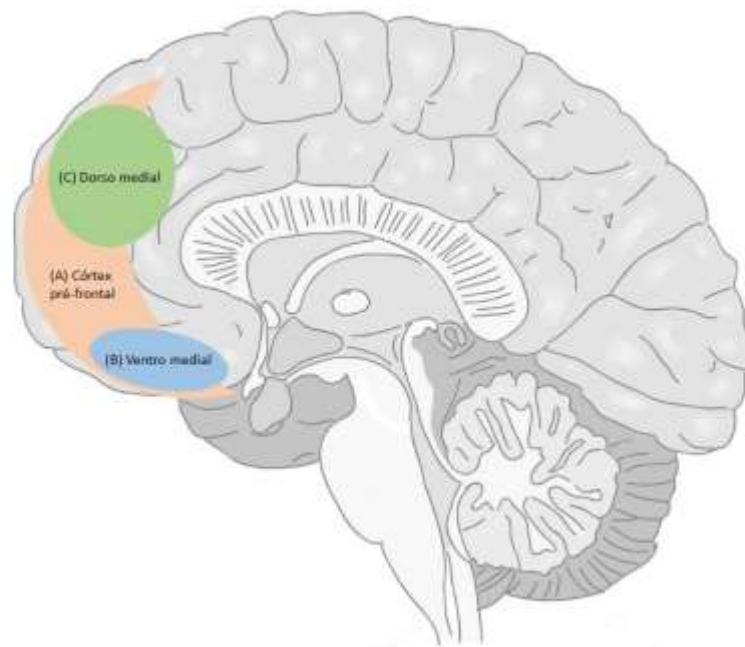


Figura 6. Esquema ilustrando as regiões do córtex pré-frontal no cérebro humano. (A) córtex pré-frontal, (B) ventro medial e (C) dorso medial. Fonte: Adaptado de imagui.eu (2018).

O funcionamento do córtex pré-frontal humano está comprometido em doenças como a esquizofrenia, Alzheimer e demência fronto temporal, doenças que têm, na maioria das vezes, consequências devastadoras, pois afetam as características e habilidades de aprendizado complexo e respostas executivas tipicamente humanas (Albuquerque 2002), daí a importância do estudo da neurofisiologia desta região cerebral. Além disso, estudos em humanos demonstram que, em sujeitos saudáveis, ocorre ativação do córtex pré-frontal e amígdala

durante a extinção da memória de medo, já em sujeitos com distúrbios de ansiedade, como no estresse pós-traumático, parece que esta ativação está diminuída (Milad, Wright et al. 2007).

1.4 Persistência da memória

Quando se fala em memória a primeira coisa que vem à mente da maioria das pessoas é “como posso melhorar a memória?” ou “tenho andado muito esquecida (o)”; isto é, todos nós queremos lembrar do que aprendemos por mais tempo. O fato é que, uma vez consolidada, a memória de longa duração (MLD) poderá persistir por horas, dias, meses, anos ou até mesmo uma vida inteira. A persistência é o principal atributo da MLD, entretanto, esta persistência não é fixa ou igual para cada memória (McGaugh 2000; Izquierdo, Bevilacqua et al. 2006).

Em condições fisiológicas, a persistência de uma memória irá depender de diferentes fatores, tais como a idade, o nível do estímulo emocional no momento da consolidação, o estado de alerta, entre outros (Cahill and McGaugh 1998; Medina, Bekinschtein et al. 2008). Sabe-se que acontecimentos que estejam relacionados com um forte grau de alerta emocional são recordados por mais tempo e com maiores detalhes do que acontecimentos neutros (Rubin and Friendly 1986; Bradley, Greenwald et al. 1992; Palomba, Angrilli et al. 1997; Ochsner 2000). Por outro lado, não é incomum lembrarmos, também por anos, alguns fatos que não envolveram nenhum grau de alerta emocional, como as fórmulas de matemática aprendidas no colégio ou as letras de músicas das quais não gostamos muito (Izquierdo 2018). A persistência da memória muitas vezes se encontra prejudicada em condições patológicas, como no caso da doença de Alzheimer e também da doença de Parkinson. Em ambas condições, ocorrem alterações em sistemas de neurotransmissores moduladores dos processos mnemônicos, e, em detrimento disso, a persistência de memórias fica comprometida (Xu, Yan et al. 2012).

São diversas as possibilidades de mecanismos responsáveis por modular a persistência da memória. O sistema noradrenérgico é um deles, o qual foi identificado como um mediador na melhora da memória em diferentes paradigmas de aprendizagem, a citar: o medo condicionado ao contexto, a tarefa de reconhecimento de objetos e extinção do medo condicionado ao contexto (LaLumiere, Buen et al. 2003; Berlau and McGaugh 2006; Roozendaal, Okuda et al. 2006; Mello-Carpes and Izquierdo 2013). Da mesma forma, foi demonstrado que a noradrenalina influencia a persistência da memória. Chai et al. (2014) mostraram que o aumento da atividade noradrenérgica hipocampal durante a fase tardia da extinção promove a persistência da extinção, efeito este que é bloqueado pelo propranolol (antagonista β -adrenérgico), pelo Rp-cAMPS (inibidor da PKA) e pela anisomicina e emetina (inibidores de

síntese proteica) (Chai, Liu et al. 2014). Outro estudo revelou uma melhora na persistência causada pelo estresse promovido 12 horas após o treino na esQUIVA inibitória, da mesma forma, este efeito foi revertido com a administração de um antagonista β -adrenérgico previamente ao estresse, indicando que os receptores β -adrenérgicos estão envolvidos no efeito da persistência da MLD promovida pelo estresse (Parfitt, Barbosa et al. 2012). Ainda, recentemente nosso grupo demonstrou que o aumento da liberação de noradrenalina no hipocampo promove a persistência da memória de reconhecimento de objetos, este efeito também se perde quando infundimos um antagonista noradrenérgico na região CA1 do hipocampo (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017).

Evidências mais recentes demonstram que, após a consolidação celular da memória, existem mecanismos hipocampais que explicam a persistência da MLD por poucos ou muitos dias, os quais iniciam cerca de 12 horas após a aquisição (Izquierdo 2018). Um destes mecanismos envolve a ativação de neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*), cujos axônios inervam a região CA1 do hipocampo, estimulando receptores D1 de dopamina nessa estrutura, resultando em uma rápida síntese e liberação imediata do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) no hipocampo; a ativação desse sistema culmina com o fortalecimento de sinapses hipocampais que participam na consolidação e persistência da memória por pelo menos duas ou três semanas a mais (Medina, Bekinschtein et al. 2008; Rossato, Bevilaqua et al. 2009). É importante destacar que estes acontecimentos tardios que ocorrem após o aprendizado dependem da prévia consolidação da memória, dessa forma, mecanismos que melhoram a consolidação também estão associados à melhora da persistência da memória (McGaugh 2000) e, por isso, não somente intervenções 12h após a aprendizagem, como também intervenções na janela temporal de consolidação, podem interferir na persistência da MLD.

1.5 Estratégias comportamentais que modulam a memória

Como observamos anteriormente (figura 1), existem diversos fatores que podem modular a aquisição, a consolidação e a persistência da memória (Cahill and McGaugh 1998; Izquierdo and McGaugh 2000; Izquierdo 2018). Tais fatores, podem promover a melhora ou o prejuízo da memória. Utilizar este tipo de estratégia para melhorar a memória pode ser importante em diferentes condições, patológicas ou não. Quando referimo-nos à recursos farmacológicos para melhorar a memória, estudos mostram que a eficácia de alguns fármacos depende em grande

parte do seu uso contínuo, portanto, a descontinuação farmacológica resultaria no cessamento do seu efeito (Etten 1998; Andrade 2018), além disso, o uso de fármacos pode causar efeitos colaterais, fornecendo riscos à saúde. Portanto, a busca por estratégias alternativas no tratamento de disfunções cognitivas tem sido bastante relevante nesse contexto.

Estudos prévios demonstraram que a exposição a uma novidade facilita a aprendizagem, melhorando a consolidação da memória (Moncada and Viola 2007; de Carvalho Myskiw, Benetti et al. 2013; Menezes, Alves et al. 2015). Este fenômeno, baseia-se na hipótese de marcação e captura sináptica ou STC (do inglês *Synaptic Tagging and Capture*), que prediz que uma experiência fraca, que inicialmente formaria apenas uma memória de curta duração, pode captar proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs) quando uma experiência forte for a ela associada (Moncada and Viola 2007), formando uma memória de longa duração. Neste contexto, já está estabelecido na literatura que a exposição a um ambiente novo durante uma janela de tempo crítica é capaz de induzir a síntese de proteínas e promover a formação de uma memória de longa duração a partir de um aprendizado fraco (Moncada and Viola 2007; de Carvalho Myskiw, Benetti et al. 2013).

Existem diversos trabalhos demonstrando a novidade facilita o processo de extinção (Schiller, Monfils et al. 2010; de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2014; Menezes, Alves et al. 2015). Nosso grupo, por exemplo, já demonstrou a aplicabilidade dessa estratégia na facilitação da formação da memória de extinção da memória aversiva adquirida no teste de esquiva inibitória, e o envolvimento de receptores D1; neste estudo ratos treinados na esquiva inibitória passaram por um protocolo fraco de extinção da memória aversiva, que por si só não foi capaz de promover a extinção; no entanto quando associado à novidade, a extinção a partir do protocolo proposto ocorreu (Menezes, Alves et al. 2015).

Outra estratégia comportamental que pode modular o processo de extinção é a reativação da memória aversiva, a qual resulta em uma memória de extinção mais forte e capaz de resistir ao retorno da memória original do medo em ratos e humanos (Monfils, Cowansage et al. 2009; Schiller, Monfils et al. 2010). A reativação corresponde à evocação da memória original, a qual induz a desestabilização da memória previamente consolidada, tornando-a lábil novamente, para posterior estabilização (Lewis 1979; Milton and Everitt 2010), ou seja, a memória passa de um estado latente para um estado no qual ela pode ser recuperada e modificada (Gisquet-Verrier and Riccio 2012); ela resulta da reexposição à informações relevantes relacionadas ao contexto original.

Monfils e colaboradores (2009) demonstraram que quando a reativação da memória de condicionamento é aplicada previamente às sessões de extinção, dentro da janela de reconsolidação, não há recuperação da memória de medo, diferentemente de quando a mesma é aplicada fora dessa janela, demonstrando que a reativação evita a recuperação espontânea após a extinção (Monfils, Cowansage et al. 2009). Esses achados também foram reproduzidos quando aplicados em humanos (Schiller, Monfils et al. 2010). Assim, estes estudos demonstram que tanto a reativação da memória aversiva, quanto a exposição a um ambiente novo previamente ao protocolo de extinção, promovem uma facilitação desse processo, no entanto os mecanismos envolvidos nesse efeito facilitatório, além da STC, ainda são pouco claros, assim como a possibilidade de seu uso para modular diferentes processos mnemônicos ainda foi pouco estudado.

Como mencionado anteriormente, a formação da memória também é modulada pelos diferentes sistemas de neurotransmissores, condição esta que irá influenciar os processos subjacentes à persistência da memória (McGaugh 2000). Em um estudo prévio, demonstramos que uma única sessão de exercício físico aeróbico é capaz de promover a persistência da memória de reconhecimento de objetos (RO) e que este efeito é dependente da ativação do sistema noradrenérgico (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017). Outros estudos também têm apontado que o exercício agudo traz benefícios para a memória (Chang, Labban et al. 2012; Hotting, Schickert et al. 2016), assim, fica claro que não só a prática regular de exercício físico faz bem para a saúde do cérebro, como também o exercício agudo pode ser utilizado como uma estratégia comportamental modulatória dos processos de aprendizagem. Uma vantagem, se compararmos com o uso de fármacos, é que estes últimos podem trazer efeitos colaterais, enquanto o exercício pode ser recomendado de acordo com as condições do sujeito de forma mais segura. No entanto, ainda é preciso elucidar outros possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos do exercício físico sobre a melhora da consolidação e persistência da memória.

1.6 Justificativa

As memórias envolvem diferentes fases e processos bioquímicos que ocorrem em diferentes estruturas cerebrais (Izquierdo, Bevilacqua et al. 2006). Estes processos são altamente influenciáveis por variações nas condições do meio interno e externo, de tal forma que diferentes eventos podem modular os processos mnemônicos (Cahill and McGaugh 1998; McGaugh 2000; Izquierdo 2018). Neste sentido, estudar estratégias que possam ser

manipuladas de forma a melhorar processos de memória e, portanto, utilizadas na terapêutica de doenças que envolvem déficits de memória, é importante.

Sabe-se que tanto a extinção quanto a generalização da memória são processos complexos de aprendizagem e estão dentro de um mesmo contexto, o das desordens de origem psiquiátrica que envolvem a memória medo ou aversiva, como por exemplo, fobias, transtorno de ansiedade e transtorno do estresse pós-traumático. Buscar estratégias tanto para evitar a generalização das memórias de medo, quanto para facilitar a sua extinção, é importante para o futuro desenvolvimento de tratamentos para pacientes que sofrem deste tipo de desordem psiquiátrica. Ainda, entender os mecanismos fisiológicos envolvidos nestas possíveis terapias é fundamental para sua possível aplicação terapêutica de forma segura. Desta forma, nos primeiros dois estudos desta tese utilizamos uma tarefa aversiva para estudar a modulação da generalização e da extinção deste tipo de memória.

Embora a generalização não seja um fenômeno novo, é recente o direcionamento de estudos sobre os seus mecanismos neurais (Jasnow, Lynch et al. 2017). Atualmente se sabe que o hipocampo é uma das áreas que desempenha papel fundamental nos traços de memória que envolvem informações contextuais específicas para este fenômeno (Jasnow, Lynch et al. 2017), mas a influência de aspectos comportamentais sobre a generalização, bem como os mecanismos que possam minimizar seus efeitos ainda são pouco investigadas (Huckleberry, Ferguson et al. 2016; Jasnow, Lynch et al. 2017). Neste contexto, torna-se importante investigar estratégias que busquem evitar ou tornar menos intensas as respostas exacerbadas de medo e atenuar a generalização, pois embora a mesma seja importante para o nosso dia a dia, ela precisa ser comedida.

Conforme mencionado anteriormente, várias regiões do cérebro estão notavelmente envolvidas no processo de consolidação da memória, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal. As duas primeiras estruturas têm sido amplamente estudadas (Furini, Myskiw et al. 2014), enquanto menos atenção têm sido dada à compreensão do papel do córtex pré-frontal na extinção da memória. Nesse sentido, considerando o envolvimento do córtex pré-frontal nos processos cognitivos, especialmente na extinção das memórias, e considerando que a extinção da memória tem sido amplamente utilizada na terapia comportamental para o tratamento do estresse pós-traumático, torna-se importante investigar a participação do córtex pré-frontal na extinção da memória aversiva, proporcionando maior compreensão acerca do envolvimento da região nos processos mnemônicos e, conseqüentemente, fornecendo base científica para o desenvolvimento de terapias de tratamento de patologias que afetam esta função.

Por fim, o terceiro estudo desta tese tem por objetivo estudar o possível envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito modulatório de uma sessão única de exercício sobre a persistência da memória. Tendo clara a importância da memória no dia a dia de cada indivíduo, sendo ela responsável pela construção da personalidade de cada indivíduo e também da manutenção das nossas ações, torna-se necessário e indispensável que haja a persistência de algumas memórias. Sabe-se que o processo de persistência de uma memória é dependente de uma série de mecanismos, que por sua vez, sofrem interferência de fatores externos, os quais podem tanto colaborar, quanto prejudicar a persistência da memória (Cahill and McGaugh 1998; Izquierdo and McGaugh 2000; Vargas, Lara et al. 2014; Izquierdo 2018). Sabendo que a melhora na persistência da memória pode se dar como resultado da melhora na consolidação desta (McGaugh 2000), intervenções no período de consolidação da memória podem, portanto, favorecer a persistência.

O exercício físico é uma prática comportamental não invasiva que favorece a liberação de importantes neurotransmissores envolvidos no processo de consolidação e persistência da memória (Rossato, Bevilaqua et al. 2009; Mello-Carpes and Izquierdo 2013). No entanto, as pesquisas relacionadas ao exercício e seus efeitos sobre a memória referem-se, em sua maioria, aos efeitos provenientes da sua prática regular e por um longo período (Flores, Martins et al. 2014; Schmidt, Vieira et al. 2014; Neves, Menezes et al. 2015), o que nem sempre é simples de promover e ter o engajamento das pessoas. Assim, salienta-se a importância e a necessidade de pesquisar os efeitos de uma sessão de exercício como uma estratégia para modular a consolidação e a persistência memória, entendendo os mecanismos envolvidos nestes efeitos.

1.7 Objetivos

O objetivo geral dessa pesquisa foi investigar estratégias comportamentais para modular processos mnemônicos distintos.

Esta tese possui 3 estudos, cujos objetivos específicos foram:

Estudo 1:

- Verificar se a exposição a uma novidade facilita a distinção entre dois ambientes (original e similar ao original), evitando a generalização da memória aversiva;
- Investigar o envolvimento da síntese proteica hipocampal no efeito da novidade sobre a generalização da memória aversiva.

Estudo 2:

- Verificar a participação da região infra-límbica do córtex pré-frontal ventromedial na extinção da memória aversiva;
- Verificar a participação da região pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial na extinção da memória aversiva.
- Verificar o efeito da reativação na extinção da memória aversiva;
- Verificar a participação da região pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial na facilitação da extinção da memória aversiva pela reativação;
- Verificar a participação da região infra-límbica do córtex pré-frontal ventromedial na facilitação da extinção da memória aversiva pela reativação.

Estudo 3:

- Verificar os efeitos de uma única sessão de exercício após a aprendizagem na consolidação da memória de reconhecimento de objetos (RO);
- Verificar os efeitos de uma única sessão de exercício após a aprendizagem na persistência da memória de RO;
- Verificar o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito do exercício agudo sobre a persistência da memória de RO.

1.8 Hipóteses

A hipótese geral do estudo é que diferentes estratégias comportamentais (a citar a exposição à novidade, a reativação da memória e a prática de uma sessão de exercício físico) podem modular diferentes processos mnemônicos.

Considerando cada um dos estudos que compõem esta tese, destacamos as respectivas hipóteses:

Estudo 1: Estudos prévios mostraram que a exposição à novidade facilita a aprendizagem e o processo de extinção da memória aversiva, mediante o fenômeno de marcação e captura sináptica (Moncada and Viola 2007; Schiller, Monfils et al. 2010; de Carvalho Myskiw, Benetti et al. 2013; de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2014; Menezes, Alves et al. 2015) e, considerando que a tanto a extinção quanto a generalização envolvem a consolidação de uma memória aversiva, nossa hipótese de trabalho é que a novidade também possa atuar no processo de generalização, permitindo um aprendizado com um traço mais forte, o qual possibilite a discriminação entre dois ambientes semelhantes, i.e., evite a generalização da memória aversiva. Hipotetizamos que este efeito modulatório esteja relacionado com a hipótese da STC, envolvendo, portanto, a síntese de proteínas no hipocampo.

Estudo 2: Estudos prévios demonstraram que o córtex pré-frontal está envolvido em processos cognitivos de alta ordem, incluindo os processos mnemônicos (Squire 2004; Yang and Raine 2009). No entanto, o papel das diferentes regiões do cPFvm na extinção da memória ainda carece de melhor compreensão. Sierra-Mercado e cols. (2011) demonstraram que a inativação da região infra-límbica (IL) e supra-límbica (SL) pode ter efeitos opostos na expressão e extinção do medo condicionado, sendo que, no seu estudo, a inativação da primeira não prejudicou a expressão da memória de medo, mas sim a sua extinção; o oposto foi verificado para a inativação da região SL (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano et al. 2011). Nós hipotetizamos que esta é uma estrutura não só importante para a extinção da memória aversiva, mas também fundamental para permitir que ocorram os efeitos facilitatórios observados no uso de estratégias comportamentais previamente à extinção, como o caso da reativação, cujos efeitos modulatórios foram previamente demonstrados (Monfils, Cowansage et al. 2009; Schiller, Monfils et al. 2010).

Estudo 3: Considerando que o exercício físico é uma prática comportamental não invasiva que favorece a liberação de noradrenalina e dopamina (Meeusen and De Meirleir 1995), importantes neurotransmissores envolvidos na modulação dos processos de consolidação e persistência da memória (Rossato, Bevilaqua et al. 2009) e que nossos achados recentes, que mostraram que uma única sessão de exercício aeróbico é capaz de promover a persistência da memória de RO, mecanismo dependente da ativação do sistema noradrenérgico (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017), nossa hipótese é de que a ativação do sistema dopaminérgico também esteja envolvida e seja necessária para os efeitos do exercício agudo na persistência da memória.

II MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra

Para os experimentos dos três estudos que compõem esta tese utilizamos ratos adultos machos da linhagem *Wistar* (3 meses de idade, 300-400g), proveniente do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Considerando ser um estudo com animais experimentais, o tamanho amostral (número de animais por grupo) foi definido com base nos estudos da área publicados em revistas científicas com classificação Qualis A/CAPES, totalizando 250 animais, sendo cerca de 10 animais por grupo para os experimentos comportamentais e farmacológicos-comportamentais e 5 animais por grupo para os experimentos bioquímicos.

Durante todos os procedimentos os animais foram mantidos em caixas plásticas especiais com capacidade para 4 animais, forradas com maravalha, sendo submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h (luz a partir das 7h e escuro a partir das 19h), com água e ração à vontade e uma temperatura ambiente constante de aproximadamente 23°C. As caixas foram trocadas e limpas a cada 2 dias e o máximo de precaução foi tomado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estão de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

2.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo randomizado cego, o qual teve o objetivo geral de investigar mecanismos fisiológicos envolvidos no efeito de diferentes estratégias utilizadas na modulação da memória, sendo subdividido em três estudos principais, envolvendo os processos de generalização, extinção, e persistência da memória, respectivamente. O desenho de cada estudo é detalhado a seguir e os protocolos experimentais são descritos na sessão 2.3.3.

2.2.1 Estudo 1: A exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva, efeito que é dependente da síntese de proteínas no hipocampo

Este estudo foi dividido em duas etapas: (i) Efeito da novidade no processo de generalização da memória aversiva; e, (ii) Envolvimento da síntese proteica hipocampal no efeito da novidade sobre o processo de generalização da memória aversiva. Na primeira etapa, quarenta ratos wistar machos foram divididos em 2 grupos: Grupo controle, cujos animais

foram treinados na esquiua inibitória (EI) no dia 1, e no dia 2 foram expostos à esquiua inibitória modificada (EIM) durante 3 minutos; e, Grupo novidade, no qual os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo controle, porém 30 minutos antes da exposição à EIM foram expostos a uma novidade (ambiente novo; campo aberto) durante 5 minutos. No dia 3, metade dos animais de cada grupo foi testada na EI e outra metade na EIM (figura 7).

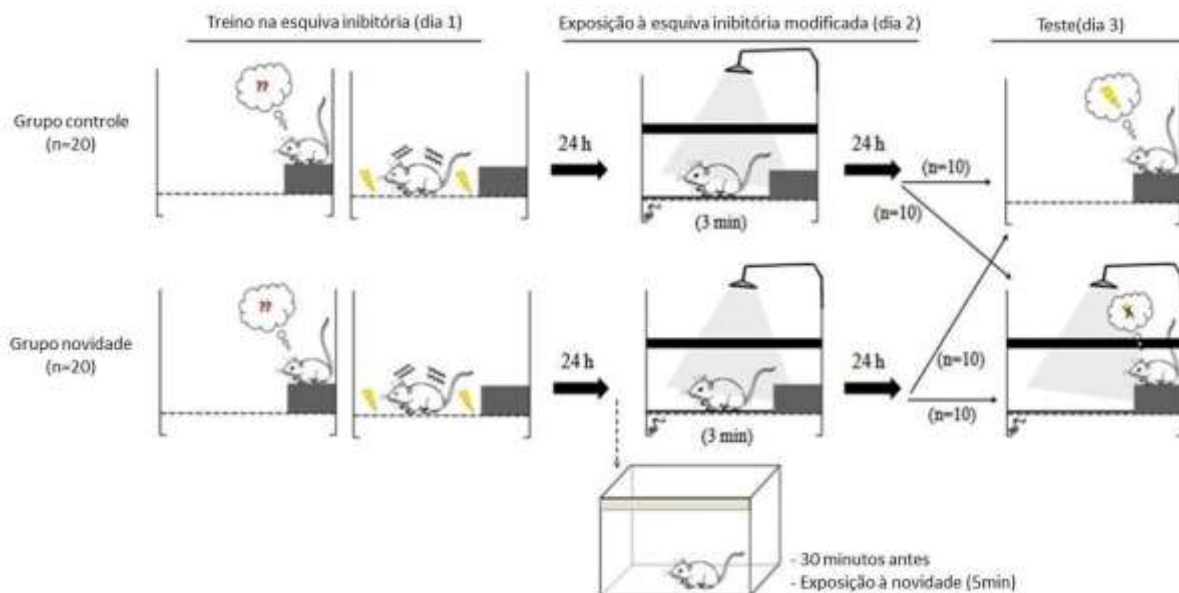


Figura 7. Desenho esquemático dos experimentos comportamentais da etapa 1 do estudo 1. No dia 1 todos os animais foram treinados em esquiua inibitória normal (EI). No dia 2 todos os animais foram expostos a esquiua inibitória modificada (EIM) por 3 minutos, mas metade foi submetida a uma exposição de novidade por 5 min, 30 minutos antes da exposição à EIM. No dia 3, metade dos animais em cada grupo foram testados na EI e outra metade na EIM. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Na segunda etapa, oitenta ratos wistar machos foram divididos em 4 grupos: (i) controle, cujos ratos foram treinados em esquiua inibitória normal (EI) no dia 1, no dia 2 eles foram expostos a esquiua inibitória modificada (EIM) por 3 minutos; (ii) novidade: os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo (i), mas 30 minutos antes da exposição à EIM foram expostos a uma novidade (campo aberto) por 5 minutos; (iii) novidade + Ani, cujos ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo (ii), mas imediatamente após a exposição à novidade, receberam uma infusão intrahipocampal de anisomicina (Ani), um inibidor da tradução ribossomal; e, (iv) novidade + Rapa, cujos ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo (ii), mas imediatamente após a exposição à novidade, receberam uma infusão intrahipocampal de rapamicina (Rapa) um inibidor da síntese proteica

mediada por mTOR. No dia 3, metade dos animais em cada grupo foi testada na EI e a outra metade na EIM (figura 8).

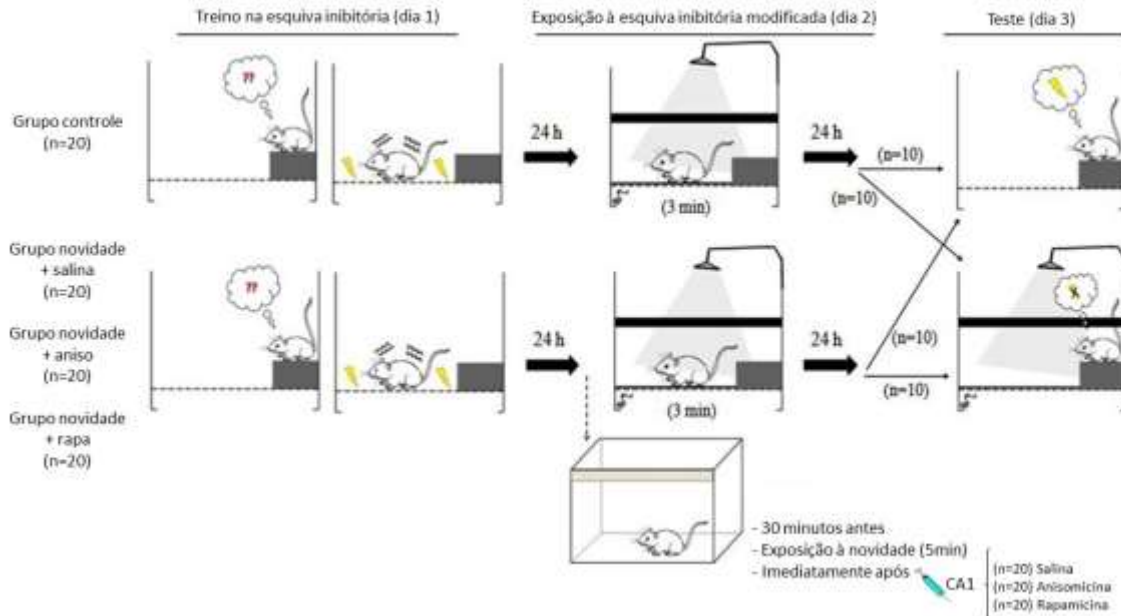


Figura 8. Desenho esquemático dos experimentos comportamentais da etapa 2 do estudo 1. No dia 1 todos os animais foram treinados em esquiua inibitória normal (EI). No dia 2 todos os animais foram expostos a esquiua inibitória modificada (EIM) por 3 minutos, mas alguns animais foram submetidos a uma exposição de novidade por 5 min, 30 minutos antes da exposição a EIM e alguns animais receberam a infusão de salina, anisomicina ou rapamicina na região CA1, imediatamente após a novidade. No dia 3, metade dos animais em cada grupo foram testados na EI e a outra metade na EIM. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.2.2 Estudo 2: Participação das regiões infra-límbica (IL) e pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventro medial (CPFvm) no efeito facilitatório da reativação sobre a extinção da memória aversiva

Este estudo foi dividido em duas etapas: (i) Ratificação do efeito da reativação sobre a extinção da memória aversiva, e (ii) Estudo da participação de diferentes regiões do córtex pré-frontal (regiões infra e pré-límbica) no efeito da reativação na extinção da memória aversiva.

Para a primeira etapa, vinte ratos Wistar machos adultos foram subdivididos em dois grupos: grupo controle, o qual foi submetido ao protocolo de extinção, e o grupo experimental, que foi submetido à reativação da memória previamente ao protocolo de extinção. Ambos foram treinados na tarefa de Esquiua Inibitória (EI). Vinte e quatro horas após o treino os animais passaram por três sessões de extinção, no entanto parte dos animais foi submetida à reativação da memória aversiva 10 minutos antes do protocolo de extinção, enquanto que o restante dos animais foi submetido diretamente às sessões de extinção. Quarenta e oito horas após o treino,

os animais de ambos os grupos foram testados na EI para verificação da retenção da memória, conforme figura 9A.

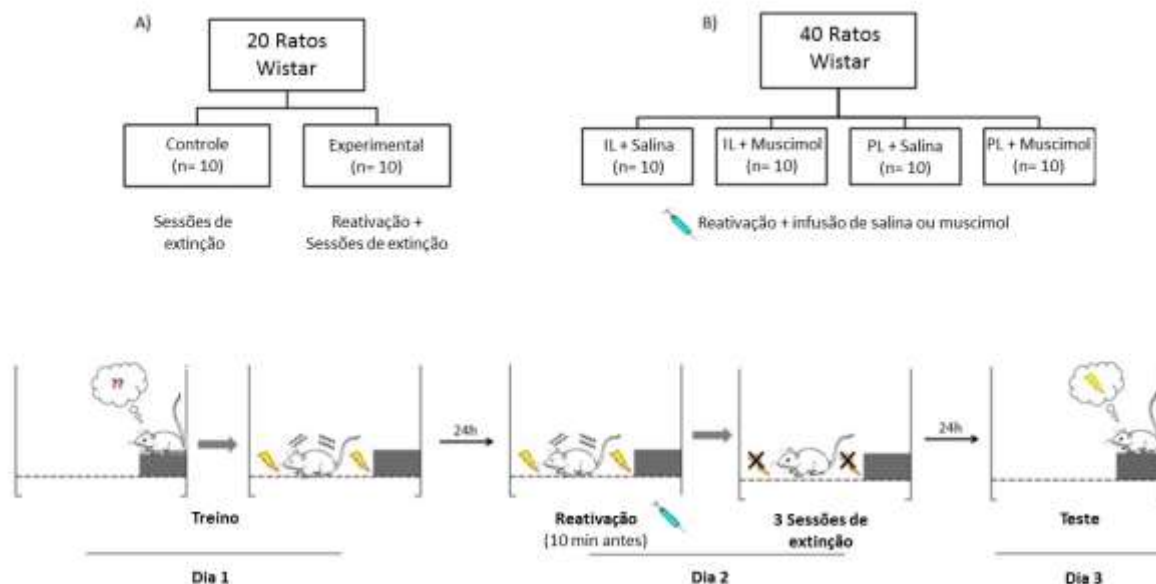


Figura 9. Esquema ilustrativo dos experimentos do estudo 2. (A) Ratificação do efeito da reativação sobre a extinção da memória aversiva, e; (B) Estudo da participação de diferentes regiões do córtex pré-frontal (regiões infra e pré-límbica) no efeito da reativação na extinção da memória aversiva. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Para a segunda etapa deste estudo, quarenta ratos Wistar machos adultos foram subdivididos aleatoriamente em 4 grupos: (i) grupo IL + salina, o qual foi submetido a implantação de cânulas na região IL e recebeu a infusão de salina imediatamente antes da reativação; (ii) grupo IL + muscimol, o qual foi submetido a implantação de cânulas na região IL e recebeu a infusão de muscimol imediatamente antes da reativação; (iii) grupo PL + salina, o qual foi submetido a implantação de cânulas na região PL e recebeu a infusão de salina imediatamente antes da reativação; e, (iv) o grupo PL + muscimol, o qual foi submetido a implantação de cânulas na região PL e recebeu a infusão de muscimol imediatamente antes da reativação. Todos foram submetidos ao mesmo protocolo do grupo experimental da fase 1, porém receberam a infusão de muscimol (0,01 μ g/ μ l), (0,25 μ L/lado) ou salina (0,25 μ L/lado) nas regiões IL ou PL, imediatamente após a reativação da memória (figura 9B). Quarenta e oito horas após o treino, os animais de todos os grupos foram colocados novamente na EI para verificação da retenção da memória.

2.2.3 Estudo 3: A ativação dopaminérgica hipocampal é necessária para modulação da persistência da memória de reconhecimento de objetos por uma sessão de exercício físico

Para os experimentos comportamentais do terceiro estudo 50 ratos Wistar machos foram divididos em 5 grupos, com 10 animais cada: (i) controle, cujos animais foram treinados na tarefa de RO; (ii) familiarização na esteira, cujos ratos foram familiarizados na esteira e treinados na tarefa de RO; (iii) exercício físico, cujos ratos foram familiarizados na esteira, treinados na tarefa de RO e submetidos a uma única sessão de exercício físico em esteira, por 30 minutos, após o treino de RO; (iv) Exercício + SCH 23390, cujos animais passaram pela familiarização na esteira, pela tarefa de RO, foram submetidos ao exercício físico e, imediatamente após, receberam a infusão intrahipocampal de um antagonista de receptores D1 (SCH 23390); e, (v) dopamina, cujos animais passaram pela tarefa de RO e imediatamente após receberam a infusão intrahipocampal de dopamina. Todos os grupos foram testados 24 horas, 7, 14 e 21 dias após o treino, para avaliação da consolidação e persistência da memória (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017) (figura 10).

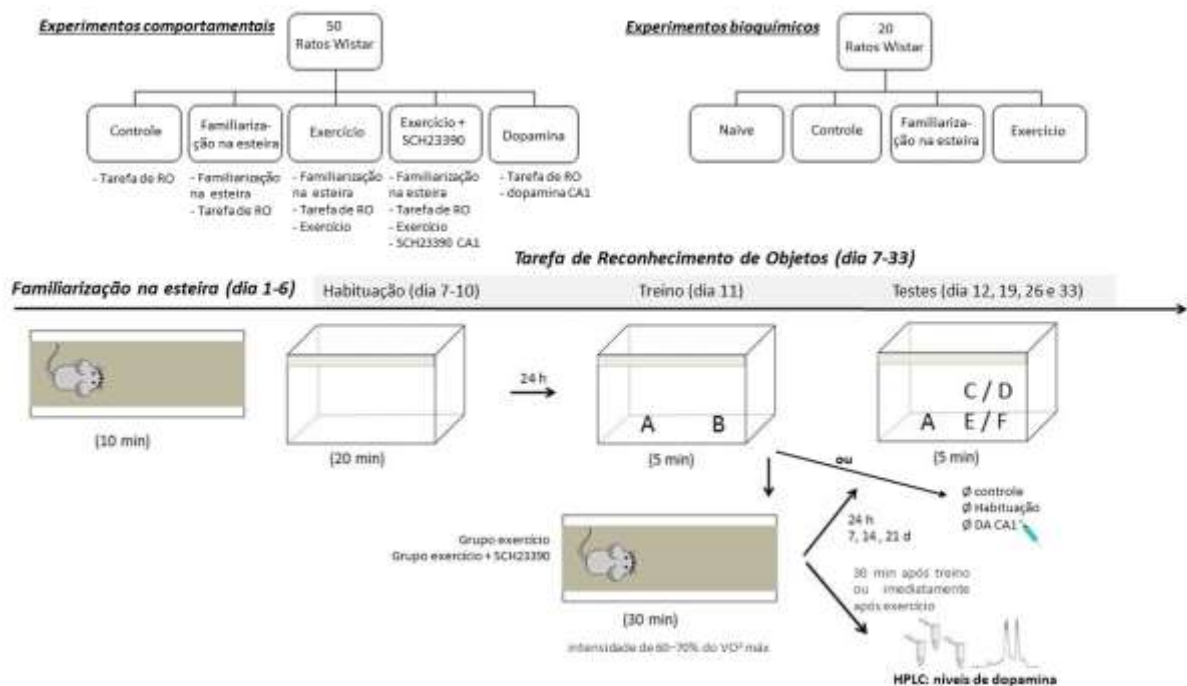


Figura 10. Desenho experimental das etapas desse estudo e resumos dos procedimentos a serem realizados. RO: Reconhecimento de Objetos; Ø: sem exercício físico; DA: dopamina. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Para os experimentos bioquímicos 20 ratos Wistar machos, foram divididos em 4 grupos, com 5 animais cada: (i) naive, cujos animais foram utilizados apenas para mensuração dos

níveis basais dos neurotransmissores; (ii) controle, cujos animais foram treinados na tarefa de RO; (iii) familiarização na esteira, cujos ratos foram habituados na esteira e treinados na tarefa de RO; e, (iv) exercício físico, cujos ratos foram familiarizados na esteira, treinados na tarefa de RO e submetidos a uma única sessão de exercício físico em esteira, por 30 minutos, após o treino de RO. Todos os animais, passados 30 minutos o **treino** da tarefa de RO (exceto grupo *naive*) foram eutanasiados e tiveram seus hipocampos rapidamente dissecados para mensuração dos níveis de dopamina por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (figura 10).

2.3 Procedimentos experimentais

Nesta sessão são descritos os diferentes experimentos utilizados nos estudos que compõem esta tese.

2.3.1 Cirurgia estereotáxica

Parte dos animais foi submetido à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre nas regiões infra e pré límbica do córtex pré-frontal ventro medial ou na região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1986) de AP + 3.0; LL \pm 0.7; DV - 2.0 mm; AP + 3.2; LL \pm 0.7; DV -2.0 mm; e AP -4,2, LL \pm 3,0, DV - 2,0 mm¹, respectivamente (Figura 11). As cânulas foram fixadas com cimento dental e os animais ficaram sob observação para recuperação pós-operatória por 4 dias.

¹ Para a colocação das cânulas-guia foi considerada uma coordenada DV padrão de 2,0 mm para minimizar os danos teciduais. No momento de microinjeção, no entanto, foi utilizada uma microagulha de injeção com tamanho adequado, considerando as coordenadas da região de interesse.

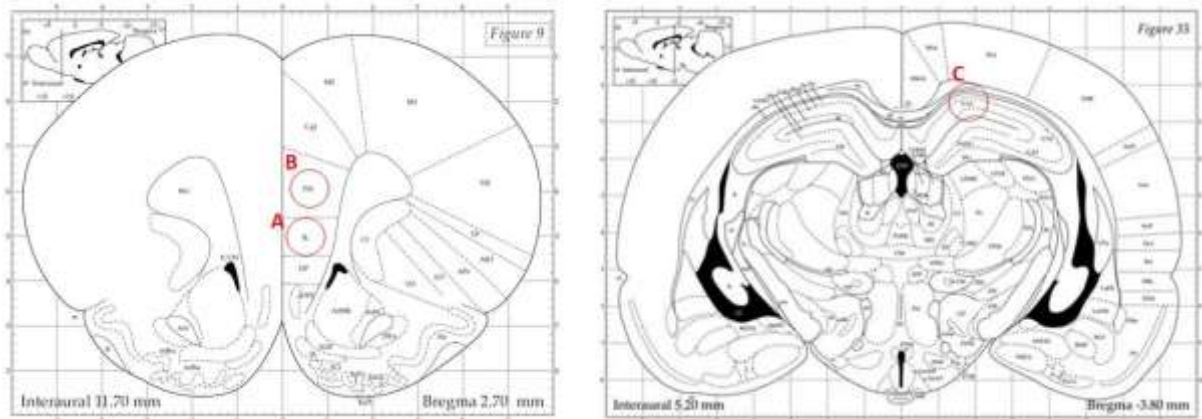


Figura 11. Localização das regiões de implantação das cânulas via cirurgia estereotáxica no encéfalo do rato (corte coronal). (A) Região Infra-límbica do córtex pré-frontal ventro medial, (B) região pré-límbica do córtex pré-frontal ventro medial, em (C) região CA1 do hipocampo. Fonte: (Paxinos and Watson 1986).

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com os animais previamente anestesiados com cetamina e xilazina, administrados intra-peritonealmente (i.p.) nas doses de 75mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Confirmado o plano anestésico do animal, o mesmo foi fixado no aparelho estereotáxico, onde foi feita a assepsia do escalpo com etanol 70% e PVPI e o processo de implantação de cânulas (Figura 12).



Figura 12. Foto do aparato e do animal submetido à cirurgia estereotáxica. Fonte: Foto do próprio autor (2019).

2.3.2 Manipulação dos animais

Quatro dias após o período de recuperação pós cirurgia, os animais passaram por duas sessões de manipulação, onde os mesmos foram levados até a sala de experimentação, foram retirados de suas gaiolas e manuseados durante 5 minutos, para familiarização com o pesquisador, seu contato e seus cheiros. Mesmo aqueles animais não submetidos à cirurgia foram submetidos às sessões de manipulação.

2.3.3 Protocolos comportamentais e farmacológicos

2.3.3.1 Tarefa na Esquiva Inibitória (EI) – consolidação da memória aversiva

O aparato utilizado para a tarefa da EI consiste de uma caixa de metal de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico, assoalho formado por barras de bronze paralelas, contendo ao lado esquerdo da caixa uma plataforma de 5,0 cm de altura por 7,0 cm de largura (Rossato, Bevilaqua et al. 2009) (Figura 13). A tarefa básica consiste em um dia de treino e outro de teste. No dia do treino, o animal é colocado na plataforma e ao descer desta e colocar as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis, recebe um estímulo elétrico de 0,7 mA por 2s, sendo imediatamente recolocado em sua caixa de moradia. No dia do teste, o animal é colocado novamente na plataforma do aparato e se contabiliza o tempo de descida da plataforma (latência). O teste é realizado 24 horas após o dia de treino, ou então, em casos de intervenções, é adaptado e realizado 48 horas após. Este procedimento resulta em uma associação do contexto com o choque elétrico, resultando em aumento da latência de descida da plataforma no dia do teste em comparação ao dia do treino. O teste de EI foi utilizado nos estudos 1 e 2 desta tese.

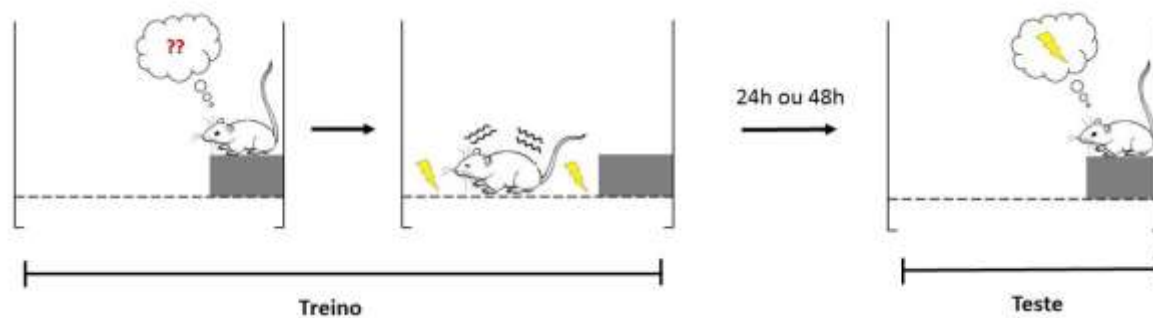


Figura 13. Ilustração do aparato da esquiwa inibitória e tarefa de condicionamento de medo. No dia do treino (dia 1) o animal é colocado na plataforma e ao descer e colocar as 4 patas na barra de ferro ele recebe um estímulo elétrico. No dia do teste (dia 2) o animal é novamente colocado no aparato e avalia-se o seu comportamento. Em ambos os dias é contabilizado o tempo que o animal demora para descer da plataforma. O que se espera, é que no dia do teste o animal demore a descer, visto que lembra do evento aversivo no dia anterior. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.3.3.1.1 Exposição à esquiwa modificada

A esquiwa modificada foi utilizada no estudo 1 desta tese, e remete a um ambiente similar ao original (EI utilizada no treino), tendo as mesmas características citadas no item 3.3.3.1, e, adicionalmente, (a) um assoalho preto, (b) duas listras pretas horizontais na parede frontal de acrílico, (c) aroma cítrico, e (d) luz vermelha projetada sob o aparato, conforme figura 14. Os animais foram colocados na EI modificada e ao descer da plataforma e colocar as quatro patas no assoalho, os animais não receberam o estímulo elétrico e puderam explorar o aparato por 3 minutos (Vargas et al, 2019). A exposição a este aparato é utilizada para posterior verificação da capacidade de diferenciar os dois ambientes, i.e., da generalização da memória aversiva.

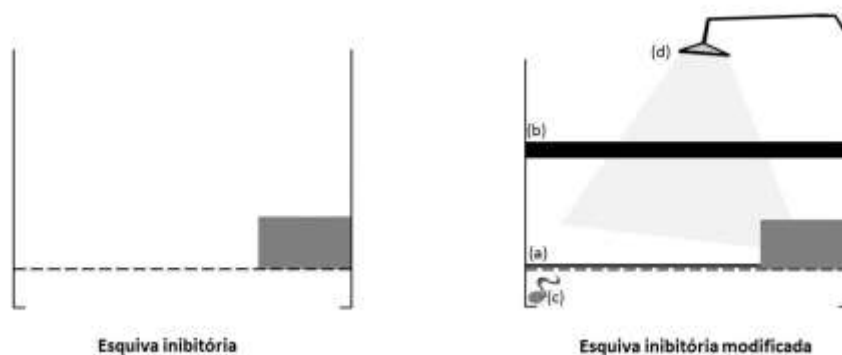


Figura 14. Ilustração da esquiwa inibitória e esquiwa inibitória modificada. A esquiwa modificada apresenta (a) um assoalho preto, (b) duas listras pretas horizontais na parede frontal de acrílico, (c) aroma cítrico, e (d) luz vermelha projetada sob o aparato e é utilizada para verificar a generalização da memória aversiva. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.3.3.1.2 Exposição à novidade

A exposição à novidade, utilizada no estudo 1 desta tese, refere-se a um momento no qual os animais são expostos a algo novo por um determinado tempo. Neste trabalho adotamos um ambiente novo (novidade), sendo este um campo aberto, i.e., uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a parede frontal de vidro transparente (figura 15) (de Carvalho Myskiw, Benetti et al. 2013; de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2014). Os grupos expostos à novidade, foram submetidos à exploração da caixa 30 minutos antes da exposição à EI modificada, durante 5 minutos.

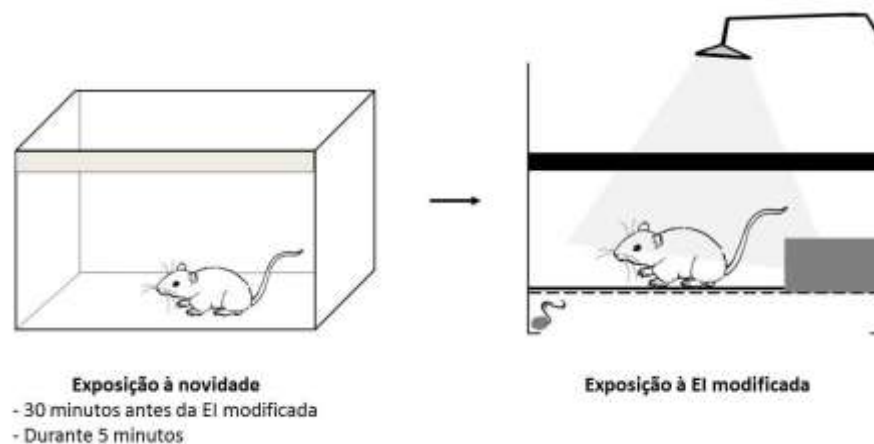


Figura 15. Ilustração da exposição à novidade previamente à exposição a Esquiva Inibitória Modificada (EIM). Os animais foram expostos à novidade (campo aberto) 30 minutos antes de serem submetidos a exposição à EIM, podendo explorar o ambiente novo por 5 minutos. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.3.3.1.3 Extinção da memória aversiva

Para extinguir a memória aversiva, os animais envolvidos nos experimentos de extinção (estudo 2) foram submetidos à sessões de testes sem reforço (sem estímulo elétrico) em diferentes tempos após o treino: 24 horas, 25 horas e 30 minutos e 27 horas após o treino (Cammarota, Bevilaqua et al. 2005) (figura 16). Com este propósito, em cada sessão os animais foram colocados na plataforma da caixa de treino até que eles descessem com as quatro patas na grade. Nenhum choque foi dado e os animais puderam explorar livremente o aparato de EI por 30 segundos antes de serem devolvidos às suas caixas moradia. Foi imposto um teto temporal de 300 segundos como latência de descida da plataforma durante os testes sem reforço (24h, 25h30min e 27h). Desta forma, caso os animais não descessem nesse tempo, os mesmos eram gentilmente conduzidos até a base do aparato e permitida a livre exploração do mesmo

por 30 segundos. Com as sessões de extinção, espera-se os animais aprendam que descer da plataforma não resulta mais em estímulo elétrico/aversivo.

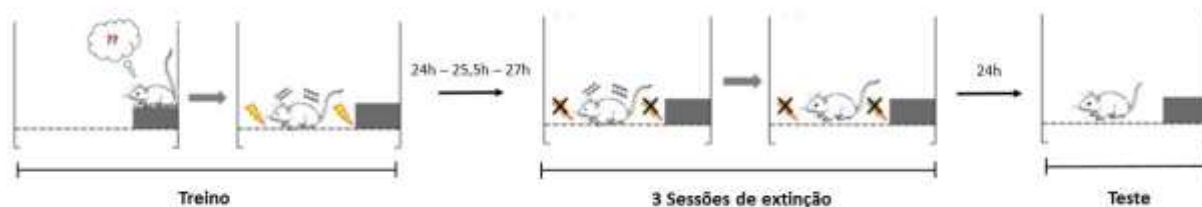


Figura 16. Ilustração do aparato e sessões de extinção. No dia do treino (dia 1) o animal é colocado na plataforma e ao descer e colocar as 4 patas na barra de ferro ele recebe um estímulo elétrico. No dia das sessões de extinção (dia 2), o animal é colocado no aparato em três momentos, 24 horas, 25 horas e 30 minutos e 27 horas após o treino, e ao descer da plataforma ele não recebe o estímulo elétrico e é permitido explorar o ambiente durante 30 segundos. No dia do teste (dia 3), o animal é novamente colocado no aparato e avalia-se o seu comportamento. Em cada sessão é contabilizado o tempo que o animal demora para descer da plataforma. O que se espera é que, se o animal foi capaz de aprender nas sessões de extinção, no dia do teste ele não demore a descer da plataforma, visto que ele extinguiu a memória aversiva. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.3.3.1.4 Reativação da memória aversiva

A reativação da memória aversiva, que foi realizada em alguns grupos de animais do estudo 2, é feita mediante a exposição do animal ao ambiente aversivo no qual foi previamente condicionado, com o reforço do estímulo elétrico. Nessa pesquisa nós avaliamos o efeito da reativação sobre o processo de extinção da memória. Para isso, os animais passaram pelo mesmo protocolo de extinção previamente descrito (item 3.3.3.1.1), porém parte dos animais foi submetido a reativação da memória 10 minutos antes da primeira sessão de extinção, conforme a figura 17.

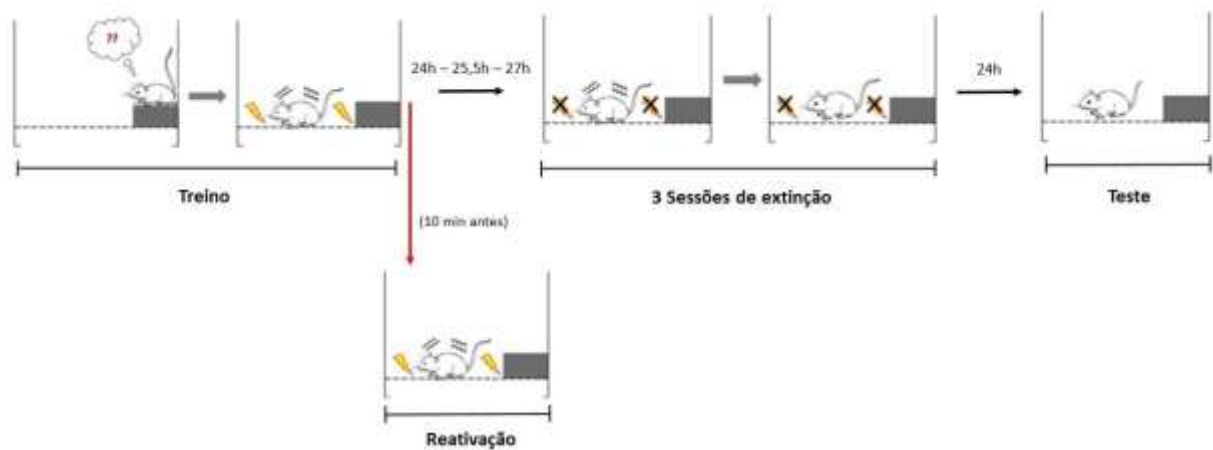


Figura 17. Ilustração do aparato e reativação da memória aversiva. No dia do treino (dia 1) o animal é colocado na plataforma e ao descer e colocar as 4 patas na barra de ferro ele recebe um estímulo elétrico. No dia das sessões de extinção (dia 2), 10 minutos antes da primeira sessão, o animal é colocado no aparato de EI e a reativação da memória é feita por meio do estímulo elétrico, após isso, o animal é colocado no aparato em três momentos: 24 horas, 25 horas e 30 minutos e 27 horas após o treino, e ao descer da plataforma ele não recebe o estímulo elétrico e é permitido explorar o ambiente durante 30 segundos. No dia do teste (dia 3), o animal é novamente colocado no aparato e avalia-se o seu comportamento. Em ambos os dias é contabilizado o tempo que o animal demora para descer da plataforma. O que se espera, é que no dia do teste os animais que passaram pela reativação da memória demorem menos a descer do que o grupo sem a reativação, visto que a reativação deve facilitar o processo de extinção. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.3.3.2 Tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO)

A tarefa de RO foi utilizada no terceiro estudo que compõe esta tese. Ela é realizada em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a parede frontal de vidro transparente conforme descrito por (Ennaceur and Delacour 1988) e consiste em três etapas: habituação ao aparato, treino e teste(s) (Figura 18). Na habituação os animais foram colocados durante 4 dias consecutivos no aparato para livre exploração, durante 20 minutos. Posteriormente a isso, no dia de treino, dois objetos (A e B) foram colocados dentro do aparato, e os animais são autorizados a explorá-los por 5 minutos. A exploração é definida como cheirar ou tocar os objetos com o nariz e/ou patas dianteiras. Sentar sobre ou ficar girando os objetos sem interagir com eles não é considerado comportamento exploratório. Vinte e quatro horas, 7, 14 e 21 dias mais tarde, na fase de teste, um dos objetos foi substituído aleatoriamente por um objeto novo (denominado C, D, E ou F, respectivamente) e os ratos foram reintroduzidos no aparato durante um período adicional de 5 minutos de exploração livre. Para evitar confusões por estímulos olfatórios persistentes e preferências, os objetos e o aparato foram limpos com etanol a 70% após testar cada animal.

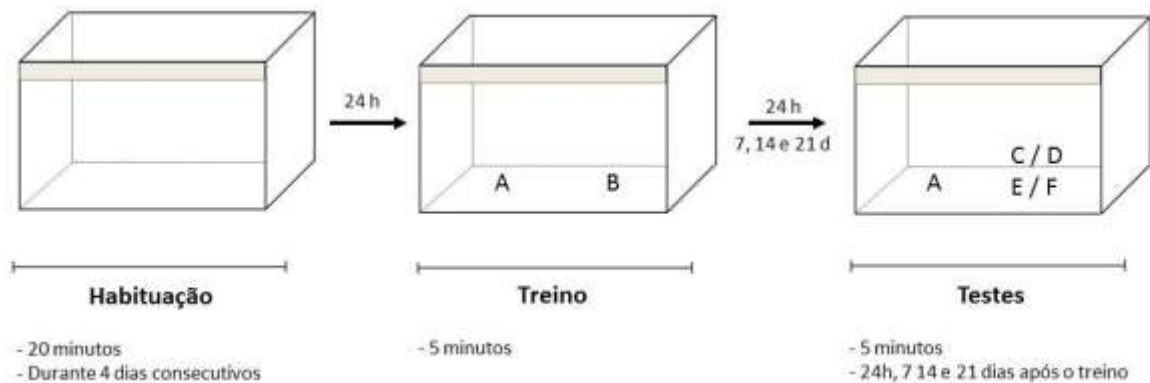


Figura 18. Ilustração da tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO). Durante quatro dias consecutivos os animais passaram pela fase de habituação, quando foram colocados no aparato com permissão para livre exploração durante 20 minutos para se familiarizar com ele. No dia do treino, os animais foram colocados no mesmo aparato, no entanto nele continha dois objetos novos (A e B) para livre exploração durante 5 minutos. Nos dias de testes, os animais foram colocados no mesmo aparato contendo sempre um objeto familiar (A) e um objeto novo (C, D, E ou F, 24 horas, 7, 14 ou 21 dias após o treino, respectivamente) para avaliar a consolidação e a persistência da memória, tendo os mesmos 5 minutos para livre exploração. No teste do RO espera-se que o animal explore mais o objeto novo do que o objeto familiar, denotando capacidade de reconhecer o objeto familiar. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.3.3.3 Protocolo de exercício físico

No estudo 3, uma sessão de exercício físico individual foi realizada imediatamente após o treino na tarefa de RO, usando uma esteira motorizada construída para roedores (Insight Ltda, São Paulo, Brasil). O protocolo utilizado foi adaptado de (Malek, Huttemann et al. 2013), em que o exercício de corrida foi realizado na intensidade de 60–70% de consumo máximo de oxigênio (VO_2) (velocidade da esteira entre 9 m/min e 13 m/min) em uma única sessão de exercício físico, com duração de 30 minutos, realizada imediatamente após a aprendizagem na tarefa de RO.

Anteriormente às tarefas de memória, os ratos foram familiarizados à esteira para evitar efeitos de novidade e/ou estresse no momento da sessão de exercício. Para isso, a familiarização foi conduzida uma semana antes do início da tarefa de memória. Inicialmente, os ratos foram familiarizados à esteira por dois dias (velocidade da esteira 2 a 5 m/min por 10 min). Depois, eles foram submetidos ao “protocolo do bom corredor”, o qual consiste em colocar os animais em esteira sem inclinação durante três dias consecutivos com uma velocidade de 8 m/min por 10 min, e, em seguida, avaliar o nível de treinabilidade em um intervalo de 1 a 5 pontos de acordo com a tabela 1. Ao final, os animais que mantiveram uma média de três ou mais pontos

são incluídos no grupo de exercício (Arida, Scorza et al. 2011). Alguns ratos passaram somente pelo processo de familiarização, mas no dia de treino do RO não realizaram a sessão de exercício físico (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017); este grupo foi incluído a fim de isolar possíveis efeitos do contato com a esteira (familiarização) *per se*, pois poderia se argumentar que os dias de familiarização ao aparato representariam um certo nível de treinamento físico.

Tabela 1. Escala de avaliação do nível de treinabilidade dos ratos durante o protocolo do bom corredor.

Fonte: Adaptada de (Arida, Scorza et al. 2011).

<i>Pontuação</i>	<i>Característica durante a corrida</i>
<i>1</i>	Recusa-se a correr
<i>2</i>	Abaixo da média dos corredores - executa e para ou corre na direção errada
<i>3</i>	Corredor médio
<i>4</i>	Acima da média - corre bem, com paradas esporádicas
<i>5</i>	Bom corredor - sempre fica na frente

No dia seguinte (último dia da familiarização), os ratos selecionados como “bons corredores” passaram por um teste indireto de VO₂ máximo, para determinarmos a intensidade individual de cada animal no dia do exercício físico. O teste indireto de VO₂ máximo foi conduzido na esteira rolante, inicialmente com uma baixa velocidade, que foi aumentada em 5 m/min a cada 3 min, até que o rato fosse incapaz de continuar correndo. O tempo para fadiga (min) e o volume de trabalho (m/min) foram considerados como uma medida indireta de VO₂ (Brooks and White 1978; Cechetti, Worm et al. 2012). Na sessão de exercício físico individual cada animal do grupo exercício foi submetido a uma corrida após o treino do RO a uma intensidade de 60-70% do VO₂ máximo indireto, durante 30 minutos.

Nós nomeamos os dois dias de familiarização à esteira mais os três dias do protocolo bom corredor e o dia do teste da medida indireta do VO₂ máximo como “Familiarização à esteira”. A figura 19 ilustra o esquema da sequência do protocolo de exercício físico e sua execução.

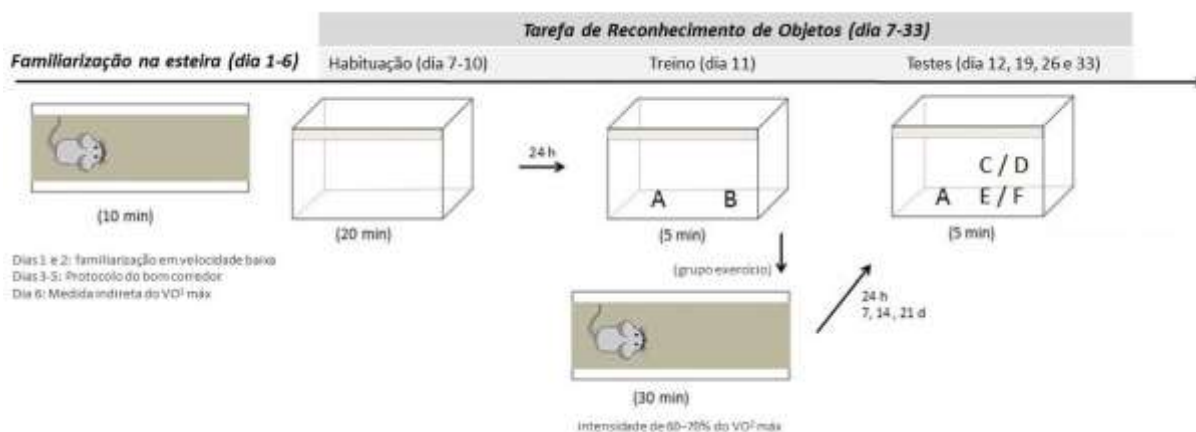


Figura 19. Ilustração do protocolo de exercício físico e sua execução. Previamente a tarefa de reconhecimento de objetos (RO) os animais passaram pela familiarização à esteira (dias 1-6). Posteriormente, deu-se início a tarefa de RO, a qual consiste em três fases: habituação (dias 7-10), treino (dia 11) e testes (24 horas, 7, 14 e 21 dias após o treino; dias 12, 19, 26 e 33). Os animais do grupo exercício foram submetidos à uma única sessão de exercício físico, durante 30 minutos, realizada imediatamente após o treino de RO. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

3.3.3.4 Tratamento farmacológico

Os diferentes estudos incluíram grupos que receberam microinfusão de fármacos em regiões cerebrais específicas. Os compostos farmacológicos utilizados ou o seu veículo foram infundidos bilateralmente na região de interesse, em diferentes tempos, conforme o estudo, com o auxílio de uma bomba de infusão e micro seringas Hamilton.

O volume administrado foi de 1 µl/lado para a região CA1 do hipocampo e 0,25 µl/lado para as regiões infra e pré-límbica do córtex pré-frontal, que têm menor tamanho (figura 20). As micro agulhas de infusão tinham tamanhos específicos de acordo com as coordenadas da região de interesse, e foram mantidas dentro das cânulas-guia por pelo menos 60s após o fim da administração da droga, a fim de evitar o refluxo de líquido.

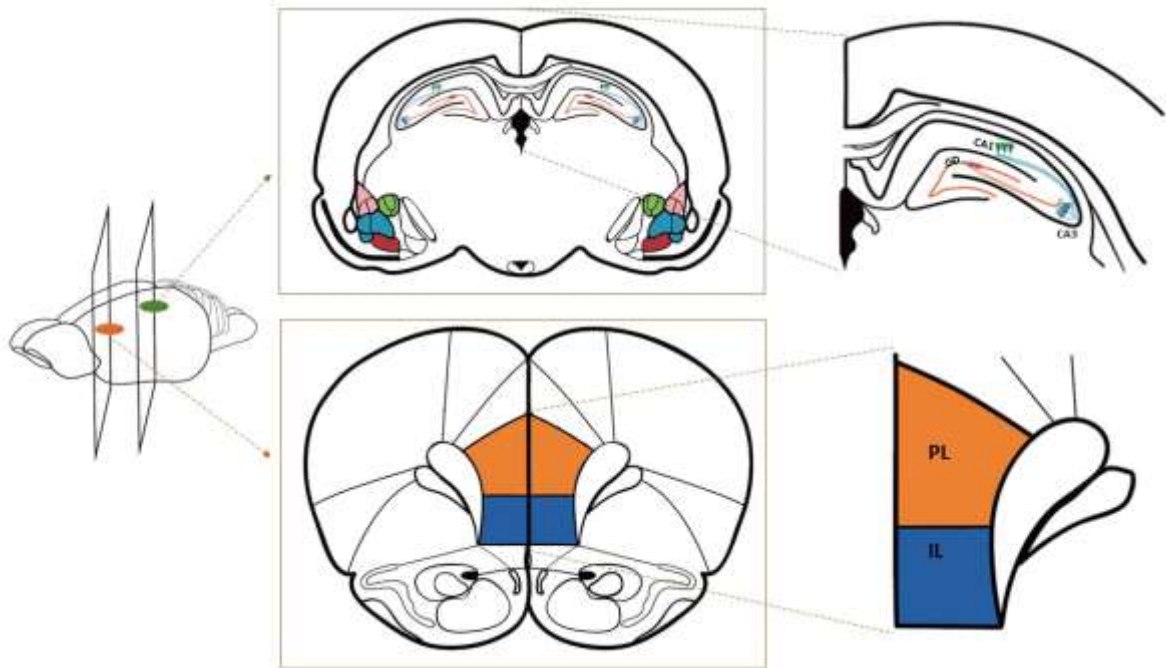


Figura 20. Localização das regiões de infusão das drogas e veículo de acordo com o estudo realizado. CA1: Região CA1 do hipocampo dorsal, do latim Cornu ammonis (Corno de Ammon); GD: giro denteado; CA3 Região CA3 do hipocampo dorsal, do latim Cornu ammonis (Corno de Ammon); PL: Região Pré-límbica do córtex pré-frontal; IL: Região Infra-límbica do córtex pré-frontal. Fonte: Adaptada de (Izquierdo, Furini et al. 2016).

Todas as drogas utilizadas foram obtidas da Sigma-Aldrich Brasil e dissolvidas individualmente em DMSO 2% ou em solução salina 0,9% e guardadas protegidas da luz a -20°C até o uso. A infusão do composto foi realizada à temperatura ambiente e em uma sala com baixa luminosidade. As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios que mostraram o efeito destes fármacos sobre o aprendizado e a memória de ratos, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas.

As drogas que utilizadas neste estudo foram as seguintes:

- Rapamicina: Inibidor da síntese proteica mediada por mTOR. Foi utilizada no estudo 1, em dose definida com base em (de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2015).

- Anisomicina: Inibidor da tradução da proteína ribossomal. Foi utilizada no estudo 1, em dose definida com base em (de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2015).

- Muscimol: Ligante do sítio GABA dos receptores gabaérgicos tipo A, portanto, mimético daquele, o principal neurotransmissor inibitório do cérebro. Foi utilizada no estudo 2, em dose definida com base em (de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2015).

- SCH23390: Antagonista dopaminérgico (receptores D1). Foi utilizada no estudo 3, em dose definida com base em (Furini, Myskiw et al. 2014).

- Dopamina: Agonista dopaminérgico. Foi utilizada no estudo 3, em dose definida com base em (Furini, Myskiw et al. 2014).

Ao final dos experimentos foi feito o controle histológico da região estudada, por meio da análise *post mortem* do posicionamento anatômico das cânulas implantadas. Para isso, os animais receberam a infusão de azul de metileno no mesmo volume de droga usado em cada uma das estruturas mencionadas anteriormente através das mesmas cânulas. Passados 15 minutos da infusão os animais foram eutanasiados por decapitação e seus encéfalos foram retirados e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 dias. Após, foi realizada a análise histológica da área, sendo a difusão do corante tomada como uma indicação da difusão presumível do veículo ou droga anteriormente administrada a cada animal *in vivo*. Apenas os dados de animais com implantes corretos e sem propagação significativa do corante aos tecidos das estruturas adjacentes foram analisados.

2.3.3.5 Testes de controle comportamental

Nos diferentes estudos foram empregados testes de controle comportamental. Este tipo de teste é importante pois nos permite avaliar se as intervenções adotadas causam alterações em parâmetros do comportamento que poderiam afetar a expressão da memória nas tarefas de memória, a citar: ansiedade, comportamento locomotor, e sensibilidade algica.

2.3.3.5.1 Campo Aberto

Para avaliar se a administração dos fármacos e/ou as estratégias comportamentais influenciaram a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais no dia do teste, comprometendo a avaliação dos nossos resultados, utilizamos a análise do comportamento de locomoção/exploração no esquema conhecido como “campo aberto” (Bonini, Bevilaqua et al. 2006). Utilizou-se a mesma caixa utilizada para o estudo dos efeitos da novidade (ver acima). O assoalho da caixa foi dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. No dia seguinte à infusão da droga na região específica e/ou estratégia comportamental, o animal foi gentilmente colocado na arena do campo aberto, a qual ele pode explorar livremente por 5 min. Durante este tempo registrou-se o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras, comportamentos que nos roedores denotam locomoção e exploração (Bonini, Bevilaqua et al. 2006) (figura 21).

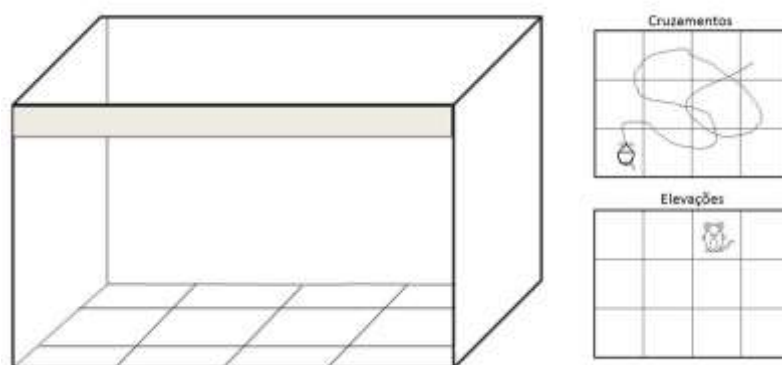


Figura 21. Ilustração da tarefa no campo aberto. O animal é colocado na arena da caixa e se contabilizam quantos cruzamentos e elevações ele realiza durante 5 minutos. Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

2.3.3.5.2 Labirinto em cruz elevado

Para avaliar se a administração dos fármacos e/ou as estratégias comportamentais influenciaram o estado de ansiedade dos animais no dia do teste, utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura; dois braços contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. No dia seguinte à infusão da droga na região específica e/ou estratégias comportamentais, o animal foi colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 minutos. Registrou-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados e o número de entradas nestes braços (Pellow, Chopin et al. 1985) (figura 22).

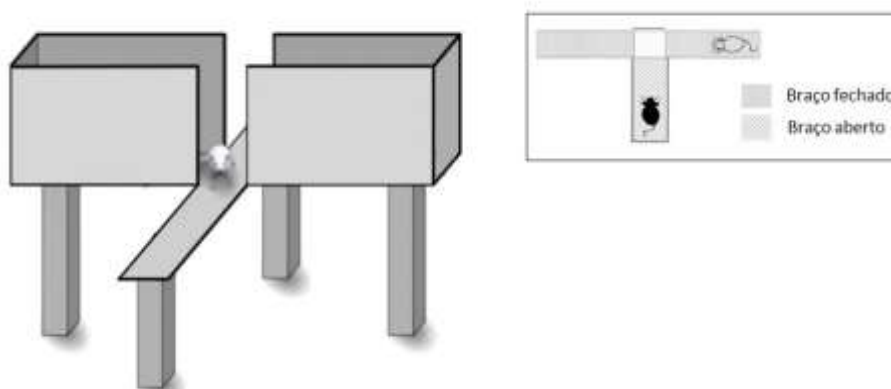


Figura 22. Ilustração da tarefa no Labirinto em Cruz Elevado. No dia do teste o animal é colocado no centro do aparato e se avalia a permanência do mesmo nos braços abertos e fechados, bem como o número de entrada neles, durante 5 minutos. Fonte: Adaptado de commons.wikimedia.org (2018).

2.3.3.5.3 Hot Plate

Para avaliar a integridade da resposta nociceptora e sensibilidade das patas dos animais foi utilizado o teste de Hot Plate. O procedimento consiste na colocação do animal em um aparato que possui uma chapa metálica aquecida ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e avaliar o tempo de permanência do animal até o mesmo reagir ao estímulo térmico levantando ou lambendo as patas (Tita, Abdel-Haq et al. 2001). O tempo máximo permitido para a permanência dos animais na superfície quente foi de 30 segundos, afim de evitar lesões nas patas.

2.3.4 Protocolo bioquímico para determinação dos níveis de dopamina

A determinação dos níveis de dopamina no hipocampo, realizada no estudo 3, foi feita por meio de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) em homogenatos preparados a partir do hipocampo usando um sistema de HPLC de fase reversa (YL9100, Young Lin). O cérebro dos ratos foi removido e os hipocampos foram rapidamente dissecados em uma superfície gelada, e então homogeneizados em TrisHCl 50 mM, pH 7,4 (1/10, p/v). Depois disso, as amostras foram centrifugado a 2400g durante 20 min; os sobrenadantes foram filtrados e armazenado a -80°C até o uso (Nirogi, Abraham et al. 2012; Menezes, Alves et al. 2015). O sistema de HPLC consistiu de um degaseificador a vácuo (YL9101) e bomba quaternária (YL9110) conectada coluna de fase inversa (SYNERGI 4i FUSION-RP 80 Å 250 x 4,60 mm; Fenomenex) em um compartimento de coluna (YL9131) acoplado a um detector de matriz de diodo (YL9160). A fase móvel consistiu em metanol e água (12/88, v/v) ajustado para pH 3 com ácido fosfórico. Para separar a dopamina, usamos a programação isocrática com um caudal de 0,8 ml/min. A amostra foi filtrada com filtros de seringa de 0,22 μm . Nós injetamos 20 amostras de mL no sistema de HPLC por um dispositivo de amostragem automática (YL9150). A detecção foi em 198 nm por DAD. Os cromatogramas foram gravados e integrados por software (YLClarity). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os parâmetros analisados foram os seguintes: intervalo linear, 0,1-10,0 $\mu\text{g/ml}$; determinação coeficiente 0,999; e equação de calibração $y = 628,12 x = 34,342$. A dopamina para HPLC foi fornecida pela Sigma-Aldrich Brasil. Outros reagentes analíticos usados neste experimento foram obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do programa Excel for Windows® e Prism version 5 (GraphPad Software®, San Diego, CA). Em cada estudo,

inicialmente foi testada a normalidade dos dados e, posteriormente a essa análise, foi adotado um teste estatístico paramétrico ou não-paramétrico.

Para a tarefa da EI, utilizada nos estudos 1 e 2, um teto de 300 segundos foi imposto às latências durante os testes de retenção (latências iguais ou superiores a 300 segundos foram calculadas como 300 segundos). Esta variável não seguiu uma distribuição normal e foi analisada pelo teste U de Mann-Whitney (comparações entre dois grupos) ou ANOVA não-paramétrica de Kruskal-Wallis (comparações entre mais de dois grupos), seguida pelo teste *post-hoc* de Dunn. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar as diferenças de latência de descida da plataforma entre o treino e o teste em cada grupo (intragrupo). Os dados da EI foram expressos por mediana \pm intervalo interquartil.

Para a análise dos resultados da tarefa de RO, utilizada no estudo 3, o tempo de exploração de cada objeto na tarefa RO foi convertido em porcentagem do total tempo de exploração e utilizamos o Teste t de uma amostra para comparar a porcentagem do tempo total de exploração gasto em cada objeto com uma média teórica de 50%. Adicionalmente, o índice de discriminação (ID) nos testes de 24 h, 7, 14 e 21 dias foi calculado pela diferença de tempo gasto explorando o novo (T novo) e os objetos familiares (T familiar): $ID = [(T \text{ novo} - T \text{ familiar}) / (T \text{ novo} + T \text{ familiar}) \times 100 (\%)]$, e usado como parâmetro de memória (Flores, Martins et al. 2014). Os dados do ID foram comparados entre os grupos usando ANOVA de uma via seguido por testes-t. Utilizamos o teste de medidas repetidas de Friedman para avaliar o ID de cada grupo ao longo dos dias de teste. Os dados foram expressos como média \pm DP.

Para a análise dos testes de controle comportamental utilizou-se ANOVA de uma via.

Para os resultados do HPLC, realizado no estudo 3, utilizamos ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm DP.

O tamanho da amostra (n, número de animais em cada grupo) para cada experimento está descrito nas legendas das figuras. Em todas as análises as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$.

3.5 Aspectos éticos

Todos os experimentos de cada um dos 3 estudos que compõem esta tese foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa, sob os números 027/2013, 001/2017 e 020/2017 (ANEXO I, II e III).

III RESULTADOS

Nesta sessão são apresentados os resultados em cada um dos estudos que compõem esta tese, separadamente.

3.1 Estudo 1: A exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva, efeito que é dependente da síntese de proteínas no hipocampo

3.1.1 A exposição à novidade evita generalização da memória aversiva

Nesta etapa nós testamos o efeito da exposição a um ambiente novo na generalização da memória aversiva. Para isso, os animais foram divididos em dois grupos: (i) controle: ratos submetidos a tarefa de EI (dia 1) e exploração da EIM (dia 2); e, (ii) novidade: ratos submetidos a tarefa de EI (dia 1), exposição à novidade e exploração da EIM (dia 2). Ambos os grupos passaram pelas sessões de testes no dia seguinte (dia 3). De um modo geral podemos observar na figura 23, que os animais expostos à novidade antes da EIM no dia 2 não apresentaram generalização da memória aversiva, enquanto os outros foram incapazes de diferenciar os dois contextos utilizados no primeiro conjunto de experimentos (figura 23). Não houve diferença entre os grupos no dia do treino na EI ($U = 144$, $P = 0,58$, Fig. 23 – Treino EI, Dia 1; $n = 20$ /grupo). Dentro os animais testados na EI, ambos os grupos apresentaram a memória aversiva, demonstrando que todos aprenderam a tarefa. Não houve diferenças entre os grupos neste teste ($U = 31$, $P > 0,99$, Fig. 23 - teste EI Dia 3; $n = 10$ /grupo); ainda, ambos os grupos apresentaram maior latência no dia do teste em comparação com o dia de treino ($W = 24$, $P = 0,04$ para o grupo controle; $W = 34$; $P = 0,04$ para o grupo novidade; Figura 23 - teste EI Dia 3; $n = 10$ / grupo). Já no dia do teste realizado na EIM foram observadas diferenças entre os grupos ($U = 9,00$, $P = 0,01$, Fig. 23 - Teste EIM Dia 3; $n = 10$ /grupo). Além disso, o grupo controle apresentou uma latência de descida significativamente maior que no dia do treino quando testado na EIM, enquanto o grupo exposto à novidade não ($W = 28$, $P = 0,01$ para o grupo controle; $W = 13$; $P = 0,47$ para o grupo novidade; Fig. 23 - Dia do teste EIM Dia 3; $n = 10$ /grupo).

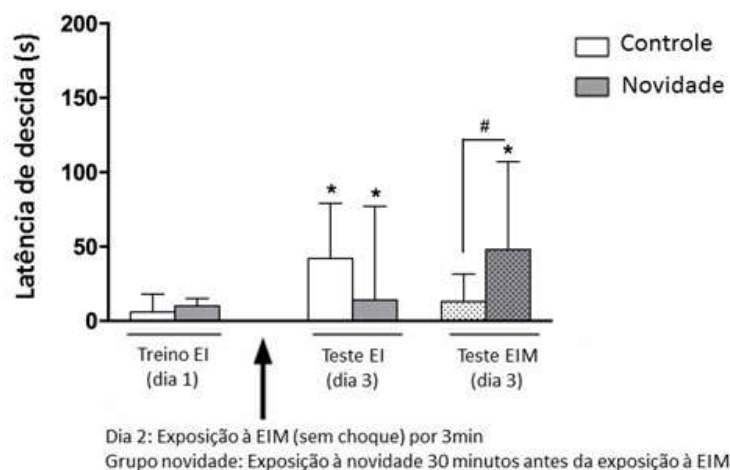


Figura 23. A exposição à novidade evita a generalização da memória aversiva. No dia 1, todos os ratos foram treinados na EI. No dia 2 todos os ratos foram submetidos a EIM, explorando-a por 3 min; os ratos do grupo novidade foram expostos a uma novidade por 5 min, 30 min antes da exploração da EIM. No dia 3, metade dos ratos de cada grupo foi testada na EI e a outra metade na EIM. Os dados representam a latência de descida em EI ou EIM, expressa como mediana \pm intervalo interquartil ($n = 10$ animais por grupo). * $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treino vs. teste); # $P \leq 0,05$ no teste U de Mann-Whitney (comparações dos grupos em cada dia de experimento). Fonte: produzida pelo próprio autor (2019).

3.1.2 Os efeitos da novidade na generalização da memória aversiva dependem da síntese proteica no hipocampo

Nesta etapa nós testamos o envolvimento da síntese proteica hipocampal no efeito da novidade sobre a generalização da memória aversiva. Para isso, os animais foram divididos em 4 grupos: (i) controle: ratos submetidos à tarefa de EI (dia 1) e exploração da EIM (dia 2); (ii) novidade: ratos submetidos à tarefa de EI (dia 1), exposição à novidade e exploração da EIM (dia 2); (iii) novidade + Ani: ratos submetidos à tarefa de EI (dia 1), exposição à novidade com subsequente infusão de Anisomicina (um inibidor da tradução ribossomal, 80 $\mu\text{g}/\text{lado}$) na região CA1 do hipocampo e exploração da EIM (dia 2); e, (iv) novidade + Rapa: ratos submetidos à tarefa de EI (dia 1), exposição à novidade com subsequente infusão de Rapamicina (um inibidor da síntese de proteínas mediada por mTOR, 5 pg/lado) na região CA1 do hipocampo e exploração da EIM (2). Todos os grupos passaram pelas sessões de testes no dia seguinte (dia 3).

De um modo geral, podemos observar na figura 24 que os ratos expostos à novidade antes da EIM não apresentaram generalização da memória aversiva, como observado no grupo controle. No entanto, quando os ratos expostos à novidade recebem a infusão intrahipocampal de Anisomicina ou Rapamicina imediatamente após a exposição da novidade, eles apresentam

generalização, o que indica que o efeito da novidade depende da síntese proteica do hipocampo. Não houve diferenças entre os grupos no dia do treino na EI ($H_{(4)} = 3,4$, $P = 0,33$, Fig. 24A - treino/teste na EI; $H_{(4)} = 5,33$, $P = 0,14$, Fig. 24B - treino/teste na EIM). No dia de teste realizado na EI, todos os grupos apresentaram memória aversiva preservada, não havendo diferenças entre os grupos ($H_{(4)} = 1,61$, $P = 0,65$, Fig. 24A - teste na EI); ainda, todos os grupos apresentaram maior latência no dia do teste em comparação com o treino ($W = 36$, $P = 0,007$ para o grupo controle; $W = 28$; $P = 0,01$ para o grupo novidade; $W = 21$; $P = 0,03$ para o grupo novidade + Ani; $W = 21$, $P = 0,03$ para o grupo novidade + Rapa, Fig. 24A - teste na EI). No teste realizado na EIM observaram-se diferenças entre os grupos ($H_{(4)} = 14,57$, $P = 0,002$, Fig. 24B - teste na EIM), sendo a latência de descida do grupo novidade menor que as demais. Apenas o grupo de novidade não mostrou diferenças entre na comparação entre a latência de descida da plataforma no dia do teste na EIM e o dia de treino na EI ($W = 21$, $P = 0,03$ para o grupo controle; $W = -2,0$; $P = 0,75$ para o grupo novidade; $W = 21$; $P = 0,03$ para o grupo novidade + Ani; $W = 21$, $P = 0,03$ para o grupo novidade + Rapa, Fig. 24B - teste na EIM).

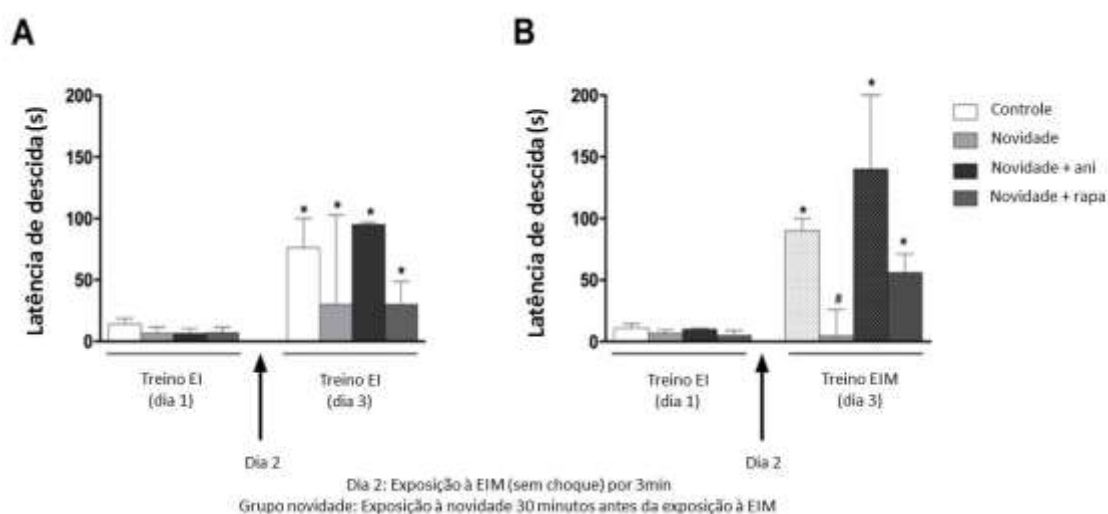


Figura 24. A infusão de anisomicina e rapamicina na região CA1 do hipocampo após a exposição à novidade impedem o efeito da novidade na prevenção de generalização de memória. No dia 1, todos os ratos foram treinados na EI. No dia 2 todos os ratos foram submetidos à exploração da EIM por 3 min; os grupos novidade, novidade + ani e novidade + rapa foram expostos a uma novidade por 5 min, 30 min antes da exploração da EIM; os grupos novidade, novidade + ani e novidade + rapa receberam infusão de veículo, anisomicina ou rapamicina imediatamente após a exposição à novidade. No dia 3, metade dos ratos de cada grupo foram testados na EI (A) e a outra metade na EIM (B). Os dados representam a latência de descida na EI (teste A) ou EIM (teste B) expresso como mediana \pm intervalo interquartil ($n = 10$ animais por grupo). * $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treino vs. teste); # $P \leq 0,05$ em ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido de post-hoc de Dunn. Fonte: produzida pelo próprio autor (2019).

3.1.3 As drogas e veículo infundidos no hipocampo e a exposição à novidade não aumentam a ansiedade nem alteram o comportamento locomotor e exploratório, ou a percepção nociceptora dos animais

Os ratos foram testados nos testes de CA, LCE e HP após infusões de salina, anisomicina e rapamicina e a exposição à novidade para verificar se as atividades exploratória e locomotora, ansiedade e limiares de dor, respectivamente, foram afetados pelas infusões de drogas ou veículo ou pela estratégia comportamental (novidade). A realização dos testes de controle comportamental foi feita no dia 3, após a realização dos testes na EI ou EIM. Não houve diferença estatística quando comparados os grupos quanto ao número de cruzamentos e elevações em campo aberto, número de entradas e permanência nos braços abertos do LCE e latência de retirada da pata em HP (Tabela 2; $P = 0,58$, $P = 0,48$, $P = 0,56$, $P = 0,88$ e $P = 0,98$, respectivamente).

Tabela 2. Nem a droga ou o veículo nem a novidade afetaram o desempenho no CA LCE e HP. Os dados são expressos como média \pm DP do número de cruzamentos e levantamentos (CA), o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos (LCE) e o tempo de latência para levantar ou lambar as patas (HP). Não houve diferenças entre os grupos ($P > 0,05$; ANOVA; $n = 10$ por grupo para todos os testes). ANI: Anisomicina; RAPA: Rapamicina.

Testes comportamentais		Grupos				P
		Controle	Novidade + salina	Novidade + ANI	Novidade + RAPA	
CA	Cruzamentos, n	66,2 \pm 14,6	60,1 \pm 13,8	66,6 \pm 12,7	65,6 \pm 9,4	0,58
	Elevações, n	18,3 \pm 6,3	17,2 \pm 5,6	16,3 \pm 5,1	17,3 \pm 3,7	0,48
LCE	Total de entradas nos braços abertos, n	5,5 \pm 1,9	5,1 \pm 1,4	5,9 \pm 1,4	5,9 \pm 1,4	0,56
	Tempo nos braços abertos, s	139 \pm 43,7	149,1 \pm 50,6	153,9 \pm 40,2	149,3 \pm 37,9	0,88
HP	Latência, s	8,4 \pm 2,2	8,2 \pm 2,3	8,1 \pm 2,1	8,4 \pm 2,2	0,98

3.2 Estudo 2: Participação das regiões infra-límbica (IL) e pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventro medial (CPFvm) no efeito facilitatório da reativação sobre a extinção da memória aversiva

3.2.1 A reativação facilita o processo de extinção da memória aversiva

Nesta etapa avaliamos o efeito da reativação na facilitação da extinção da memória aversiva. Para isso, os animais foram divididos em dois grupos: (i) controle: ratos submetidos a tarefa de EI (dia 1) e sessões de extinção (dia 2); e, (ii) Reativação: Ratos submetidos a tarefa de EI (dia 1), reativação da memória aversiva e sessões de extinção (dia 2). Ambos os grupos foram testados no dia seguinte (dia 3).

De modo geral podemos observar na figura 25, que os animais expostos à reativação antes das sessões de extinção apresentaram uma facilitação desse processo (figura 25). Não houve diferença entre os grupos no dia do treino na EI ($U = 40$, $P = 0,46$, Fig. 25 – Treino na EI, Dia 1; $n = 10/\text{grupo}$). No dia das sessões de extinção, ambos os grupos apresentaram a latência de descida alta na primeira sessão de extinção, quando comparados ao dia do treino, demonstrando que todos aprenderam a tarefa ($W = -53$, $P = 0,003$ para o grupo controle; $W = -55$; $P = 0,002$ para o grupo reativação; Figura 25 – primeira sessão de extinção na EI, Dia 2; $n = 10/\text{grupo}$). Já no dia do teste (dia 3) foram observadas diferenças entre os grupos ($U = 9,000$, $P = 0,01$, Fig. 25 – Teste EI, Dia 3; $n = 20/\text{grupo}$), sendo que o grupo reativação apresentou uma latência de descida menor que o grupo controle, demonstrando que a reativação facilitou o processo de extinção.

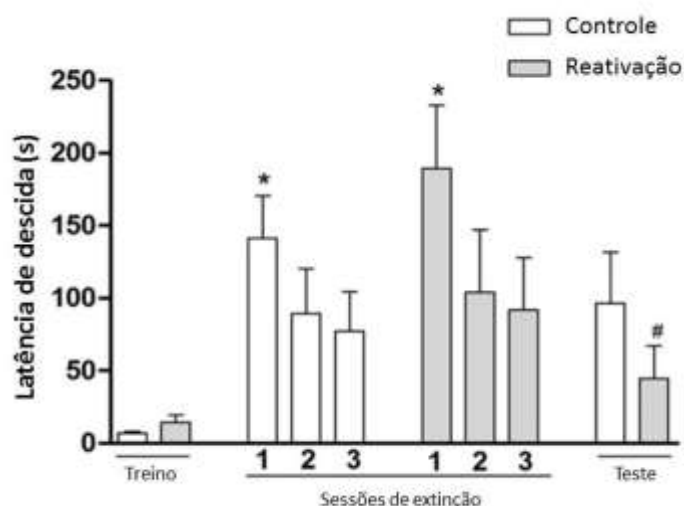


Figura 25. A reativação facilita o processo de extinção da memória aversiva. No dia 1, os ratos foram treinados na tarefa de EI, na qual se observou que todos os grupos apresentaram uma baixa latência de descida. No dia 2 (sessões de extinção) eles foram expostos novamente ao aparato de EI, entretanto o grupo experimental foi submetido a reativação 10 minutos antes da primeira sessão de extinção, quando se pode observar o aumento da latência de descida da plataforma em ambos os grupos na primeira sessão de extinção, a qual vai diminuindo durante as sessões, o que demonstra uma tendência à extinção da memória aversiva. No dia 3 (teste) o grupo reativação apresentou menor latência que o grupo controle. Os dados representam a latência de descida na EI, expressa como mediana \pm intervalo interquartil ($n = 10$ animais por grupo). * $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treino vs. teste); # $P \leq 0,05$ no teste U de Mann-Whitney (comparações dos grupos no dia do teste). Tr = treino; Tt = teste. Fonte: produzida pelo próprio autor (2019).

3.2.2 As regiões Infralímbica (IL) e Pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventromedial (cPFvm) são essenciais para o efeito facilitatório da reativação na extinção da memória aversiva

Nesta etapa nós avaliamos a participação das regiões Infralímbica (IL) e Pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventromedial (cPFvm) no efeito facilitatório que a reativação apresentou sobre a extinção da memória aversiva. Para isso, os animais foram divididos em quatro grupos: (i) controle PL: Ratos submetidos à tarefa de EI, reativação da memória aversiva seguida da infusão de salina na região PL (0,25 μ L/lado) e sessões de extinção; (ii) experimental PL: Ratos submetidos à tarefa de EI, reativação da memória aversiva seguida da infusão de Muscimol (um agonista gabaérgico: 0.01 μ g/ μ l, 0,25 μ L/lado) na região PL e sessões de extinção; (iii) controle IL: Ratos submetidos à tarefa de EI, reativação da memória aversiva seguida da infusão de salina na região IL (0,25 μ L/lado) e sessões de extinção; e, (iii) experimental IL: Ratos

submetidos à tarefa de EI, reativação da memória aversiva seguida da infusão de Muscimol (um agonista gabaérgico: 0.01µg/µl, 0,25 uL/lado) na região IL e sessões de extinção.

De modo geral podemos observar na figura 26 que os animais expostos à reativação antes das sessões de extinção apresentaram uma facilitação desse processo, efeito este que é bloqueado quando infundimos muscimol nas regiões IL e PL do CPFvm. Não houve diferença entre os grupos no dia do treino na EI ($P = 0,96$, $H_{(4,31)} = 0,29$. Fig. 26 – Treino na EI, Dia 1; $n = 10$ /grupo). No dia das sessões de extinção, ambos os grupos apresentaram a latência de descida alta na primeira sessão de extinção, quando comparados ao dia do treino, demonstrando que todos aprenderam a tarefa ($W = -26$, $P = 0,03$ para o grupo PL + salina; $W = -21$; $P = 0,03$ para o grupo PL + muscimol; $W = -28$, $P = 0,02$ para o grupo IL + salina; $W = -30$; $P = 0,04$ para o grupo IL + muscimol; Figura 26 – primeira sessão de extinção na EI, Dia 2; $n = 10$ /grupo). Já no dia do teste (dia 3) foram observadas diferenças entre os grupos ($P = 0,006$, $H_{(4,29)} = 12,14$), na comparação entre grupos houve diferença entre os grupos PL + salina e PL + muscimol e entre os grupos IL + salina e IL + muscimol ($P = 0,03$ e $P = 0,01$, respectivamente. Fig. 26 – Teste na EI, Dia 3; $n = 10$ /grupo), demonstrando que quando os grupos são submetidos à reativação, mas recebem a infusão de muscimol nas regiões PL e IL, o efeito facilitatório da reativação se perde.

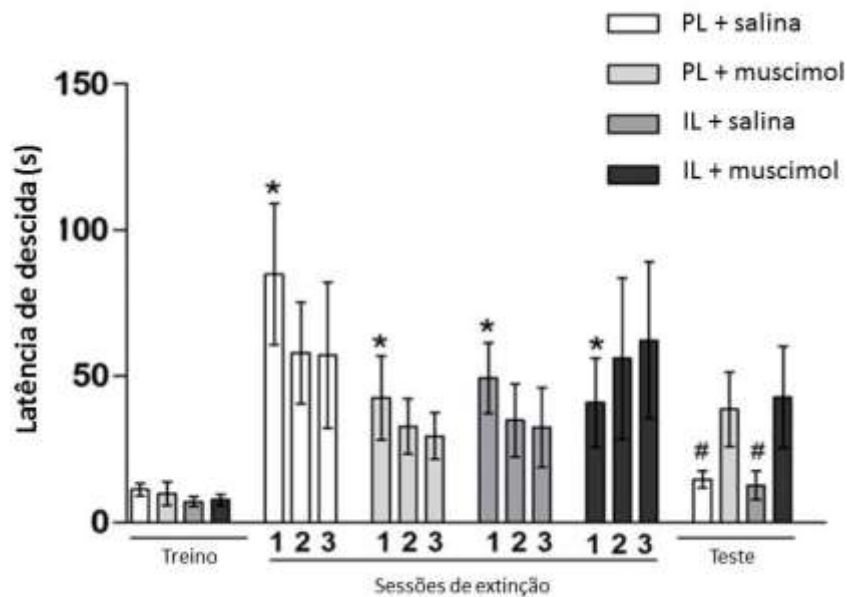


Figura 26. As regiões Infralímbica (IL) e Pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal ventromedial (cPFvm) são essenciais para o efeito facilitatório da reativação na extinção da memória aversiva. No dia 1, os ratos foram treinados na tarefa de EI, na qual se observou que todos os grupos apresentaram uma baixa latência de descida. No dia 2 (sessões de extinção) todos os animais foram submetidos à reativação da memória aversiva 10 minutos antes do protocolo de extinção, no entanto, os animais do grupo experimental receberam a infusão de muscimol (0.01µg/µl), (0,25 uL/lado) (um agonista gabaérgico, sendo o GABA um neurotransmissor inibitório, sua injeção promove inativação da estrutura) nas regiões IL ou PL. No dia 3 (teste) os grupos que receberam a infusão de muscimol apresentaram maiores latências que os que receberam salina, demonstrando que as áreas PL e IL participam do efeito facilitatório da extinção mediante a reativação. Os dados representam a latência de descida na EI, expressa como mediana ± intervalo interquartil (n = 10 animais por grupo). * $P \leq 0,05$ no teste de Wilcoxon (treino vs. teste); # $P \leq 0,05$ no teste U de Mann-Whitney (comparações dos grupos no dia do teste). Tr = treino; Tt = teste. Fonte: produzida pelo próprio autor (2019).

3.2.3 A infusão intrahipocampal de salina ou muscimol não prejudica a ansiedade e os comportamentos locomotores e exploratórios, e a percepção nociceptora dos animais

Os ratos foram submetidos aos testes de campo aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Hotplate (HP) após as infusões de salina e muscimol e exposição à reativação para verificar se as atividades exploratória e locomotora, ansiedade e limiares de dor, respectivamente, foram afetados pelas infusões de droga ou veículo. A realização dos testes de controle comportamental foi feita no dia 3, após a realização dos testes na EI. Nem os fármacos ou o veículo, nem a exposição à reativação, afetaram os parâmetros avaliados. Não houve diferença estatística quando comparados os grupos quanto ao número de cruzamentos e elevações em campo aberto, número de entradas e permanência nos braços abertos do LCE e

latência de retirada da pata em HP (Tabela 3; $P = 0,13$, $P = 0,072$, $P = 0,66$, $P = 0,073$ e $P = 0,56$, respectivamente).

Tabela 3. A infusão de muscimol, de salina e a exposição à reativação não afetaram o desempenho no CA, LCE e HP. Os dados são expressos como média \pm DP do número de cruzamentos e levantamentos (CA), o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos (LCE) e o tempo de latência para levantar ou lambe as patas (HP). Não houve diferenças entre os grupos ($P > 0,05$; ANOVA; $n = 10$ por grupo para todos os testes).

Testes comportamentais		Grupos				P
		IL + Salina	IL + Muscimol	PL + Salina	PL + Muscimol	
CA	Cruzamentos, n	40,0 \pm 6,1	42,0 \pm 6,9	38,5 \pm 7,3	47,0 \pm 9,6	0,13
	Elevações, n	16,8 \pm 5,8	12,2 \pm 7,7	10,9 \pm 6,6	14,4 \pm 5,8	0,072
LCE	Total de entradas nos braços abertos, n	6,0 \pm 4,6	7,7 \pm 3,4	8,0 \pm 4,4	6,3 \pm 4,6	0,66
	Tempo nos braços abertos, s	36,5 \pm 30,1	28,5 \pm 20,05	26,25 \pm 20,3	25,13 \pm 14,8	0,073
HP	Latência, s	9,1 \pm 2,6	10,3 \pm 2,1	9,2 \pm 1,4	9,3 \pm 2,0	0,56

3.3 Estudo 3: A ativação dopaminérgica hipocampal é necessária para modulação da persistência da memória de reconhecimento de objetos por uma sessão de exercício físico

3.3.1 Uma única sessão de exercício físico promove a persistência da memória de RO por meio da ativação dopaminérgica no hipocampo

Nesta etapa nós testamos se uma única sessão de exercício físico seria capaz de promover a ativação do sistema dopaminérgico, com consequente persistência da memória de RO. Para isso, experimentos comportamentais foram realizados com 50 ratos Wistar machos, os quais foram divididos em 5 grupos, com 10 animais cada: (i) controle, cujos animais foram treinados somente na tarefa de RO; (ii) familiarização em esteira, cujos ratos foram habituados na esteira e treinados na tarefa de RO; (iii) exercício físico, cujos ratos foram habituados na esteira, treinados na tarefa de RO e submetidos a uma única sessão de exercício físico em esteira, por 30 minutos, após o treino de RO; (iv) Exercício + SCH 23390, em que os animais passaram pela tarefa de RO, foram submetidos ao exercício físico e, imediatamente após, receberam a infusão intrahipocampal de um antagonista de receptores D1 (SCH 23390); e, (v) dopamina,

em que os animais passaram pela tarefa de RO e imediatamente após receberam a infusão intrahipocampal de dopamina. A consolidação da memória de RO foi testada em ratos de diferentes grupos 24h após o treino, e a persistência da memória de RO 7, 14 e 21 dias após o dia de treino (fig. 27A). No dia do treino, todos os animais dos diferentes grupos exploraram os dois novos objetos por uma porcentagem de tempo de exploração similar (~ 50% para A e B; Fig. 27B-F, treino, $P > 0,05$).

Os animais do grupo controle, que não foram expostos a nenhum procedimento adicional além da tarefa de RO, exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração o novo objeto (C) no teste de 24h (fig. 27B; $t_{(11)} = 7,66$; $P < 0,0001$), mas não nos testes de 7, 14 e 21 dias (Fig. 27B; $t_{(11)} = 1,59$; $P = 0,1385$ no teste de 7d; $t_{(11)} = 0,38$; $P = 0,74$ no teste de 14d; $t_{(11)} = 0,06$, $P = 0,95$ no teste 21d). Os mesmos resultados podem ser observados nos ratos familiarizados à esteira; os ratos lembram o objeto familiar no teste de 24h (Fig. 26C; $t_{(9)} = 5,73$; $P = 0,0003$), mas não foram capazes de reconhecer o novo objeto nos testes de 7, 14 e 21 dias (fig. 27C; $t_{(9)} = 0,45$, $P = 0,66$ no teste de 7d, $t_{(9)} = 2,04$, $P = 0,07$ no teste de 14d, $t_{(9)} = 1,17$, $P = 0,27$ no teste de 21d, demonstrando que houve boa consolidação, mas não persistência de memória.

Em contraste, quando expostos a uma única sessão de exercício físico imediatamente após o treino, os ratos foram capazes de lembrar o objeto familiar até 21 dias após o treino, onde gastaram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração explorando o novo objeto nos diferentes dias de testes (Fig. 27D; $t_{(9)} = 4,95$; $P = 0,0008$ no teste de 24h; $t_{(9)} = 2,23$; $P = 0,05$ no teste de 7d; $t_{(9)} = 3,28$; $P = 0,009$ no teste de 14d; $t_{(9)} = 6,19$, $P = 0,0002$ no teste 21d), mostrando boa consolidação e boa persistência da memória de RO. Por outro lado, os animais que receberam infusão intra-hipocampal de SCH-23390 após o exercício físico foram capazes de consolidar a memória (Fig. 27E; $t_{(7)} = 7,36$; $P = 0,0002$ no teste de 24h), mas não conseguiram lembrar-se do objeto familiar e passaram aproximadamente o mesmo tempo explorando cada objeto em todos os testes de persistência de memória (Fig. 27E; $t_{(7)} = 0,55$; $P = 0,60$ no teste 7d; $t_{(7)} = 0,69$; $P = 0,51$ no 14d teste; $t_{(7)} = 2,30$; $P = 0,05$ no teste 21d). A infusão de dopamina (DA), por sua vez, promoveu efeito semelhante ao de uma única sessão de exercício físico, ou seja, aumentou a persistência da memória (fig. 27; $t_{(9)} = 4,63$; $P = 0,001$ no teste de 24h; $t_{(9)} = 1,97$, $P = 0,05$ no teste de 7d, $t_{(9)} = 3,47$, $P = 0,007$ no teste de 14d, $t_{(9)} = 8,24$, $P < 0,0001$ no teste de 21d).

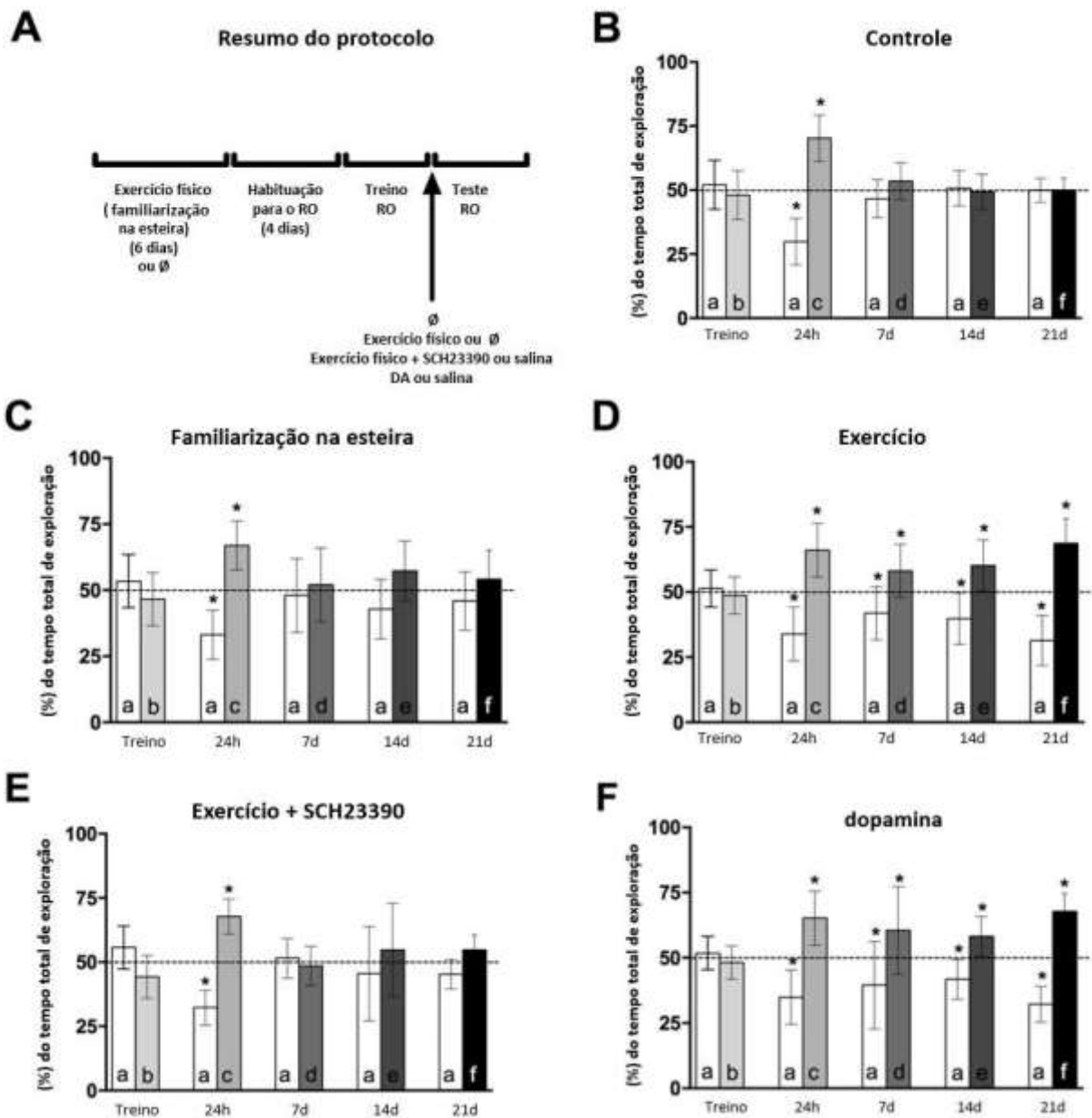


Figura 27. Uma única sessão de exercício físico após o aprendizado promove a persistência da memória de RO; este efeito não ocorre com a infusão de SCH-23390; a infusão de DA tem um efeito semelhante ao do exercício. (A) Resumo dos experimentos realizados. Alguns ratos foram familiarizados à esteira antes da tarefa de RO. No dia do treino de RO todos os ratos foram expostos a dois objetos diferentes (denominados A e B) por 5 min. De acordo com o grupo, imediatamente após o treino os ratos foram submetidos a uma sessão de exercício físico em esteira por 30 minutos (D) ou submetidos a uma sessão de exercício físico em esteira por 30 minutos seguidos por infusões intra-hipocâmpais bilaterais (1µl / lado em CA1) de SCH-23390 (1 µg / µl) (E) ou imediatamente após o treino recebeu apenas uma infusão intra-hipocâmpal (1 µl / lado em CA1) de dopamina (DA; 1 µg / µl). Vinte e quatro horas, 7, 14 e 21 dias depois, na fase de teste, um dos objetos foi trocado aleatoriamente por um novo objeto (denominado C, D, E e F, respectivamente) e os ratos foram reintroduzidos no aparato por um período adicional de 5 minutos para livre exploração. Os animais do grupo controle foram capazes

de reconhecer os objetos no teste de 24h, mas não no teste de 21d (B). Os animais familiarizados à esteira apresentaram os mesmos resultados do grupo controle (C). O exercício físico realizado imediatamente após o treino promoveu a persistência da memória de RO testada 21 dias após o treino (D). A infusão do SCH-23390 na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o exercício físico evitou os efeitos do exercício na persistência da memória (E). A infusão de DA na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino promoveu persistência da memória de RO até 21 dias (F). Dados (média ± DP) são apresentados como porcentagem do tempo total de exploração; * $P \leq 0,05$ no teste t de *Student* de uma amostra com média teórica = 50%; n = 8-10 por grupo / teste. Fonte: produzida pelo próprio autor (2019).

De acordo com o índice de discriminação do RO de 24h, podemos observar que todos os grupos conseguiram consolidar a memória, pois não foram verificadas diferenças entre os grupos (Figura 28A; $H_{(5)} = 2,21$; $P = 0,69$). No dia 21, foram observadas diferenças entre os grupos (Fig. 28B; $H_{(5)} = 30,44$; $P < 0,0001$). O grupo exercício apresentou maior índice de discriminação que o grupo controle ($P < 0,001$), grupo familiarizado à esteira ($P < 0,05$) e grupo Exercício + SCH 23390 ($P < 0,05$). O grupo dopamina apresentou maior índice de discriminação do que o grupo controle ($P < 0,001$), grupo habituação em esteira ($P < 0,05$) e grupo Exercício + SCH 23390 ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos exercício e dopamina ($P > 0,05$).

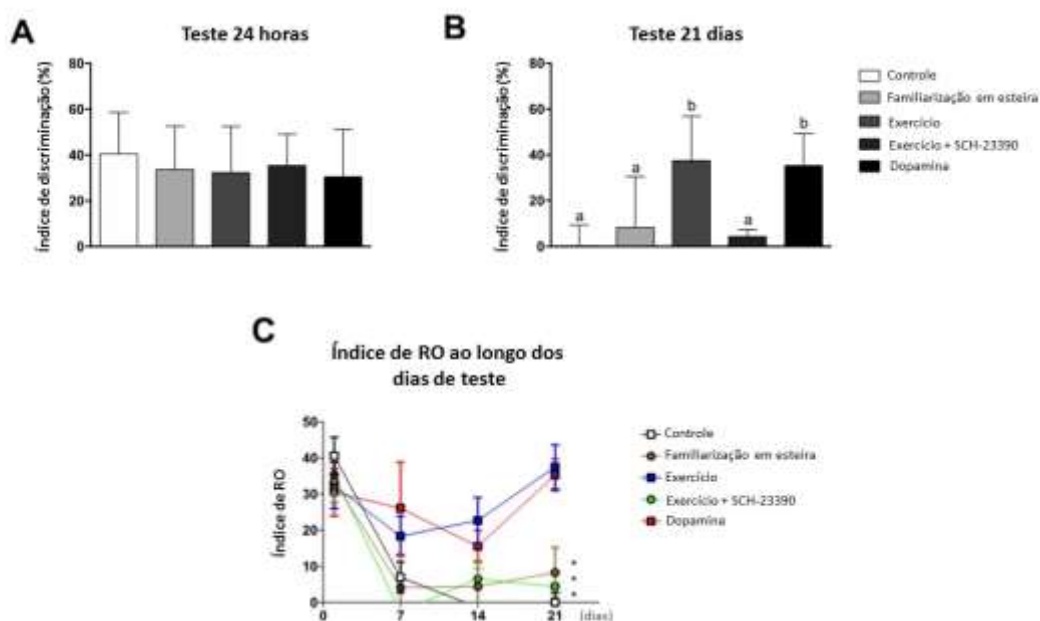


Figura 28. Uma única sessão de exercício físico e a infusão de dopamina (DA) intra-hipocampal após o aprendizado de RO promovem a persistência da memória. Índice de discriminação para novos objetos nos testes de 24h (A), 21 dias (B) e ao longo de todos os dias de teste (C). Nos gráficos A e B os grupos (barras) com letras diferentes foram significativamente diferentes ($P < 0,05$ em Kruskal-Wallis seguido por post-hoc de Dunn).

No gráfico C, cada linha representa um grupo, * $P < 0,05$ no teste de medidas repetidas de Friedman. Os dados são apresentados como média \pm DP; $n = 8-10$ por grupo / teste. Fonte: produzido pelo próprio autor (2019).

Ao longo dos dias de teste, foram identificadas diferenças no grupo controle (Fig. 27C/controle; $F_{(4,12)} = 17,90$; $P = 0,0005$); diferenças foram encontradas entre 24h e 7d ($P < 0,05$), 24h e 14d ($P < 0,01$), e teste de 24h e 21d ($P < 0,01$). Não foram detectadas diferenças no índice de discriminação de OR (DI) nos grupos exercício (Fig. 27C/exercício; $F_{(4,9)} = 7,53$; $P = 0,06$) e dopamina (Fig. 27C/dopamina; $F_{(4,10)} = 9,30$, $P = 0,06$). As diferenças foram identificadas no grupo de exercício familiarizado ao exercício (Fig. 27C/exercício hab; $F_{(4,10)} = 8,76$; $P = 0,03$) e no exercício + grupo SCH 23390 (Fig. 27C/exerc + SCH 23390; $F_{(4,8)} = 11,40$; $P = 0,009$).

3.3.2 Uma única sessão de exercício físico promove o aumento nos níveis de dopamina no hipocampo

Com o objetivo de testar nossa hipótese de que uma única sessão de exercício físico poderia promover a persistência da memória através da liberação aumentada de dopamina no hipocampo, vinte animais foram divididos em quatro grupos com cinco animais cada: (i) *naive*; (ii) controle, cujos ratos foram treinados apenas na tarefa de RO; (iii) familiarização em esteira, cujos ratos foram familiarizados na esteira e treinados em tarefa de RO; e, (iv) exercício físico, cujos ratos foram familiarizados na esteira, treinados no RO e submetidos a uma única sessão de exercício físico em esteira por 30 minutos, imediatamente após o treino. Os ratos do grupo (ii), (iii) e (iv) foram eutanasiados para dissecação do hipocampo 30 min após o treino de RO. Os hipocampus dorsais foram homogeneizados e processados para determinação por HPLC dos níveis de dopamina. Diferenças entre os grupos foram detectadas (Fig. 29; $F_{(3,30)} = 21,63$; $P < 0,0001$). Os ratos do grupo exercício e familiarização apresentaram um nível hipocampal maior de dopamina do que o grupo *naive* e controle (Fig. 29, $P < 0,01$).

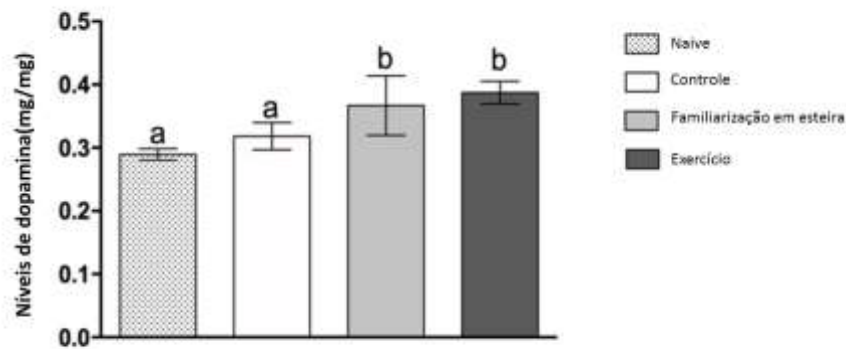


Figura 29. A familiarização prévia na esteira rolante e uma sessão de exercício físico após o aprendizado de RO promovem um aumento dos níveis de dopamina hipocampal. Grupos (barras) com letras diferentes foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) em seu conteúdo tecidual de dopamina no homogenato de hipocampo ($\mu\text{g/L}$) (ANOVA seguido pelo *post hoc* de Tukey). Dados apresentados como média \pm DP; $n = 5$ por grupo/teste. Fonte: produzido pelo próprio autor (2019).

3.3.3 As drogas e veículo infundidos via intrahipocampal e exercício físico não prejudicam a ansiedade e os comportamentos locomotores e exploratórios dos animais

Os ratos foram submetidos aos testes de CA e LCE após infusões de salina, dopamina e realização de exercício físico para verificar se as atividades exploratória e locomotora e ansiedade, respectivamente, foram afetados pelas infusões de drogas ou veículo ou estratégia comportamental (exercício). A realização dos testes de controle comportamental foi feita no dia 12, após a realização dos testes de RO (24h, 7, 14 e 21 dias após o treino de RO). Não houve diferença estatística quando comparados os grupos quanto ao número de cruzamentos e elevações em campo aberto e permanência nos braços abertos do LCE (Tabela 4; $P = 0,66$, $P = 0,64$, e $P = 0,85$, respectivamente) nem quando comparados o tempo total de exploração no dia do treino e testes de 7, 14 e 21 dias na tarefa de RO (Tabela 4; $P = 0,97$, $P = 0,13$, $P = 0,45$, $P = 0,6$ e $P = 0,08$, respectivamente).

Tabela 4. A infusão de dopamina, SCH-23390 ou salina e os demais procedimentos propostos no desenho do estudo não têm efeito no tempo total de exploração no treino e testes na tarefa de RO, na ansiedade no LCE e em atividades locomotoras e exploratórias no CA. Os dados são expressos como média \pm DP do tempo total de exploração, contabilizados em segundos, durante o treino e testes de RO (RO; n = 8-10 por grupo/ dia), o tempo total gasto nos braços abertos (mais labirinto; n = 8 -10 por grupo), e o número de cruzamentos e levantamentos (campo aberto; n = 8-10 por grupo). Para todos os testes obtivemos valores de $P > 0,05$ (ANOVA de uma via).

	Controle	Familiariza ção à esteira	Exercício Físico	Exercício físico + SCH-23390	Dopamina	P
<i>Tempo total de exploração no RO (s)</i>						
Treino	45,2 \pm 21,2	38,7 \pm 18,6	45,9 \pm 14,2	48,25 \pm 17,4	48,3 \pm 17,7	0,97
Teste (24h)	32,6 \pm 10,8	32 \pm 17,4	41,3 \pm 10,8	30,5 \pm 10,5	47,7 \pm 18,5	0,13
Teste (7d)	35,4 \pm 14,9	25 \pm 12,4	31,9 \pm 19,9	36,8 \pm 17,9	27 \pm 10,6	0,45
Teste (14d)	28,9 \pm 13,8	18,4 \pm 5,7	25,3 \pm 13,8	20,6 \pm 8,4	26,6 \pm 9,9	0,6
Teste (21d)	44,2 \pm 18	35,3 \pm 12	41,3 \pm 17,8	25,74 \pm 4	37,7 \pm 12	0,08
<i>LCE</i>						
Tempo nos braços abertos (s)	132 \pm 41,2	135,6 \pm 53	148,9 \pm 40,2	149,8 \pm 39,06	146,8 \pm 39,06	0,85
<i>CA</i>						
Cruzamentos	36 \pm 14,98	43 \pm 26,03	30,40 \pm 13,7	48,1 \pm 26,22	43,5 \pm 21,84	0,66
Elevações	19,7 \pm 7,55	18,1 \pm 8,9	16,2 \pm 5,7	23,1 \pm 8,9	19,7 \pm 7,45	0,64

V DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que diferentes intervenções comportamentais podem ser utilizadas para modular diferentes processos mnemônicos. Estas intervenções podem contribuir para melhora da memória em condições diversas, como em situações de doenças relacionadas a transtornos do medo e ansiedade, ou à déficits de persistência da memória.

A partir dos resultados do primeiro estudo desta tese demonstramos que a exposição a um ambiente novo (novidade) impede a generalização da memória aversiva. Além disso, mostramos que os efeitos da exposição à novidade sobre a discriminação de memória dependem da síntese proteica no hipocampo. Estudos anteriores do nosso e de outros grupos ilustraram os efeitos da novidade sobre a modulação da memória (Moncada and Viola 2007; de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2014; Menezes, Alves et al. 2015). Estes estudos mostram que um treinamento aversivo fraco, que induziria a uma memória curta (MCD) mas não de longa duração (MLD), pode ser consolidado como uma MLD quando associado à exposição a um ambiente novo, próximo à janela de consolidação (Moncada and Viola 2007). A exposição à novidade pode melhorar a extinção da memória do medo (de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2014), e um protocolo de extinção da memória aversiva fraco na EI, que naturalmente não promoveria a extinção, poderia promovê-lo quando precedido pela exposição à novidade (Menezes, Alves et al. 2015). Terapias de exposição são usadas no tratamento do TEPT em humanos, e pesquisas sobre estratégias que melhoram a extinção de memória são de interesse tanto para pesquisadores como para profissionais da saúde que trabalham com esses transtornos.

Além da extinção da memória e sua relação com as terapias de exposição, é importante destacar dois aspectos que estão intimamente relacionados, que são processos de discriminação e generalização de memória. A generalização das respostas do medo para contextos que podem ser semelhantes, mas não igualmente perigosos como aquele em que a memória aversiva foi adquirida, pode levar a um comportamento patológico de medo e esquiva (Lopresto, Schipper et al. 2016; Luyten, Schroyens et al. 2016). Essas situações podem ocorrer em transtornos que envolvem medo intenso (como TEPT), quando a memória do medo é involuntariamente evocada por situações inespecíficas ou contextos que se assemelham ao evento traumático original (Lissek 2012; Lopresto, Schipper et al. 2016). Como mencionado anteriormente, a capacidade de discriminar entre indivíduos ou objetos novos e familiares, ou um ambiente neutro e outro perigoso, por exemplo, permite que um animal se beneficie da experiência

anterior e evite condições que ameaçam a vida (Riesenhuber and Poggio 2002; Squire, Wixted et al. 2007).

Neste estudo descobrimos que expor ratos a um ambiente similar, mas não igual, àquele em que o estímulo aversivo foi entregue, evoca comportamentos aversivos nesses animais. Esse fenômeno se assemelha à generalização da memória do medo. Por outro lado, quando os ratos foram expostos à novidade antes de sua exposição ao contexto similar, eles parecem reconhecer a especificidade do contexto, mostrando a precisão da memória (ou seja, a exposição de novidades evitou a generalização da memória). Notavelmente, este efeito de novidade mostrou-se dependente da síntese de proteínas do hipocampo, uma vez que a infusão de inibidores de proteínas na região CA1 do hipocampo bloqueou os efeitos da novidade. Esta dependência do efeito da novidade na síntese de proteínas é consistente com estudos anteriores. Por exemplo, a infusão de anisomicina na região CA1 do hipocampo dorsal impede o efeito da novidade na formação da MLD (Moncada and Viola 2007). Da mesma forma, a facilitação da extinção pela novidade requer a síntese de proteínas, tanto no condicionamento do medo quanto nas tarefas de esquivas inibitórias (de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2014; Menezes, Alves et al. 2015). De acordo com a hipótese da STC, a novidade fornece expressão de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs) que podem estabilizar um traço de memória fraca (Morris 2006). Em nosso estudo, essas PRPs fortaleceram o aprendizado na EIM, permitindo que ratos discriminassem entre dois ambientes relacionados (similar/seguro e original/aversivo).

É importante ressaltar que nossos resultados adicionam à literatura, indicando que a exposição à novidade pode não apenas facilitar o processo de extinção, como já demonstrado anteriormente (de Carvalho Myskiw, Furini et al. 2014; Menezes, Alves et al. 2015), mas também melhorar a discriminação de memória. Em outras palavras, a exposição à novidade evita a generalização da memória, o que pode ser relevante para a aplicabilidade terapêutica da exposição à novidade nos casos de transtornos do medo. Ao que parece, o fenômeno da generalização pode envolver outras regiões do cérebro além do hipocampo, no entanto, supõe-se que o hipocampo seja a principal região envolvida no processo de generalização (Kheirbek, Klemenhagen et al. 2012) e parece ser essencial para garantir a discriminação de informações sensoriais sobrepostas (isto é, separação de padrões; (McTighe, Mar et al. 2009; Talpos, McTighe et al. 2010). Além disso, o volume reduzido do hipocampo foi associado à generalização de contextos negativos em pacientes com TEPT (Levy-Gigi, Szabo et al. 2015). No entanto, outras regiões do cérebro podem estar envolvidas também, conforme demonstrado por (Lopresto, Schipper et al. 2016) que alterações do hipocampo e do córtex pré-frontal

influenciaram a generalização do contexto (com generalização dependente, dependendo dos circuitos pré-frontais da amígdala), enquanto a hiperatividade insular reduziu o controle pré-frontal na generalização. Assim, mais pesquisas são necessárias visando elucidar os mecanismos subjacentes ao processo de generalização, bem como estruturas envolvidas nela, afim de aprimorar as estratégias de tratamentos para casos que envolvem disfunções neste processo.

No segundo estudo desta tese nós investigamos a participação de diferentes regiões do córtex pré-frontal ventromedial (PFCvm), as regiões infralímbica (IL) e pré-límbica (PL), na facilitação a extinção do medo induzida pela reativação da memória, e demonstramos que a facilitação da extinção promovida pela reativação requer a integridade das funções das regiões IL e PL do CPFvm.

Algumas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de encontrar estratégias que facilitem o processo de extinção, uma vez que é uma estratégia importante para o tratamento de distúrbios do medo, já utilizada na terapia de exposição. Experimentos com roedores demonstraram que o uso sistêmico de algumas drogas pode facilitar a extinção sem alterar a expressão do medo, como o agonista de NMDA d-cicloserina (Walker, Ressler et al. 2002), canabinóides (Lafenetre, Chaouloff et al. 2007), estradiol (Milad, Igoe et al. 2009), corticosterona (Gourley, Kedves et al. 2009), fator de crescimento FGF-2 (Graham and Richardson 2011), histamina (Bonini, Da Silva et al. 2011) e agonista do receptor de BDNF (Andero, Heldt et al. 2011).

Algumas estratégias comportamentais também se mostraram eficazes em facilitar a extinção da memória aversiva e do medo. Myskiw et. al. (2012) mostraram que uma breve exposição a um novo ambiente aumenta a extinção do medo contextual em ratos, efeito que é dependente da STC (de Carvalho Myskiw, Benetti et al. 2013). Da mesma forma, uma breve exposição a um ambiente novo promove a extinção da memória aversiva, mesmo mediante a um protocolo fraco de extinção, quando os animais são treinados na tarefa de esquiva inibitória (EI), ou seja, somente este protocolo “fraco” não foi capaz de promover a extinção, mas quando aliado à novidade, o protocolo pode promover a extinção (Menezes, Alves et al. 2015). Outra estratégia comportamental que auxilia na facilitação do processo de extinção é a reativação da memória, que, quando realizada antes das sessões de extinção, contribui para promover uma forte memória de extinção (Monfils, Cowansage et al. 2009; Schiller, Monfils et al. 2010).

De fato, observamos que a reativação da memória aversiva na EI realizada antes das sessões de extinção facilita esse processo. O grupo experimental (com reativação) apresentou

menor latência de descida da plataforma do que o grupo controle (sem reativação) no teste dia do teste, expressando a extinção da memória aversiva. No entanto, quando os ratos receberam uma infusão de muscimol (um agonista dos receptores GABA) em ambas as regiões do córtex pré-frontal estudadas, IL e PL, após a reativação, a facilitação da extinção por reativação não foi observada. Estes resultados sugerem que ambas as regiões, IL e PL do CPFvm, estão envolvidas no efeito da reativação da memória aversiva sobre a extinção.

Diferentemente da aprendizagem do medo, a extinção começou a ser investigada por volta dos anos 90. Nessa época, foi demonstrado que a transmissão gabaérgica e os receptores GABA (A) estão envolvidos na inibição da extinção do medo (Harris and Westbrook 1998), e que os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) no núcleo basolateral da amígdala também são necessários (Falls, Miserendino et al. 1992). Somente em 1993, Morgan e colaboradores mostraram o envolvimento da CPFvm na extinção por meio de lesões no CPFvm antes dos testes (Morgan, Romanski et al. 1993), entretanto, lesões de CPFvm ou córtex visual foram incapazes de replicar déficits de extinção (Falls and Davis 1993), sugerindo uma possível diferença entre a localização específica das lesões.

Mais recentemente, pesquisas indicaram que a ativação da região IL inibe a expressão do medo e fortalece a evocação da extinção (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez et al. 2006; Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez et al. 2007; Sierra-Mercado, Padilla-Coreano et al. 2011), enquanto a atividade da região PL aumenta a expressão do medo (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez et al. 2006; Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez et al. 2007; Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez et al. 2009). Nossos resultados mostram que ambas as regiões são necessárias para facilitar a extinção por meio da reativação, evidenciando que ainda faltam conhecimentos acerca do papel da região PL do CPFvm na extinção, e assim mais pesquisas são necessárias.

No terceiro e último estudo desta tese buscamos investigar os efeitos de uma única sessão de exercício na modulação da persistência da memória. Observamos que, quando realizado perto da janela de consolidação, o exercício pode promover a persistência da memória de reconhecimento de objeto (RO). Recentemente, mostramos que uma única sessão de exercício físico realizada imediatamente após o aprendizado promove a persistência da memória de RO, aumentando os níveis de norepinefrina no hipocampo; por outro lado, esses efeitos são bloqueados pela infusão de antagonistas beta-adrenérgicos no hipocampo (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017). Esses resultados demonstraram que os efeitos do exercício agudo na memória estão relacionados à mecanismos noradrenérgicos.

O exercício físico é uma prática comportamental não invasiva que favorece a liberação de dopamina (DA), além de norepinefrina (NE) (Meeusen and De Meirleir 1995). Ambos, NE e DA, quando liberados no hipocampo podem aumentar a potenciação de longo prazo (LTP) e o aprendizado (Moore and Bloom 1979; Lisman and Grace 2005) e são importantes neurotransmissores envolvidos nos processos de modulação da consolidação e persistência da memória (Rossato, Bevilaqua et al. 2009; Mello-Carpes and Izquierdo 2013); assim, é provável que os efeitos agudos do exercício na memória também possam ser mediados pela ativação do sistema dopaminérgico.

Neste estudo utilizando a tarefa de reconhecimento de objetos demonstramos que todos os grupos conseguiram consolidar essa memória, mas a memória persiste pelo menos 21 dias apenas nos grupos em que os animais foram submetidos a uma única sessão de exercício ou receberam uma infusão intra-hipocampal de dopamina imediatamente após o aprendizado de RO. Confirmando nossa hipótese sobre a necessidade da ativação dopaminérgica para efeitos agudos do exercício, a persistência da memória é bloqueada quando os animais submetidos ao exercício recebem a infusão intra-hipocampal do antagonista do receptor da família D1 (SCH 23390). Rossato e colaboradores (2009) já haviam demonstrado o importante papel da dopamina na persistência da memória; os autores bloquearam os receptores dopaminérgicos (D1) na região do hipocampo dos ratos após o aprendizado e observaram que a MLD desaparece rapidamente. Em contraste, a infusão intra-hipocampal do agonista D1 após a sessão de aprendizagem fez a memória persistir (Rossato, Bevilaqua et al. 2009).

A fim de tornar clara a relação entre o exercício físico e o sistema dopaminérgico, medições diretas demonstraram que os níveis de DA no hipocampo aumentam após uma sessão de exercício físico em comparação com os níveis de DA de animais *naive* e controle. De fato, a habituação ao aparato de exercício físico (esteira) realizada por 6 dias antes da tarefa de RO foi capaz de melhorar os níveis de DA *per se*. Esse aumento de dopamina no hipocampo de ratos habituados, por outro lado, não se traduziu em persistência de memória, uma vez que a persistência da memória não foi observada nesse grupo. Temos algumas hipóteses para explicar este resultado: a atividade física realizada durante o período de habituação do exercício foi suficiente para promover mudanças cerebrais, mobilizando o sistema dopaminérgico, mas essa mobilização não foi suficiente para garantir a melhora da memória em uma tarefa aprendida alguns dias depois – poderia ser porque os níveis de dopamina nos grupos exercício físico e habituado foram medidos como não diferentes em nosso experimento, considerando que a dopamina pode ser metabolizada no cérebro, originando noradrenalina pela ação da enzima

dopamina beta-hidroxilase (lembrando que em trabalho anterior observamos um aumento nos níveis de noradrenalina de ratos exercitados, mas não em ratos habituados (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017). Talvez realizar experimentos adicionais usando microanálise poderia ajudar no teste dessa hipótese.

A memória tem um papel importante no cotidiano de cada indivíduo e estudos relacionados ao exercício físico e à memória têm mostrado efeitos positivos desta prática (Mello-Carpes and Izquierdo 2013; Flores, Martins et al. 2014; Neves, Menezes et al. 2015), porém a maioria dos resultados refere-se aos efeitos da prática regular e habitual de exercícios físicos. Por exemplo, o exercício físico aeróbico crônico tem um efeito positivo em fatores que contribuem para a melhora da função cognitiva (Radak, Kaneko et al. 2001), como plasticidade neural, sobrevivência celular, neurogênese e síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Farmer, Zhao et al. 2004; Kobil, Liu et al. 2011).

Embora existam poucos estudos investigando os efeitos do exercício agudo na memória, os achados sugerem que o BDNF também desempenha um papel importante nos benefícios cognitivos do exercício agudo (Knaepen, Goekint et al. 2010). Recentemente foi demonstrado que exercícios de diferentes intensidades são capazes de promover o aumento do BDNF, mas que esse aumento não tem relação com a melhora da memória. Por outro lado, a melhora da MLD parece estar associada ao exercício de intensidade máxima (Etnier, Wideman et al. 2016). Provavelmente, esses achados são justificados pelos outros efeitos provocados pelo exercício, que não só pode envolver a síntese de BDNF, mas também a ativação de sistemas neurotransmissores (Meeusen and De Meirleir 1995), como demonstrado anteriormente pelo papel da norepinefrina na persistência da memória (da Silva de Vargas, Neves et al. 2017) e no presente estudo pelo papel da dopamina nesse mesmo efeito.

Além disso, nem todos os estudos trazem resultados consistentes em relação à melhora dos aspectos cognitivos relacionados ao exercício, o que sugere que fatores como tempo de exposição ao exercício, e tipo de exercício realizado (por exemplo, forçado *versus* voluntário) podem influenciar os resultados (Berchtold, Castello et al. 2010). Existe evidências na literatura sobre os benefícios do exercício forçado e voluntário (O'Callaghan, Ohle et al. 2007; Cechetti, Worm et al. 2012; Rajizadeh, Esmailpour et al. 2018).

VI CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados podemos concluir que:

- 1) A exposição à novidade evita o processo de generalização da memória aversiva, facilitando a discriminação de situações semelhantes, mas não iguais;
- 2) O efeito de discriminação entre dois ambientes, aversivo e neutro (não generalização), promovido pela novidade depende da síntese de proteínas no hipocampo;
- 3) A reativação da memória aversiva previamente às sessões de extinção facilita o processo de extinção da memória;
- 4) A facilitação da extinção da memória aversiva promovida pela reativação requer a atividade da região IL do CPFvm;
- 5) A facilitação da extinção da memória aversiva promovida pela reativação requer a atividade da região PL do CPFvm;
- 6) Uma única sessão de exercício físico é capaz de promover a persistência da memória de RO;
- 7) A persistência da memória de RO promovida pelo exercício agudo requer a ativação do sistema dopaminérgico;
- 8) Uma única sessão de exercício agudo aumenta os níveis hipocampais de dopamina.

Por fim, podemos concluir que estratégias comportamentais como as aqui apresentadas podem ser utilizadas para modular os processos mnemônicos. A reativação e a novidade, no considerando o contexto no qual foram estudadas (relacionado à memória aversiva) apresentam-se como potenciais estratégias auxiliares a serem empregadas no tratamento de doenças relacionadas à transtornos do medo, enquanto que o exercício agudo apresenta grande potencial para ser empregado como estratégia tanto no tratamento de doenças cuja persistência esteja comprometida, assim como, como uma estratégia comportamental auxiliar nos processos de aprendizagem.

VII PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados dessa pesquisa contribuíram na elucidação de importantes lacunas ainda não esclarecidas por completo na literatura, entretanto, muitos aspectos permanecem não completamente entendidos. Dessa forma, minhas perspectivas futuras, agora enquanto docente permanente da Universidade Federal do Pampa, envolvem me estabelecer enquanto pesquisadora do Grupo de Pesquisa em Fisiologia desta universidade para que possam ser investigadas questões como:

- Os mecanismos envolvidos com o efeito facilitatório da reativação sobre a extinção da memória aversiva, por meio de intervenção farmacológica, com inibidores de síntese proteica, agonistas e antagonistas de sistemas de neurotransmissores, técnicas e análises bioquímicas, como Western Blot para avaliar a expressão de BDNF, CREB e pCREB;

- O efeito da reativação sobre a persistência da memória de extinção;

- Os mecanismos envolvidos no processo de generalização, envolvimento de vias e sistemas que possam modular o efeito da novidade sobre a mesma, por meio de intervenção farmacológica, com agonista e antagonistas de neurotransmissores², técnicas e análises bioquímicas, como HPLC para análise dos níveis de neurotransmissores e Western Blot para avaliar a expressão de BDNF, CREB e pCREB;

- Quanto tempo de duração do exercício realizado após a aprendizagem apresenta melhor efeito na persistência da memória de RO;

- Os efeitos de uma sessão de exercício físico sobre o processo de extinção.

² Já realizamos um trabalho no qual eu coorientei uma aluna de iniciação científica que investigou o papel dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico no efeito da novidade na generalização da memória aversiva.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, M. L. (2002). "Frontal lobe syndromes and clinical assessment." Psicologia **16**(1): 32.
- Andero, R., S. A. Heldt, et al. (2011). "Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning." Am J Psychiatry **168**(2): 163-172.
- Andersen, M. a. T. S. (2015). Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Researchs.
- Andrade, A., Barcelos, J.L., Silva, J.B. (2018). "Comparative analysis of the efficacy of post-traumatic stress disorder treatment." Amazônia Science e Health **6**(2): 5.
- Arida, R. M., F. A. Scorza, et al. (2011). "Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents." Am J Phys Med Rehabil **90**(6): 452-465.
- Barros, D. M., P. Pereira, et al. (2002). "Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala." Behav Pharmacol **13**(2): 163-167.
- Berchtold, N. C., N. Castello, et al. (2010). "Exercise and time-dependent benefits to learning and memory." Neuroscience **167**(3): 588-597.
- Berlau, D. J. and J. L. McGaugh (2006). "Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala." Neurobiol Learn Mem **86**(2): 123-132.
- Berman, D. E., S. Hazvi, et al. (2003). "Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery." Learn Mem **10**(1): 16-25.
- Bonini, J. S., L. R. Bevilacqua, et al. (2006). "Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval." Horm Behav **50**(2): 308-313.
- Bonini, J. S., W. C. Da Silva, et al. (2011). "Histamine facilitates consolidation of fear extinction." Int J Neuropsychopharmacol **14**(9): 1209-1217.
- Bouton, M. E. (1993). "Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning." Psychol Bull **114**(1): 80-99.
- Bradley, M. M., M. K. Greenwald, et al. (1992). "Remembering pictures: pleasure and arousal in memory." J Exp Psychol Learn Mem Cogn **18**(2): 379-390.
- Brooks, G. A. and T. P. White (1978). "Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **45**(6): 1009-1015.

- Burgos-Robles, A., I. Vidal-Gonzalez, et al. (2009). "Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure." J Neurosci **29**(26): 8474-8482.
- Burgos-Robles, A., I. Vidal-Gonzalez, et al. (2007). "Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex." Neuron **53**(6): 871-880.
- Cahill, L. and J. L. McGaugh (1998). "Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory." Trends Neurosci **21**(7): 294-299.
- Cammarota, M., L. R. Bevilaqua, et al. (2005). "Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction." Neurobiol Learn Mem **84**(1): 25-32.
- Cechetti, F., P. V. Worm, et al. (2012). "Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat." Neurobiol Learn Mem **97**(1): 90-96.
- Chai, N., J. F. Liu, et al. (2014). "Delayed noradrenergic activation in the dorsal hippocampus promotes the long-term persistence of extinguished fear." Neuropsychopharmacology **39**(8): 1933-1945.
- Chang, Y. K., J. D. Labban, et al. (2012). "The effects of acute exercise on cognitive performance: a meta-analysis." Brain Res **1453**: 87-101.
- Corcoran, K. A. and S. Maren (2004). "Factors regulating the effects of hippocampal inactivation on renewal of conditional fear after extinction." Learn Mem **11**(5): 598-603.
- Costanzi, M., S. Cannas, et al. (2011). "Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory." Learn Mem **18**(8): 508-518.
- da Silva de Vargas, L., B. S. D. Neves, et al. (2017). "One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms." Behav Brain Res **329**: 120-126.
- Dash, P. K., A. N. Moore, et al. (2007). "Molecular activity underlying working memory." Learn Mem **14**(8): 554-563.
- Davis, M. (2011). "NMDA receptors and fear extinction: implications for cognitive behavioral therapy." Dialogues Clin Neurosci **13**(4): 463-474.
- de Carvalho Myskiw, J., F. Benetti, et al. (2013). "Behavioral tagging of extinction learning." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(3): 1071-1076.

- de Carvalho Myskiw, J., C. R. Furini, et al. (2014). "Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(12): 4572-4577.
- de Carvalho Myskiw, J., C. R. Furini, et al. (2015). "Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(2): E230-233.
- Dudai, Y. and M. Eisenberg (2004). "Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis." Neuron **44**(1): 93-100.
- Ennaceur, A. and J. Delacour (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." Behav Brain Res **31**(1): 47-59.
- Eric Kandel, L. S. (2003). "Memória: da mente às moléculas."
- Etnier, J. L., L. Wideman, et al. (2016). "The Effects of Acute Exercise on Memory and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)." J Sport Exerc Psychol **38**(4): 331-340.
- Etten, M. L. a. T., S. (1998). "Comparative Efficacy of Treatments for Post-traumatic Stress Disorder: A Meta-Analysis." Clin. Psychol. Psychother **5**: 18.
- Falls, W. A. and M. Davis (1993). "Visual cortex ablations do not prevent extinction of fear-potentiated startle using a visual conditioned stimulus." Behav Neural Biol **60**(3): 259-270.
- Falls, W. A., M. J. Miserendino, et al. (1992). "Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala." J Neurosci **12**(3): 854-863.
- Farmer, J., X. Zhao, et al. (2004). "Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo." Neuroscience **124**(1): 71-79.
- Flores, M. F., A. Martins, et al. (2014). "Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging." Neurochem Int **78**: 53-60.
- Furini, C., J. Myskiw, et al. (2014). "The learning of fear extinction." Neurosci Biobehav Rev **47**: 670-683.
- Furini, C. R., J. C. Myskiw, et al. (2014). "D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories." Behav Brain Res **271**: 212-217.
- Gisquet-Verrier, P. and D. C. Riccio (2012). "Memory reactivation effects independent of reconsolidation." Learn Mem **19**(9): 401-409.

- Gourley, S. L., A. T. Kedves, et al. (2009). "A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF." Neuropsychopharmacology **34**(3): 707-716.
- Graham, B. M. and R. Richardson (2011). "Memory of fearful events: the role of fibroblast growth factor-2 in fear acquisition and extinction." Neuroscience **189**: 156-169.
- Groblewski, P. A. and J. M. Stafford (2010). "When the medial prefrontal cortex fails: implications for extinction and posttraumatic stress disorder treatment." J Neurosci **30**(21): 7124-7126.
- Harris, J. A. and R. F. Westbrook (1998). "Evidence that GABA transmission mediates context-specific extinction of learned fear." Psychopharmacology (Berl) **140**(1): 105-115.
- Heidbreder, C. A. and H. J. Groenewegen (2003). "The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics." Neurosci Biobehav Rev **27**(6): 555-579.
- Heim, C. and C. B. Nemeroff (2009). "Neurobiology of posttraumatic stress disorder." CNS Spectr **14**(1 Suppl 1): 13-24.
- Hermans, D., M. G. Craske, et al. (2006). "Extinction in human fear conditioning." Biol Psychiatry **60**(4): 361-368.
- Hotting, K., N. Schickert, et al. (2016). "The Effects of Acute Physical Exercise on Memory, Peripheral BDNF, and Cortisol in Young Adults." Neural Plast **2016**: 6860573.
- Huckleberry, K. A., L. B. Ferguson, et al. (2016). "Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice." Learn Mem **23**(12): 703-709.
- Izquierdo, I. (1989). "Different forms of post-training memory processing." Behav Neural Biol **51**(2): 171-202.
- Izquierdo, I. (2018). "Memória." (3°).
- Izquierdo, I., L. R. Bevilacqua, et al. (2006). "Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation." Trends Neurosci **29**(9): 496-505.
- Izquierdo, I., C. R. Furini, et al. (2016). "Fear Memory." Physiol Rev **96**(2): 695-750.
- Izquierdo, I. and J. L. McGaugh (2000). "Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation." Behav Pharmacol **11**(7-8): 517-534.
- Izquierdo, I. and J. H. Medina (1997). "Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures." Neurobiol Learn Mem **68**(3): 285-316.

- Jasnow, A. M., J. F. Lynch, 3rd, et al. (2017). "Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders." J Neurosci Res **95**(3): 821-835.
- Kheirbek, M. A., K. C. Klemenhagen, et al. (2012). "Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders." Nat Neurosci **15**(12): 1613-1620.
- Knaepen, K., M. Goekint, et al. (2010). "Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects." Sports Med **40**(9): 765-801.
- Kobilo, T., Q. R. Liu, et al. (2011). "Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment." Learn Mem **18**(9): 605-609.
- Lafenetre, P., F. Chaouloff, et al. (2007). "The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction." Pharmacol Res **56**(5): 367-381.
- LaLumiere, R. T., T. V. Buen, et al. (2003). "Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning." J Neurosci **23**(17): 6754-6758.
- Lent, R. (2010). Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência.
- Levy-Gigi, E., C. Szabo, et al. (2015). "Reduced hippocampal volume is associated with overgeneralization of negative context in individuals with PTSD." Neuropsychology **29**(1): 151-161.
- Lewis, D. J. (1979). "Psychobiology of active and inactive memory." Psychol Bull **86**(5): 1054-1083.
- Lisman, J. E. and A. A. Grace (2005). "The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory." Neuron **46**(5): 703-713.
- Lissek, S. (2012). "Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned overgeneralization." Depress Anxiety **29**(4): 257-263.
- Lopresto, D., P. Schipper, et al. (2016). "Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder." Neurosci Biobehav Rev **60**: 31-42.
- Luyten, L., N. Schroyens, et al. (2016). "No effect of glucose administration in a novel contextual fear generalization protocol in rats." Transl Psychiatry **6**(9): e903.

- Malek, M. H., M. Huttemann, et al. (2013). "Similar skeletal muscle angiogenic and mitochondrial signalling following 8 weeks of endurance exercise in mice: discontinuous versus continuous training." Exp Physiol **98**(3): 807-818.
- Maren, S. (2001). "Neurobiology of Pavlovian fear conditioning." Annu Rev Neurosci **24**: 897-931.
- McGaugh, J. L. (2000). "Memory--a century of consolidation." Science **287**(5451): 248-251.
- McTighe, S. M., A. C. Mar, et al. (2009). "A new touchscreen test of pattern separation: effect of hippocampal lesions." Neuroreport **20**(9): 881-885.
- Medina, J. H., P. Bekinschtein, et al. (2008). "Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate?" Behav Brain Res **192**(1): 61-69.
- Meeusen, R. and K. De Meirleir (1995). "Exercise and brain neurotransmission." Sports Med **20**(3): 160-188.
- Mello-Carpes, P. B. and I. Izquierdo (2013). "The Nucleus of the Solitary Tract --> Nucleus Paragigantocellularis --> Locus Coeruleus --> CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory." Neurobiol Learn Mem **100**: 56-63.
- Menezes, J., N. Alves, et al. (2015). "Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(13): E1652-1658.
- Milad, M. R., S. A. Igoe, et al. (2009). "Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction." Neuroscience **164**(3): 887-895.
- Milad, M. R., S. L. Rauch, et al. (2006). "Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders." Biol Psychol **73**(1): 61-71.
- Milad, M. R., C. I. Wright, et al. (2007). "Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert." Biol Psychiatry **62**(5): 446-454.
- Milton, A. L. and B. J. Everitt (2010). "The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: implications for the treatment of addiction." Eur J Neurosci **31**(12): 2308-2319.
- Moncada, D. and H. Viola (2007). "Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging." J Neurosci **27**(28): 7476-7481.

- Monfils, M. H., K. K. Cowansage, et al. (2009). "Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories." Science **324**(5929): 951-955.
- Moore, R. Y. and F. E. Bloom (1979). "Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems." Annu Rev Neurosci **2**: 113-168.
- Morgan, M. A., L. M. Romanski, et al. (1993). "Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex." Neurosci Lett **163**(1): 109-113.
- Morris, R. G. (2006). "Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas." Eur J Neurosci **23**(11): 2829-2846.
- Neves, B. H., J. Menezes, et al. (2015). "Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation." Physiol Behav **152**(Pt A): 99-105.
- Nirogi, R., R. Abraham, et al. (2012). "Difference in the norepinephrine levels of experimental and non-experimental rats with age in the object recognition task." Brain Res **1453**: 40-45.
- O'Callaghan, R. M., R. Ohle, et al. (2007). "The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning." Behav Brain Res **176**(2): 362-366.
- Ochsner, K. N. (2000). "Are affective events richly recollected or simply familiar? The experience and process of recognizing feelings past." J Exp Psychol Gen **129**(2): 242-261.
- Onat, S. and C. Buchel (2015). "The neuronal basis of fear generalization in humans." Nat Neurosci **18**(12): 1811-1818.
- Palomba, D., A. Angrilli, et al. (1997). "Visual evoked potentials, heart rate responses and memory to emotional pictorial stimuli." Int J Psychophysiol **27**(1): 55-67.
- Pâmela Billig Mello-Carpes, I. I. (2010). "Participação da via NTS-PGI-LC-hipocampo (núcleo do trato solitário- núcleo paragigantocelular-Locus coeruleus-hipocampo) na consolidação da memória de reconhecimento de objetos." Instituto de ciências biológicas da saúde: 161.
- Parfitt, G. M., A. K. Barbosa, et al. (2012). "Moderate stress enhances memory persistence: are adrenergic mechanisms involved?" Behav Neurosci **126**(5): 729-734.

- Pavlov, P. I. (2010). "Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex." Ann Neurosci **17**(3): 136-141.
- Paxinos, G. and C. Watson (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney ; Orlando, Academic Press.
- Pellow, S., P. Chopin, et al. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." J Neurosci Methods **14**(3): 149-167.
- Radak, Z., T. Kaneko, et al. (2001). "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain." Neurochem Int **38**(1): 17-23.
- Rajzadeh, M. A., K. Esmailpour, et al. (2018). "Voluntary exercise impact on cognitive impairments in sleep-deprived intact female rats." Physiol Behav **188**: 58-66.
- Riesenhuber, M. and T. Poggio (2002). "Neural mechanisms of object recognition." Curr Opin Neurobiol **12**(2): 162-168.
- Rooszendaal, B., S. Okuda, et al. (2006). "Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6741-6746.
- Rossato, J. I., L. R. Bevilaqua, et al. (2009). "Dopamine controls persistence of long-term memory storage." Science **325**(5943): 1017-1020.
- Rubin, D. C. and M. Friendly (1986). "Predicting which words get recalled: measures of free recall, availability, goodness, emotionality, and pronunciability for 925 nouns." Mem Cognit **14**(1): 79-94.
- Schiller, D., M. H. Monfils, et al. (2010). "Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms." Nature **463**(7277): 49-53.
- Schmidt, H. L., A. Vieira, et al. (2014). "Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation." Neurobiol Learn Mem **114**: 242-250.
- Sierra-Mercado, D., Jr., K. A. Corcoran, et al. (2006). "Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction." Eur J Neurosci **24**(6): 1751-1758.
- Sierra-Mercado, D., N. Padilla-Coreano, et al. (2011). "Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear." Neuropsychopharmacology **36**(2): 529-538.
- Squire, L. R. (1986). "Mechanisms of memory." Science **232**(4758): 1612-1619.

- Squire, L. R. (2004). "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective." Neurobiol Learn Mem **82**(3): 171-177.
- Squire, L. R., J. T. Wixted, et al. (2007). "Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective." Nat Rev Neurosci **8**(11): 872-883.
- Steckler, T., W. H. Drinkenburg, et al. (1998). "Recognition memory in rats--I. Concepts and classification." Prog Neurobiol **54**(3): 289-311.
- Szapiro, G., J. M. Galante, et al. (2002). "Molecular mechanisms of memory retrieval." Neurochem Res **27**(11): 1491-1498.
- Talpos, J. C., S. M. McTighe, et al. (2010). "Trial-unique, delayed nonmatching-to-location (TUNL): a novel, highly hippocampus-dependent automated touchscreen test of location memory and pattern separation." Neurobiol Learn Mem **94**(3): 341-352.
- Thompson, R. F. (1976). "The search for the engram." Am Psychol **31**(3): 209-227.
- Tita, B., H. Abdel-Haq, et al. (2001). "Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test." Farmacol **56**(5-7): 341-343.
- Unsworth, N. and R. W. Engle (2007). "On the division of short-term and working memory: an examination of simple and complex span and their relation to higher order abilities." Psychol Bull **133**(6): 1038-1066.
- Vargas, L. S., M. V. Lara, et al. (2014). "The intrahippocampal infusion of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom enhances memory persistence in rats." Toxicol **85**: 52-58.
- Vertes, R. P. (2006). "Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat." Neuroscience **142**(1): 1-20.
- Vidal-Gonzalez, I., B. Vidal-Gonzalez, et al. (2006). "Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear." Learn Mem **13**(6): 728-733.
- Walker, D. L., K. J. Ressler, et al. (2002). "Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats." J Neurosci **22**(6): 2343-2351.
- Xu, Y., J. Yan, et al. (2012). "Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." Prog Neurobiol **97**(1): 1-13.

Yang, Y. and A. Raine (2009). "Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis." Psychiatry Res **174**(2): 81-88.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pro-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413-4323, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 027/2013

Título: PARTICIPAÇÃO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL NA AQUISIÇÃO E EXTINÇÃO
DAS MEMÓRIAS DE MEDO

Data da aprovação: 17/12/2013

Período de vigência do projeto: De: 12/2013 Até: 12/2016

Pesquisador: Pâmela Billig Melo Carpes

Campus: URUGUAIANA

Telefone: (55) 9661-2454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis
Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
FUNDAÇÃO INSTITUCIONAL FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.606, de 11 de agosto de 2008)



Pré-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPI)
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Endereço: 96201-900 - Fone: CEUA@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 001/2017
Título: Efeitos da novidade na generalização das memórias de medo: uma investigação da participação dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico.
Data da aprovação: 12/04/2017
Período de vigência do projeto: 12/04/2019
Pesquisador(a): Pâmela Billing Meira Carpes
Campus: Uruguaiana
Telefone: (55) 99661-2454
E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

CEUA

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistars
Nº de animais	162
Peso/Idade	250-300g / 120dias
Sexo	machos
Origem	Biotério da Universidade Federal do Pampa

Manfredini
Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA

ANEXO III



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.940, de 11 de janeiro de 2009)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (51) 361-4266, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 020/2017

Título: Efeitos do exercício físico agudo na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos e envolvimento dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico.

Data da aprovação: 30/06/2017

Período de vigência do projeto: 30/06/2019

Pesquisador(a): Pâmela Billig Meilo Carpes

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 99661-2454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

CEUA

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	190
Peso/Idade	250-300 g / 120 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria

Manfredini

Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Novelty exposure hinders aversive memory generalization and depends on hippocampal protein synthesis



Liane da Silva de Vargas^{a,c}, Dieuwke Sevenster^b, Karine R. Lima^c, Iván Izquierdo^d, Rudi D'Hooge^e, Pâmela B. Mello-Carpes^{a,c,e}

^a Graduate Program on Biological Sciences: Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Dept. Clinical Psychology, University of Utrecht, The Netherlands

^c Physiology Research Group, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

^d National Institute of Translational Neuroscience, National Research Council of Brazil, and Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Laboratory of Biological Psychology, University of Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords

Fear generalization
Novel context
Hippocampus
Anisomycin
Rapamycin

ABSTRACT

Fear generalization is defined as the transferring of fear experienced during a traumatic event to safe conditions resembling or not the traumatic event. It has been related to several psychological disorders. Here we set out to determine whether novelty exposure can be effective to avoid fear generalization. We evaluated the effect of a novelty exposure on fear memory generalization using an aversive memory task, the inhibitory avoidance (IA). Male Wistar rats were trained in IA (day 1) and 24 h after (day 2) they were exposed to a new context similar to the original (modified IA - MIA), with some rats being exposed to a novelty just before the exposure to the MIA, while others were not (controls). On day 3, retention tests for IA and MIA contexts were performed. The control rats generalized the memory, expressing aversive behavioral in both contexts whereas rats exposed to novelty only expressed aversion on IA. Furthermore, both anisomycin, an inhibitor of ribosomal protein synthesis, and rapamycin, an inhibitor of mTOR-mediated protein synthesis, injected in the CA1 region of dorsal hippocampus blocked the novelty effect, promoting memory generalization. We conclude that novelty exposure hinders aversive memory generalization depending on hippocampal protein synthesis.

1. Introduction

When we are exposed to an aversive situation, which may be life-threatening, fear is the normal adaptive response, indispensable to prevent harmful situations [1]. However, fear should be expressed only at specific moments, otherwise it can have negative impact on daily life. Events involving a strong degree of emotional alertness are often remembered for a longer time and in more detail, due to the persistence of an emotional memory [2–7]. The hippocampus is the crucial structure involved in the processes of long-term memory formation [8], and is also involved in the processes that determine the memory persistence. Both processes involve a series of molecular events that culminate in protein synthesis, such as brain-derived neurotrophic factor [9–11].

When memories arise from traumatic events and lead to an aversive memory generalized to different contexts it can become a problem [12,13]. Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric disorder that occurs in conditions of intense fear [14]. It can lead to serious and

substantial disability that extends to occupational and interpersonal domains [15,16]. In PTSD, intense and persistent generalized fear responses are often evoked by contexts that resemble the conditions of the original traumatic event [12,13]. Generalization is often described as an inability to discriminate different stimuli [17,18], but it often involves situations and stimuli that would normally be easily distinguished [17]. Stress disorders can lead to fear overgeneralization, which means that triggers that are not actually linked to the original traumatic event evoke maladaptive fear [19,20]. Therefore, depending on the extent of the generalization, it may lead to inadequate physiological and behavioral responses that affect daily life. There remains a need for new or improved treatment strategies, since the available pharmacological and psychological therapies offer already significant relief, but have several important limitations, as the such as the non-response to pharmacological treatment (about 40%), or limitations related to the rate of patients that reach the remission of the disease, which is still very low (only 20 to 30%) [21,22].

* Corresponding author at: Memory and Behavioral Lab, Federal University of Pampa, BR 472, km 592, PO box 118, Zip code 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.
E-mail address: pamelacarpes@unipampa.edu.br (P.B. Mello-Carpes).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.034>

Received 26 July 2018; Received in revised form 15 October 2018; Accepted 23 October 2018

Available online 24 October 2018

0166-4328/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

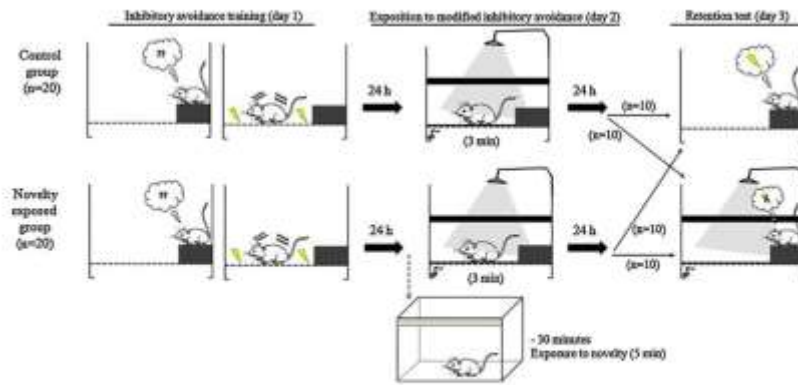


Fig. 1. Illustration of the first set of behavioral experiments. On day 1, rats were trained in inhibitory avoidance task (IA). On day 2 they were exposed to the modified inhibitory avoidance (MIA) for 3 min; half of them were submitted a novelty exposure for 5 min, 30 min before MIA exposure. On day 3 half of the animals in each group was tested in IA and the other half in MIA.

Extinction of fear memories through exposure therapy is an accepted strategy in the treatment of PTSD [23–25]. Extinction can be understood as a new learning that overlaps with the initial traumatic learning. Thus, the individual is exposed to situations similar to the traumatic ones, and is promoted to remember the traumatic event and experience that the situation is not always a source of risk or danger. This learning overlaps with the one from the traumatic event, inhibiting the unnecessary evocation of original fear memory [26,27]. However, also the use of extinction on PTSD treatment has limitations. With the passage of time, a re-exposure to the traumatic environment, can reactivate the extinct response, a phenomenon called spontaneous recovery [28].

The exposure to novelty during a critical time window before or after extinction learning induces protein synthesis, and the concomitant formation of long-lasting memories involves poorly understood molecular processes such as synaptic tagging and capture of plasticity-related proteins (PRPs) [29–32]. This synaptic tagging and capture (STC) mechanism has effectively explained the interaction between simultaneous memories of novelty and fear acquisition [29,33], and novelty and fear extinction [31,32,34]. Here, we hypothesize that novelty exposure, by induction of STC, could facilitate the process of differentiation of similar, but not equal contexts, by avoiding the generalization of an aversive memory. We demonstrated that novelty exposure, prior to exposure to a similar environment to the aversive one, could avoid aversive memory generalization. Furthermore, we show that the effect of novelty depends on hippocampal protein synthesis.

2. Material and methods

2.1. Animals

One hundred and twenty male Wistar rats (3 months old, 300–350 g) purchased from the Federal University of Santa Maria Central Vivarium (RS/Brazil) were housed four per cage and maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 10\%$ humidity), with food and water ad libitum. All experiments were conducted in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care of the National Institutes of Health and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee from the local University (Institutional Review Board 001/2017).

2.2. Experimental design

The experiments were conducted in two stages, in the first stage we investigated the effect of novelty on the generalization of aversive memory; in the second stage we investigated the possible involvement of protein synthesis in the effect of novelty on the generalization of

aversive memory.

To evaluate the aversive memory, all animals were submitted to the inhibitory avoidance task (IA), which consists in an aversive training (day 1) and a later test (day 3). In order to evaluate the generalization of aversive memory, in day 2 all animals were exposed to an environment similar to the original (but not identical): they were placed in the modified inhibitory avoidance (MIA), which is a non-aversive. To test the novelty effect, some of the animals were exposed to a new environment before being exposed to the MIA. The experimental steps with the respective groups and the details about the apparatus and tasks are described below.

2.2.1. Stage 1: effects of novelty on memory generalization

For these experiments, 40 animals were divided into two groups:

- Control group ($n = 20$): rats were trained in inhibitory avoidance (IA) on day 1, and, on day 2 they were exposed to a modified inhibitory avoidance (MIA) for 3 min;
- Novelty-exposed group ($n = 20$): rats were submitted to the same procedures of the group (i), but 30 min before MIA they were exposed to a novelty (an unfamiliar open field) for 5 min.

On day 3, half of the animals from each group were tested in IA ($n = 10/\text{group}$) and another half in MIA ($n = 10/\text{group}$) to determine the step-down latency and the ability to discriminate the environments (memory differentiation or generalization) (see Fig. 1). It was expected that the rats that were able to discriminate IA and MIA presented a high step-down latency in the IA test (aversive response) and a low one in the MIA test (non-aversive behavior).

2.2.2. Stage 2: need of hippocampal protein synthesis to mediate novelty effects on memory generalization

For these experiments, 80 animals were divided into four groups:

- Control group ($n = 20$): rats were trained in inhibitory avoidance (IA) on day 1, and, on day 2 they were exposed to modified inhibitory avoidance (MIA) for 3 min;
- Novelty-exposed group ($n = 20$): rats were submitted to the same procedures of the group (i), but 30 min before the exposure to MIA they were exposed to a novelty (an unfamiliar open field) for 5 min, and immediately after novelty exposure, they received an intrahippocampal infusion of drug vehicle;
- Novelty + Ani group ($n = 20$): rats were submitted to the same procedures of the group (ii), but immediately after exposure to novelty exposure they received an intrahippocampal infusion of anisomycin (Ani), an inhibitor of ribosomal protein translation.
- Novelty + Rapa group ($n = 20$): rats were submitted to the same procedures of the group (ii), but immediately after novelty

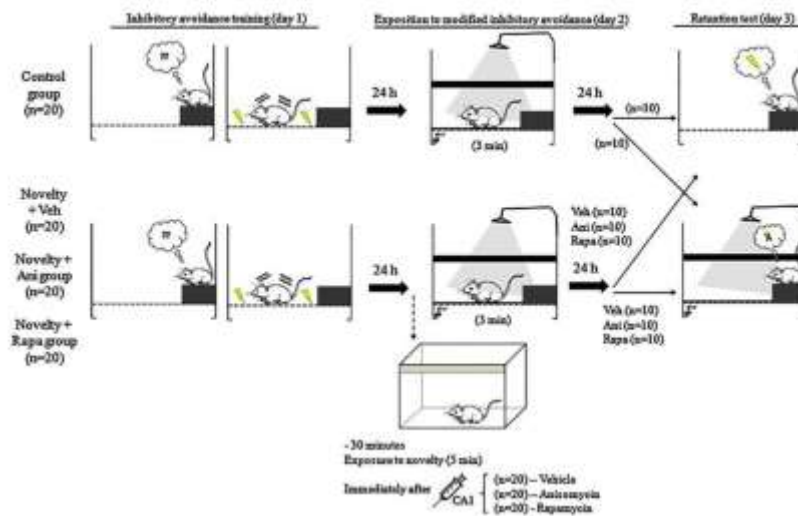


Fig. 2. Illustration of the second set of behavioral experiments. On day 1, rats were trained in inhibitory avoidance (IA). On day 2 they were exposed to the modified inhibitory avoidance (MIA) for 3 min; some animals were submitted to the novelty exposure for 5 min, 30 min before MIA exposure and then received an anisomycin or a rapamycin or a drug vehicle infusion into CA1 region of the hippocampus immediately after novelty exploration. On day 3 half of the animals from each group was tested on IA and the other half in MIA.

exposure they received an intrahippocampal infusion of rapamycin (Rapa) an inhibitor of mTOR-mediated protein synthesis.

On day 3, half of the animals from each group were tested in IA ($n = 10/\text{group}$) and the other half in MIA ($n = 10/\text{group}$) (Fig. 2).

2.3. Behavioral tests protocols

2.3.1. Aversive memory training

Rats were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance task (IA). The training apparatus was a 50 cm × 25 cm × 25 cm Plexiglas box 5 cm high, 8 cm wide, and 25 cm long acrylic platform on the left end of bronze bars that made up the floor of the box [9]. For training, rats were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed the four paws on the grid a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock was delivered and then they were withdrawn from the apparatus immediately and returned to the cage.

2.3.2. Exposure to the modified context

The modified inhibitory avoidance (MIA) refers to an environment similar to the original (i.e., IA used in the training previously described), with the following modifications: (a) a black floor replacing the bronze bars, making impossible the contact of the animal's legs with the bars and without the propagation of the footshock (b) two horizontal black bands on the frontal wall, (c) a citric aroma and (d) a red light projected under the apparatus (Fig. 3). The animals were gently placed on the platform of MIA facing the left rear corner of the training box. When they stepped down they did not receive any electrical stimulus, and were allowed to explore the apparatus during 3 min. This apparatus is used to verify the differentiation or generalization of aversive memory.

2.3.3. Novelty exposure

Exposure to the novelty was conducted for some animals 30 min before the exposure to the MIA [31,34]. It consisted in placing the rat in a novel environment, an unfamiliar 50 × 50 × 60 cm wooden open field box painted in white with a frontal glass wall. The rats were individually moved from the home cage to the field, where they were left to explore freely for 5 min, after which they were returned to the home cage.

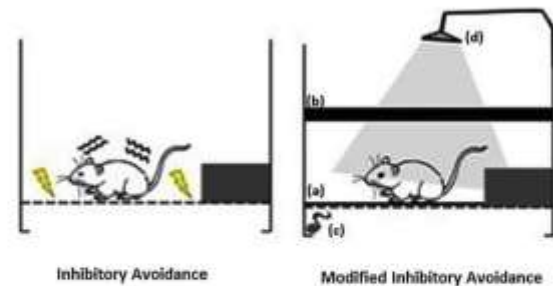


Fig. 3. Illustration of the inhibitory avoidance (IA) and the similar environment (modified inhibitory avoidance - MIA) used in the experiments. In the MIA: (a) black floor replacing the bronze bars; (b) two horizontal black bands on the frontal wall; (c) a citric aroma and (d) a red light projected under the apparatus. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

2.3.4. Retention test

Forty-eight hours after IA training, half of the animals were tested in IA and the other half in MIA. The rats were gently placed on the platform facing the left rear corner of the IA or MIA. When they stepped down and placed their four paws on the grid the test was finalized and step-down latency of the platform was recorded.

2.4. Surgery

For the second set of experiments, indwelling cannulae were implanted in the animals CA1 region of the hippocampus under deep anesthesia with ketamine and xylazine (i.p., 75 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). The cannulae were 27-gauge stainless steel tubes stereotaxically aimed at the CA1 region of the dorsal hippocampus (A, -4.2; L, ± 3.0; and V, -2.0 mm) - coordinates according to Paxinos and Watson [35]. The cannulae were affixed with dental cement. Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting them to any other procedure.

2.5. Drugs and drugs' administration

All drugs used were purchased from Sigma-Aldrich Brazil and dissolved in 2% (vol/vol) DMSO in saline (VEH) to a total infusion volume

of 1 μ L per side. Infusions were performed into the dorsal CA1 region of the hippocampus on both sides. At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulas were tightly fitted into the guides. Infusions of drug or VEH (1 μ L per side in the CA1 region of the dorsal hippocampus) were carried out over 60 s with an infusion pump, and the cannulas were left in place for additional 60 s to minimize backflow. Drugs and doses used were as follow: 1) the inhibitor of mTOR-mediated protein synthesis, rapamycin (5 μ g per side), and 2) the inhibitor of ribosomal protein translation anisomycin, (80 μ g per side). These doses were found to be effective previously [36]. The placement of cannulas was verified postmortem: 2–4 h after the last behavioral test, a 4% methylene-blue solution was infused in the same volume used in each of the mentioned places as described earlier, and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct implants and no significant adjacent structure tissue spread were analyzed.

2.6. Control behavioral tasks

To analyze exploratory and locomotor activities and ensure that the drug infusion did not impair such behaviors, which could alter results of the memory tests, after drug or vehicle infusion rats were placed in the left quadrant of a 50 \times 50 \times 39 cm of an open field (OF) made with wood painted white with a frontal glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures for locomotor and exploratory activities, respectively, were measured over 5 min [37]. To evaluate anxiety state and ensure that the drug or vehicle infusion did not impair such behavior, 24 h after drug or vehicle infusion rats were placed in an elevated plus maze (EPM) as described elsewhere [38]. The number of entries and time spent into the open arms were recorded over a 5-min session. To evaluate the nociceptive response and sensitivity of the paws of the animals and ensure that the drug or vehicle infusion did not impair these functions that are important for IA learning, the Hot Plate (HP) test was used [39]. The rat was placed in an apparatus with a heated metal sheet (55 \pm 0.5 $^{\circ}$ C) and time until the animal reacts to the thermal stimulus by raising or licking the paws was determined.

2.7. Statistical analysis

A ceiling of 300 s was imposed to step-down latencies during the retention tests (latencies equal or higher than 300 s were counted as 300 s). This variable did not follow a normal distribution and was analyzed by Mann-Whitney U test (comparisons between two groups, in the first set of experiments) or Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA (comparisons between more than two groups, in the second set of experiments). Wilcoxon test was used to compare the step-down latency differences between the training and test in each group. IA data were expressed as median \pm interquartile range. The OF, EPM and HP data were analyzed using parametric ANOVA and were expressed as mean \pm SD. The sample size (n, number of animals in each group) for each experiment is stated in the figure captions. The differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Exposure to a novelty avoids aversive memory generalization

The animals exposed to the novelty before MIA on day 2 did not present aversive memory generalization, while the others were unable to differentiate the two contexts used in the first set of experiments (Figs. 1 and 3). Groups did not differ in IA training (U = 144, $P = 0.58$, Fig. 4 – IA training Day 1; n = 20/group). In the IA testing session both groups showed preserved aversive memory (U = 31, $P > 0.99$, Fig. 4 – IA test Day 3; n = 10/group); both groups showed higher step-down

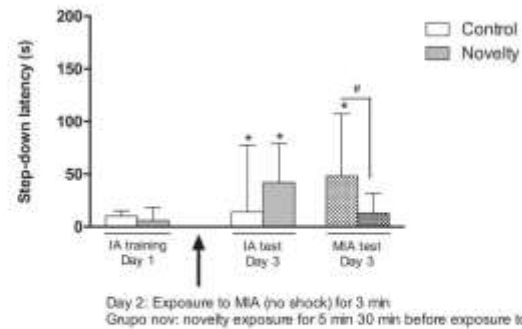


Fig. 4. Novelty exposure hinders aversive memory generalization. On day 1 all rats were trained in IA. On day 2 all rats were submitted to MIA, exploring for 3 min; rats from the novelty group were exposed to a novelty for 5 min, 30 min before MIA exploration. On day 3 half of the rats from each group was tested in IA and the other half in MIA. Data represent the step-down latency in IA or MIA, expressed as median \pm interquartile range (n = 10 animals per group). * $P \leq 0.05$ in Wilcoxon test (training vs. test); * $P \leq 0.05$ in Mann-Whitney U test (groups' comparisons in each experimental day).

latency in testing compared to training session (W = 24, $P = 0.04$ for the control group; W = 34; $P = 0.04$ for the novelty group; Fig. 4 – IA test Day 3; n = 10/group). In the test performed in the MIA differences between groups were observed (U = 9.00, $P = 0.01$, Fig. 4 – MIA test Day 3; n = 10/group); additionally, only the control group showed a high step-down latency when tested in the MIA (W = 28, $P = 0.01$ for the control group; W = 13; $P = 0.47$ for the novelty group; Fig. 4 – MIA test Day 3; n = 10/group).

3.2. Novelty effects on memory generalization depends on hippocampal protein synthesis

The rats exposed to the novelty before MIA did not present aversive memory generalization, as observed in the control group. However, when the rats exposed to the novelty received an intrahippocampal infusion of Anisomycin or Rapamycin immediately after the novelty exposure, they present generalization, which indicate that the effect of novelty depends on hippocampal protein synthesis.

There were no differences between the groups in IA training ($H_{(4)} = 3.4$, $P = 0.33$, Fig. 5A – training/rats after tested in IA; $H_{(4)} = 5.33$, $P = 0.14$, Fig. 5B – training/rats after tested in MIA). In the test performed in the IA all groups showed preserved aversive memory; there were no differences between the groups ($H_{(4)} = 1.61$, $P = 0.65$, Fig. 5A – test in the IA); all groups showed higher step-down latency in the testing compared to the training session (W = 36, $P = 0.007$ for the control group; W = 28; $P = 0.01$ for the novelty group; W = 21; $P = 0.03$ for the novelty + Ani group; W = 21, $P = 0.03$ for the novelty + Rapa group, Fig. 5A – test in the IA). In the test performed in MIA differences between groups were observed ($H_{(4)} = 14.57$, $P = 0.002$, Fig. 5B – test in the MIA), being the step-down latency of novelty group shorter than the others. Only the novelty group showed no differences between the MIA test step-down latency and the IA training session (W = 21, $P = 0.03$ for the control group; W = -2.0; $P = 0.75$ for the novelty group; W = 21; $P = 0.03$ for the novelty + Ani group; W = 21, $P = 0.03$ for the novelty + Rapa group, Fig. 5B – test in the MIA).

3.3. Hippocampal drug infusions do not impair anxiety, pain threshold, and locomotor and exploratory behaviors

Rats were tested in the OF, EPM, and HP tests after the VEH, RAPA and ANI infusions and novelty exposure to verify whether exploratory and locomotor activities, anxiety, and pain thresholds, respectively,

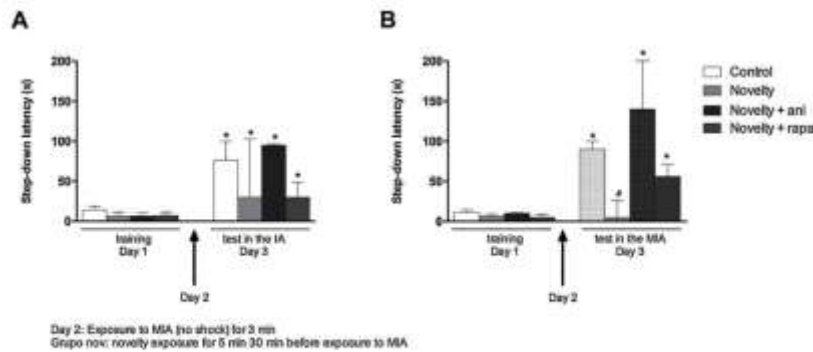


Fig. 5. Anisoencycin and Rapamycin infusions into the CA1 region of the hippocampus after the novelty exposure hinder the effect of novelty in memory generalization prevention. On day 1 all rats were trained in IA. On day 2 all rats were submitted to MIA exploration for 3 min; the novelty, novelty + ani and novelty + rapa groups were exposed to a novelty for 5 min, 30 min before MIA exploration; the novelty, novelty + ani and novelty + rapa groups received infusion of vehicle, Anisoencycin or Rapamycin immediately after the novelty exposure. On day 3 half of the rats of each group were tested in IA (A) and the other half in the MIA (B). Data represent the step-down latency in IA (A) or MIA (B - test) expressed as median \pm interquartile range

($n = 10$ animals per group). * $P \leq 0.05$ in Wilcoxon test (training vs. test); * $P \leq 0.05$ in Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA followed by Dunn's post-hoc.

Table 1

Neither the drugs or vehicle nor the novelty exposure affected performance in the OF, PM, and HP. Data are expressed as mean \pm SD of the number of crossings and rearings (OF), the time spent and the number of entries in the open arms (PM), and latency time for the raising or licking the paws (HP). There were no differences between the groups ($P > 0.05$; ANOVA; $n = 10$ per group for all tests).

Behavioral tasks		Groups			
		Control	Novelty + VEH	Novelty + ANI	Novelty + RAPA
OF	Crossings, n	66.2 \pm 14.6	60.1 \pm 13.8	66.6 \pm 12.7	65.6 \pm 9.4
	Rearings, n	18.3 \pm 6.3	17.2 \pm 5.6	16.3 \pm 5.1	17.3 \pm 3.7
PM	Total entries in open arms, n	5.5 \pm 1.9	5.1 \pm 1.4	5.9 \pm 1.4	5.9 \pm 1.4
	Time in open arms, s	139 \pm 43.7	149.1 \pm 50.6	153.9 \pm 40.2	149.3 \pm 37.9
HP	Latency, n	8.4 \pm 2.2	8.2 \pm 2.3	8.1 \pm 2.1	8.4 \pm 2.2

were affected by the drug or vehicle infusions. Neither the drugs or vehicle, nor the exposure to novelty, affected the evaluated parameters (Table 1).

4. Discussion

We demonstrated that novelty exposure prevents aversive memory generalization. Furthermore, we showed that the effects of novelty exposure on memory discrimination depend on hippocampal protein synthesis. Previous studies by our group and others illustrated the effects of novelty on modulation of memory [29,31,32]. These studies show that the exposure to a new environment/a novelty, close to the time of a weak learning, is able to favor the learning, i.e., make possible that both experiences (weak learning and novelty) promote long-term memories (LTM) [29]. Novelty exposure can improve fear memory extinction [32], and a weak IA extinction protocol, that previously did not promote extinction, could promote it when preceded by novelty exposure [31]. Exposure therapies are used in PTSD treatment in humans, and researches on strategies that improve memory extinction are of interest to researchers and mental health professionals.

Apart from memory extinction and its relation with exposure therapies, we also want to refer to processes of memory discrimination and generalization. Generalization of fear responses to contexts that may be similar, but not equally dangerous as the one in which the aversive memory was acquired, can lead to pathological fear and avoidance behavior [19,20]. These situations can occur in disorders that involve intense fear (such as PTSD), when the fear memories involuntary evoked by nonspecific situations or contexts that resemble the original traumatic event [19,40]. As mentioned, the ability to discriminate between new and familiar individuals or objects, or a neutral and a hazardous environment, for example, allows an animal to benefit from prior experience and avoid life-threatening conditions [41,42].

We found that when rats were exposed to an environment similar, but not equal, to the one where the aversive stimulus was delivered,

they express aversive behaviors. This phenomenon resembles fear memory generalization. On the other hand, when the rats were exposed to novelty prior to their exposure to the similar context, they appear to recognize the specificity of the context, showing memory precision (i.e., novelty exposure avoided memory generalization). Notably, this novelty effect was shown to depend on hippocampal protein synthesis, since the infusion of protein inhibitors in hippocampal CA1 region blocked the effects of novelty. This dependence of the novelty effect on protein synthesis is consistent with previous studies. For example, infusion of anisoencycin in CA1 region of dorsal hippocampus blocks the effect of novelty on LTM formation [29]. Similarly, facilitation of extinction by novelty required protein synthesis, both in fear conditioning as in inhibitory avoidance [31,32]. According to the STC hypothesis, novelty provides expression of plasticity-related proteins (PRPs) that can stabilize a weak memory trace [43]. The idea is that a novel experience is a behavioural event that is strong enough to induce protein synthesis and an LTM [43]. If it is associated with a learning experience that was able to promote only short-term memory (STM), i.e., a weak learning, it would be possible that they share the PRPs whose production was induced by novelty, so, both experiences could promote LTM. In our study, these PRPs strengthened MIA learning, enabling rats to discriminate between two related environments (similar/safe and original/aversive).

Importantly, our present results indicate that novelty exposure may not only facilitate the extinction process, as previously demonstrated [31,32], but also facilitate the discrimination of an aversive context of a similar but non-aversive context, improving discrimination and avoiding the memory generalization. In other words, novelty exposure hinders memory generalization, which might be relevant to the therapeutic applicability of novelty exposure in fear disorders, since it can be adopted as a behavioral strategy, which does not involve the use of drugs. It is an important application, since, as previously mentioned, the actual treatments for fear disorders present limitations related to the response and efficacy of the treatment [21].

The phenomenon of generalization may involve other brain regions besides hippocampus. Hippocampus is assumed to be the main region involved in the generalization process [44], and it appears to be essential to ensure disambiguation of overlapping sensory inputs (i.e., pattern separation [45,46]). Accordingly, reduced hippocampal volume was associated with generalization of negative contexts in PTSD patients [47]. However, other brain regions may be involved as well. In fact, hippocampal and prefrontal deficits influenced context generalization (with cued generalization depending on prefrontal-amygdala circuitry), where as insular hyperactivity reduced prefrontal control on generalization [19].

Acknowledgments

This work was supported by research grants from the Federal University of Rio Grande do Sul, Federal University of Pampa, Brazilian National Council of Research (CNPq/Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/RS/Brazil). CNPq/Brazil supports LSV, II and PBMC. KL is supported by FAPERGS. PBMC is supported by For Women in Science Program from L'Oreal and UNESCO. Authors acknowledge Dr. Felipe Carpes for the critical review of the early draft of the manuscript.

References

- [1] A. Shalev, I. Liberzon, C. Marmar, Post-traumatic stress disorder, *N. Engl. J. Med.* 376 (25) (2017) 2459–2469.
- [2] M.M. Bradley, M.K. Greenwald, M.C. Petty, P.J. Lang, Remembering pictures: pleasure and arousal in memory, *J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn.* 18 (2) (1992) 379–390.
- [3] R.N. Ochsner, Are affective events richly recollected or simply familiar? The experience and process of recognizing feelings past, *J. Exp. Psychol. Gen.* 129 (2) (2000) 242–261.
- [4] J.L. McGaugh, Making lasting memories: remembering the significant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (Suppl. 2) (2013) 10402–10407.
- [5] R.A. Sarabjitsingh, N. Pasricha, J.A. Smeets, A. Keckhoft, L. Mikasova, H. Karst, L. Geoc, M. Joels, Hippocampal fast glutamatergic transmission is transiently regulated by corticosterone pulsatility, *PLoS One* 11 (1) (2016) e0145056.
- [6] M. Joels, R.A. Sarabjitsingh, H. Karst, Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes, *Pharmacol. Rev.* 64 (4) (2012) 901–938.
- [7] M. Joels, H. Karst, D. Alfarez, V.M. Heine, Y. Qin, E. van Riel, M. Verkiy, P.J. Lucassen, H.J. Krugers, Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus, *Stress* 7 (4) (2004) 221–231.
- [8] J.L. McGaugh, I. Izquierdo, The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (6) (2000) 209–210.
- [9] J.J. Rossato, L.R. Bevilaqua, I. Izquierdo, J.H. Medina, M. Cammarota, Dopamine controls persistence of long-term memory storage, *Science* 325 (5943) (2009) 1017–1020.
- [10] P. Bekinschtein, M. Cammarota, L.M. Izuz, L.R. Bevilaqua, I. Izquierdo, J.H. Medina, Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus, *Neuron* 53 (2) (2007) 261–277.
- [11] J.H. Medina, P. Bekinschtein, M. Cammarota, I. Izquierdo, Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav. Brain Res.* 192 (1) (2008) 61–69.
- [12] J.P. Hayes, S.M. Hayes, A.M. Mikedis, Quantitative meta-analysis of neural activity in posttraumatic stress disorder, *Biol. Mood Anxiety Disord.* 2 (2012) 9.
- [13] B.G. Parsons, K.J. Bessler, Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders, *Nat. Neurosci.* 16 (2) (2013) 146–153.
- [14] M. Reynolds, C.R. Brewin, Intrusive cognitions, coping strategies and emotional responses in depression, post-traumatic stress disorder and a non-clinical population, *Behav. Res. Ther.* 36 (2) (1998) 135–147.
- [15] N. Breslau, R.C. Kessler, H.D. Chilcote, L.R. Schultz, G.C. Davis, P. Andreski, Trauma and posttraumatic stress disorder in the community: the 1996 Detroit Area Survey of Trauma, *Arch. Gen. Psychiatry* 55 (7) (1998) 626–632.
- [16] R. Yehuda, Post-traumatic stress disorder, *N. Engl. J. Med.* 346 (2) (2002) 108–114.
- [17] J.E. Dunsmuir, G.L. Murphy, Categories, concepts, and conditioning: how humans generalize fear, *Trends Cogn. Sci. (Heijl. Ed.)* 19 (2) (2015) 73–77.
- [18] S. Oeat, C. Buchel, The neuronal basis of fear generalization in humans, *Nat. Neurosci.* 18 (12) (2015) 1811–1818.
- [19] D. Lopresti, P. Schipper, J.R. Humberg, Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 60 (2016) 31–43.
- [20] L. Luyten, N. Schroyens, E. Layek, M.S. Fasselov, T. Beckers, No effect of glucose administration in a novel contextual fear generalization protocol in rats, *Transl. Psychiatry* 6 (9) (2016) e902.
- [21] W. Benger, M.V. Mendlowicz, C. Marques-Portella, G. Kirory, L.F. Fontanelle, C.R. Marmar, I. Figueira, Pharmacologic alternatives to antidepressants in post-traumatic stress disorder: a systematic review, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33 (2) (2009) 169–180.
- [22] M.B. Powers, J.M. Hulstijn, M.P. Feenochak, S.J. Gilliam, E.B. Foa, A meta-analytic review of prolonged exposure for posttraumatic stress disorder, *Clin. Psychol. Rev.* 30 (6) (2010) 635–641.
- [23] M.R. Milad, C.T. Wright, S.P. Orr, R.R. Pitman, G.J. Quirk, S.L. Rauch, Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert, *Biol. Psychiatry* 62 (5) (2007) 446–454.
- [24] M. Davis, NMDA receptors and fear extinction: implications for cognitive behavioral therapy, *Dialogues Clin. Neurosci.* 13 (4) (2011) 465–474.
- [25] C. Helm, C.B. Nemeroff, Neurobiology of posttraumatic stress disorder, *CNS Spectr.* 14 (1 Suppl. 1) (2009) 13–24.
- [26] M.E. Bouton, Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning, *Psychol. Bull.* 114 (1) (1993) 80–99.
- [27] C. Furrini, J. Myskiw, I. Izquierdo, The learning of fear extinction, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 47 (2014) 670–683.
- [28] M.E. Bouton, Context and behavioral processes in extinction, *Learn. Mem.* 11 (5) (2004) 485–494.
- [29] D. Monaco, H. Viola, Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging, *J. Neurosci.* 27 (28) (2007) 7476–7481.
- [30] F. Ballarín, D. Monaco, M.C. Martínez, N. Alen, H. Viola, Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (34) (2009) 14599–14604.
- [31] J. Menezes, N. Alves, S. Borges, R. Buehler, J. de Carvalho Myskiw, C.R. Furrini, I. Izquierdo, P.B. Mello-Carpes, Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (13) (2015) E1652–8.
- [32] J. de Carvalho Myskiw, C.R. Furrini, F. Benetti, I. Izquierdo, Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (12) (2014) 4572–4577.
- [33] D. Monaco, H. Viola, Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: a molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiol. Learn. Mem.* 86 (1) (2006) 9–18.
- [34] J. de Carvalho Myskiw, F. Benetti, I. Izquierdo, Behavioral tagging of extinction learning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (3) (2013) 1071–1076.
- [35] G.P.C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 1986.
- [36] J. de Carvalho Myskiw, C.R. Furrini, B. Schmidt, F. Ferreira, I. Izquierdo, Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2) (2015) 8230–8233.
- [37] J.S. Dumini, L.R. Bevilaqua, C.G. Zinn, D.B. Kerr, J.H. Medina, I. Izquierdo, M. Cammarota, Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval, *Horm. Behav.* 50 (2) (2006) 308–313.
- [38] S. Pellou, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Methods* 14 (3) (1985) 149–167.
- [39] B. Tita, H. Abdel-Haq, A. Vitalone, G. Mazaanti, L. Saso, Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test, *Farmacol.* 56 (5–7) (2001) 341–343.
- [40] S. Lispek, Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned over-generalization, *Depress. Anxiety* 29 (4) (2012) 257–263.
- [41] L.R. Squire, J.T. Wixted, R.E. Clark, Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective, *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (11) (2007) 872–883.
- [42] M. Rosenhuber, T. Poggio, Neural mechanisms of object recognition, *Curr. Opin. Neurobiol.* 12 (2) (2002) 162–168.
- [43] R.G. Morris, Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas, *Eur. J. Neurosci.* 23 (11) (2006) 2829–2846.
- [44] M.A. Kheirbek, K.C. Klemm, A. Sahay, R. Hen, Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders, *Nat. Neurosci.* 15 (12) (2012) 1613–1620.
- [45] S.M. McTighe, A.C. Mar, C. Romberg, T.J. Bussey, L.M. Sakaida, A new touchscreen test of pattern separation: effect of hippocampal lesions, *Neuroreport* 20 (9) (2009) 881–885.
- [46] J.C. Talpos, S.M. McTighe, B. Diaz, L.M. Sakaida, T.J. Bussey, Trial-unique, delayed nonmatching-to-location (TUNL): a novel, highly hippocampus-dependent automated touchscreen test of location memory and pattern separation, *Neurobiol. Learn. Mem.* 94 (3) (2010) 341–352.
- [47] E. Levy-Gigi, C. Szabo, G. Richter-Levin, S. Keri, Reduced hippocampal volume is associated with overgeneralization of negative context in individuals with PTSD, *Neuropsychology* 29 (1) (2015) 151–161.

ANEXO V – Manuscrito: Estudo 2

Ventromedial prefrontal cortex activation is necessary to the facilitation of fear extinction promoted by memory reactivation

Liane S Vargas¹, Karine Lima², Ivàn Izquierdo³; Pâmela B Mello-Carpes^{1,2}

Affiliation

¹Graduate Program on Biological Sciences: Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Physiology Research Group, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

³National Institute of Translational Neuroscience, National Research Council of Brazil, and Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Address for Correspondence

P.B. Mello-Carpes

Memory and Behavioral Lab, Federal University of Pampa, BR 472, km 592, PO box 118, Zip code 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

ABSTRACT

Memory extinction has been used in behavioral therapy to treat the post-traumatic stress disorders. Recently it was demonstrated that the memory reactivation before extinction can facilitate this process. However the mechanisms involved are still unclear. Here, we investigated the participation of different regions of ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), the infralimbic (IL) and prelimbic (PL) regions, in the memory reactivation modulatory effect of fear extinction. We used male Wistar rats and the inhibitory avoidance memory task. We confirmed that the reactivation facilitates the fear extinction, but when the muscimol is infused in IL or PL vmPFC after reactivation, the memory extinction do not occur. These findings support the idea that the reactivation can modulate the fear extinction process, facilitating it, and that this effect requires activation of both IL and PL regions of vmPFC.

Key Words: Aversive memory; memory extinction; ventromedial prefrontal cortex; infralimbic prefrontal area; prelimbic prefrontal area.

1. Introduction

Extinction learning is the basis of the exposure therapy widely used in clinic to treat disrupts related to fear memories, as the posttraumatic stress disorder (PTSD) (Davis, 2011; Milad and Quirk, 2012). Although used clinically, the cellular and molecular processes involved in mnemonic extinction are not yet fully understood (Berman, Hazvi, Stehberg, Bahar, and Dudai, 2003). Fear memory extinction protocols used in animal studies are quite similar to the exposure therapy used to treat fear disorders in humans, providing a valid model to study the inhibition of aversive responses (Corcoran

and Maren, 2004; Hermans, Craske, Mineka, and Lovibond, 2006; Menezes, Alves, Borges, Roehrs, de Carvalho Myskiw, Furini, Izquierdo, and Mello-Carpes, 2015).

During exposure therapy the patient is encouraged to challenge fear-related thoughts by being subjected to cues or situations that refer him to the traumatic event, allowing a reassessment of his expectation of danger and actual realization that the catastrophic consequences will not occur (Porto, 2008), in animal models the extinction occurs through a new learning, in which the conditioned stimulus (CS) is presented without the unconditioned stimulus (US), such that the CS no longer signals an aversive event and therefore inhibits the expression of the fear response (Milad and Quirk, 2012). However, it is known that can occur spontaneous recovery of a previously conditioned fear response (Rescorla, 2004), fear renewal (Rodriguez, Craske, Mineka, and Hladek, 1999) and reintegration (Hermans, Dirikx, Vansteenwegen, Baeyens, Van den Bergh, and Eelen, 2005), showing that the reduction of the aversive responses related to the trauma, after the exposure therapy is not permanent, so strategies that modulate and improve this process are important to increase the chances of success of this therapy.

Some behavioral strategies have been studied and seem to be effective in facilitate the memory extinction (de Carvalho Myskiw, Furini, Benetti, and Izquierdo, 2014; Menezes et al., 2015; Schiller, Monfils, Raio, Johnson, Ledoux, and Phelps, 2010). One of them is the reactivation of the aversive/fear memory prior to the extinction sessions (Schiller et al., 2010); other is the exposure to a new environment before the extinction sessions (de Carvalho Myskiw et al., 2014; Menezes et al., 2015). The studies demonstrate that both the reactivation as the exposure to a new environment prior to the extinction are able to modulate the extinction memory process, facilitating it. However, the mechanisms involved in this facilitatory effect are unclear.

It is known that several regions of the brain, such as the hippocampus, the amygdala and the prefrontal cortex, are involved in the memory extinction (Hermans et al., 2006; Sotres-Bayon, Cain, and LeDoux, 2006). The first two structures have been extensively studied (Furini, Myskiw, and Izquierdo, 2014), while less attention has been paid to understanding the role of the prefrontal cortex in memory extinction. Previous studies have shown that the temporary inactivation of vmPFC reduces the expression of conditioned fear in mice (Sierra-Mercado, Corcoran, Lebron-Milad, and Quirk, 2006). More recently, it was demonstrated that the inactivation of the infralimbic (IL) and prelimbic (PL) regions of vmPFC might have opposite effects on the expression and on the extinction of conditioned fear: the inactivation of the IL did not impair the expression of fear memory, but impairs its extinction; the opposite was verified for the inactivation of the PL vmPFC region (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano, and Quirk, 2011).

In this sense, considering the involvement of the vmPFC in aversive and fear memories, especially in the extinction processes, and considering that memory extinction has been widely used in behavioral therapy for the treatment of PTSD but requires improvement, it is important to investigate the involvement of the vmPFC in the modulation of aversive memory extinction. Here we investigated the role of the IL and PL regions of the vmPFC in the modulation of extinction by memory reactivation. Our findings strongly support that both regions of the vmPFC, IL and PL, need to be

activate to observe the facilitation effect promoted by memory reactivation in fear extinction.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Sixty adult male Wistar rats (3 mo old, 300–350 g) were purchased from the Federal University of Santa Maria Central Vivarium. They were housed four per cage and maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a temperature of 23 ± 2 °C and $50 \pm 10\%$ humidity), with food and water ad libitum. All experiments were conducted in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care of the National Institutes of Health and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Pampa (institutional review board 027/2013).

2.2 Experimental design

The experiments were conducted in two stages:

(1) Memory reactivation effects on the extinction of aversive memory: Twenty animals were trained in the Inhibitory Avoidance (IA) task. Twenty-four hours later the animals underwent three extinguishing sessions; part of the animals was submitted to a memory reactivation session 10 minutes before the extinction protocol (experimental group), while the rest of the animals only went through the extinction sessions (control group), without reactivation (figure 1A). In the following day, both animals were placed again in the IA to verify the memory retention.

(2) Participation of different vmPFC regions in the modulatory effect of reactivation on memory extinction: Forty animals were submitted to stereotaxic surgery for implantation of cannulae in the infra-limbic (IL) or pre-limbic (PL) regions of the vmPFC. After a recovery period, the animals were trained in the IA task. Twenty-four hours after the training the animals underwent three extinguishing sessions; all the animals were submitted to a memory reactivation session 10 minutes before the extinction protocol, however, the animals of the experimental groups received an infusion of muscimol ($0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), a GABA agonist, in the IL or PL region, whereas the animals in the control group received the infusion of the same volume of saline (vehicle) (figure 1B). In the following day, all animals underwent to the retention test.

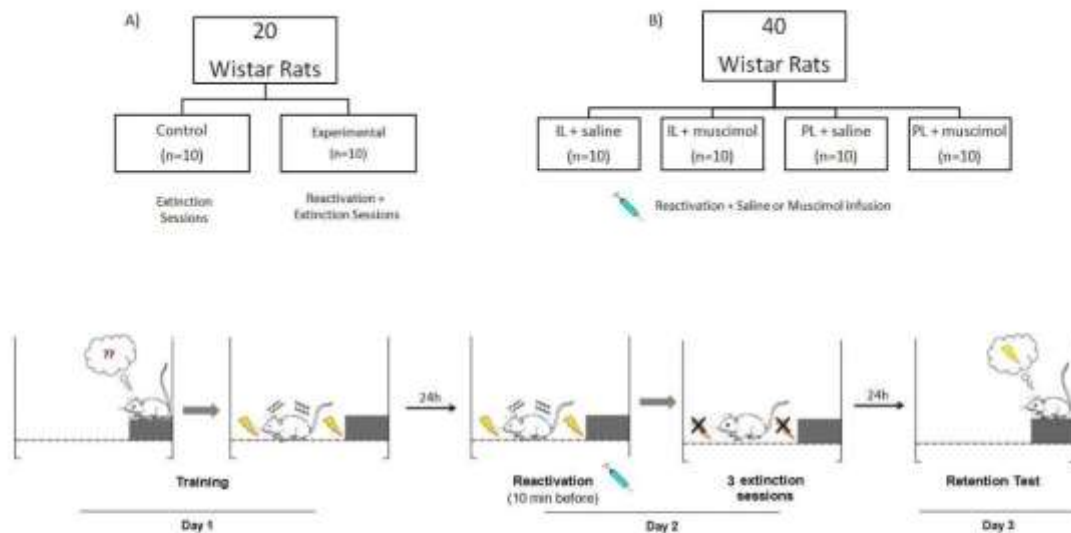


Figure 1. Experimental design. (A) All the animals were trained in IA. Twenty-four hours after the animals of experimental group were submitted to a memory reactivation session 10 minutes before starting the extinction sessions. In the following day all the animals were submitted to a memory retention test. (B) The animals were trained in IA. Twenty-four hours after all the animals were submitted to a memory reactivation session 10 minutes before starting the extinction sessions. Immediately after reactivation, muscimol or saline were infused in the IL or PL region of the vmPFC. In the following day all the animals were submitted to a memory retention test.

2.3 Protocols

2.3.1 Inhibitory Avoidance (IA) Learning

The IA apparatus was a 50 cm x 25 cm x 25 cm Plexiglas box with a 5 cm high, 8 cm wide, and 25 cm long acrylic platform inside on the left end of bronze bars that made up the floor of the box (Rossato, Bevilaqua, Izquierdo, Medina, and Cammarota, 2009). For IA learning (day 1), rats were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed the four paws on the grid a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock was delivered and then they were withdrawn from the apparatus immediately and returned to the cage.

2.3.2 IA Extinction Training

One day after the IA learning session, the rats were placed on the platform of the IA to extinction training. In this stage, when the rats stepped down, they did not receive any footshock and were allowed to explore the device for thirty seconds. After, the animal was gently removed from the apparatus and placed in its housing box. The extinction session was performed 3 times, with a 90 minutes interval between them (Menezes et al., 2015).

2.3.3 IA Retention Test

The retention test was performed 24h after the extinction training (day 3). In the test, the animals were placed on the platform of the IA and the step-down latencies were measured. Short step-down latencies indicated extinction learning; long step-down latencies indicated that the original IA learning is sustained.

2.3.4 Memory reactivation session

Some animals are submitted to a memory reactivation session then minutes before the extinction training. To promote the aversive memory reactivation, rats were gently placed on the inhibitory avoidance and received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock and then they were withdrew from the apparatus immediately and returned to the cage.

2.3.5 Surgery

To implant cannulae in the animals' IL or PL region of the vmPFC the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (i.p., 75 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). The cannulae were 27-gauge stainless steel tubes stereotaxically aimed at the infralimbic region of the prefrontal cortex (A, +3.0; L, \pm 0.7; and V, -2.0 mm) or at the prelimbic region of the prefrontal cortex (A, +3.2; L, \pm 0.7; and V, -2.0 mm) (coordinates according to Paxinos and Watson (Watson, 1986). The cannulae were affixed with dental cement. Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting them to any other procedure.

2.3.6 Drugs and drugs treatments

All drugs used were purchased from Sigma-Aldrich Brazil and dissolved in 2% (vol/vol) DMSO in saline (VEH) to a total infusion volume of 0.25 μ L per side/brain hemisphere. Infusions were performed into the IL or PL region of the vmPFC on both sides, using a 12.4 mm long needle for the IL region and 11 mm for the PL region. At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulas were tightly fitted into the guides. Infusions of drug (muscimol, a GABA agonist, 0.01 μ g/ μ l) or VEH (0.25 μ L per side in the infra or pre-limbic region of the vmPFC) were carried out over 60 s with an infusion pump, and the needles were left in place for additional 60 s to minimize backflow. The dose used was based in previously research (Mello-Carpes and Izquierdo, 2013).

The placement of cannulas was verified postmortem: 2–4 h after the last behavioral test, a 4% methylene-blue solution was infused in the same volume used in each of the mentioned places as described earlier, and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct implants and no significant adjacent structure tissue spread were analyzed.

2.3.7 Control behavioral tasks

To analyze exploratory and locomotor activities and ensure that the drug infusion did not impair such behaviors, which could alter results of the memory tests, rats were placed in the left quadrant of a 50 × 50 × 39 cm of an open field (OF) made with wood painted white with a frontal glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures for locomotor and exploratory activities, respectively, were measured over 5 min (Bonini, Bevilaqua, Zinn, Kerr, Medina, Izquierdo, and Cammarota, 2006).

To evaluate the anxiety state and ensure that the drug or vehicle infusion did not impair such behavior, 24 h after drug or vehicle infusion rats were placed in an elevated plus maze (EPM) as described elsewhere (Pellow, Chopin, File, and Briley, 1985). The number of entries and time spent into the open arms were recorded over a 5-min session.

To evaluate the nociceptive response and sensitivity of the paws of the animals and ensure that the drug or vehicle infusion did not impair these functions that are important for IA learning, the Hot Plate (HP) test was used (Tita, Abdel-Haq, Vitalone, Mazzanti, and Saso, 2001). The rat was placed in an apparatus with a heated metal sheet ($55 \pm 0.5^\circ\text{C}$) and time until the animal reacts to the thermal stimulus by rising or licking the paws was determined. All control behavioral tasks were performed after retention test, i.e., 24h after drug infusion.

2.4 Statistical analysis

A ceiling of 300 s was imposed to step-down latencies during the IA sessions (latencies equal or higher than 300 s were counted as 300 s). This variable did not follow a normal distribution and was analyzed by Mann–Whitney U test (comparisons between two groups, in the first set of experiments) or Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA (comparisons between more than two groups, in the second set of experiments). Wilcoxon test was used to perform intragroup comparisons (training vs. test). IA data were expressed as median \pm interquartile range.

The OF, EPM and HP data were analyzed using parametric ANOVA and were expressed as mean \pm SD. The sample size (n, number of animals in each group) for each experiment is stated in the figure captions. The differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Memory reactivation previously to extinction training facilitates the memory extinction

In this step we evaluated the effect of reactivation in facilitating the extinction of aversive memory. For this, the animals were divided into two groups: (i) control: rats submitted to EI task (day 1) and extinction sessions (day 2); and (ii) Reactivation: Rats submitted to EI task (day 1), reactivation of aversive memory and extinguishing sessions (day 2). Both groups were tested the next day (day 3).

In general, it can be observed in figure 2 that the animals exposed to reactivation before the extinction sessions presented a facilitation of this process (figure 25). There was no difference between the groups on the training day in the EI ($U = 40$, $P = 0.46$, Fig. 25 - Training in EI, Day 1, $n = 10$ / group). On the day of the extinction sessions, both groups presented the latency of high descent in the first extinguishing session, when compared to the training day, demonstrating that all of them learned the task ($W = -53$, $P = 0.003$ for the control group; $W = -55$, $P = 0.002$ for the reactivation group, Figure 25 - first extinction session on EI, Day 2, $n = 10$ / group). On the day of the test (day 3), differences between groups were observed ($U = 9,000$, $P = 0.01$, Fig. 25 - EI test, Day 3, $n = 20$ / group), lower latency than the control group, demonstrating that reactivation facilitated the process of extinction.

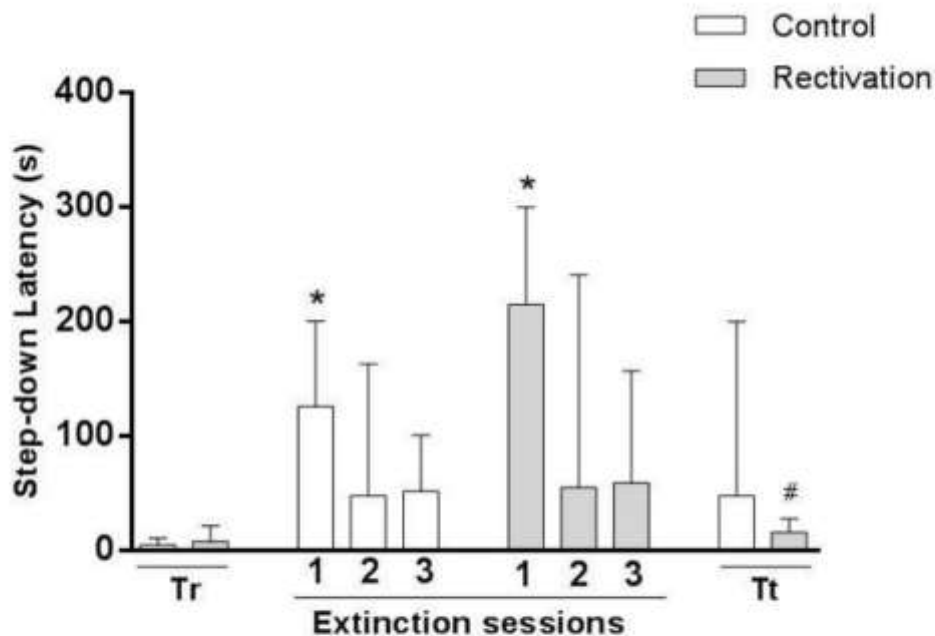


Figure 2. Reactivation facilitates the process of extinguishing aversive memory. On day 1, the rats were trained in the EI task, in which all groups showed a low latency of descent. On day 2 (extinguishing sessions) they were exposed again to the EI apparatus, however the experimental group was reactivated 10 minutes before the first extinction session, when the increase of the platform descent latency in both groups in the first extinguishing session, which decreases during the sessions, which demonstrates a tendency to the extinction of the aversive memory. On day 3 (test) the reactivation group presented lower latency than the control group. The data represent the descent latency in IE, expressed as median \pm interquartile range ($n = 10$ animals per group). * $P \leq 0.05$ in the Wilcoxon test (training vs. test); # $P \leq 0.05$ in the Mann-Whitney U test (group comparisons on the day of the test). Tr = workout; Tt = test.

3.2 The vmPFC IL and PL activation is necessary to the facilitation of fear extinction by reactivation

In this stage we evaluated the participation of the Infralimbic (IL) and Pre-limbic (PL) regions of the ventromedial prefrontal cortex (cPFvm) in the facilitatory effect that the reactivation presented on the extinction of aversive memory. For this, the animals were divided into four groups: (i) PL control: Rats submitted to EI task, reactivation of aversive memory followed by infusion of saline in the PL region ($0.25 \mu\text{L}$ / side) and

extinction sessions; (ii) experimental PL: Rats submitted to EI task, reactivation of aversive memory followed by infusion of Muscimol (a gabaergic agonist: 0.01 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$, 0.25 $\mu\text{L} / \text{side}$) in the PL region and extinguishing sessions; (iii) IL control: Rats submitted to EI task, reactivation of aversive memory followed by infusion of saline in the IL region (0.25 $\mu\text{L} / \text{side}$) and extinguishing sessions; and, (iii) experimental IL: Rats submitted to EI task, reactivation of aversive memory followed by infusion of Muscimol (a gabaergic agonist: 0.01 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$, 0.25 $\mu\text{L} / \text{side}$) in the IL region and extinguishing sessions.

In general, it can be observed in figure 3 that the animals exposed to reactivation before the extinction sessions presented a facilitation of this process, which is blocked when we infuse muscimol in the IL and PL regions of the CPFvm. There was no difference between the groups on the training day in the EI ($P = 0.96$, $H(4.31) = 0.29$). On the day of the extinction sessions, both groups presented the latency of high drop in the first extinction session, when compared to the day of training, demonstrating that all participants learned the task ($W = -26$, $P = 0.03$ for the PL group + $W = -21$, $P = 0.03$ for the PL + muscimol group, $W = -28$, $P = 0.02$ for the IL + saline group, $W = -30$, $P = 0.04$ for the group IL + muscimol, Figure 26 - first extinction session on EI, Day 2, $n = 10 / \text{group}$). On the day of the test (day 3) differences were observed between the groups ($P = 0.006$, $H(4.29) = 12.14$), in the comparison between groups there was difference between the groups PL + saline and PL + muscimol and between the groups IL + saline and IL + muscimol ($P = 0.03$ and $P = 0.01$, respectively), demonstrating that when the groups are submitted to reactivation, but receive infusion of muscimol in the PL and IL regions, the facilitatory effect of reactivation is lost.

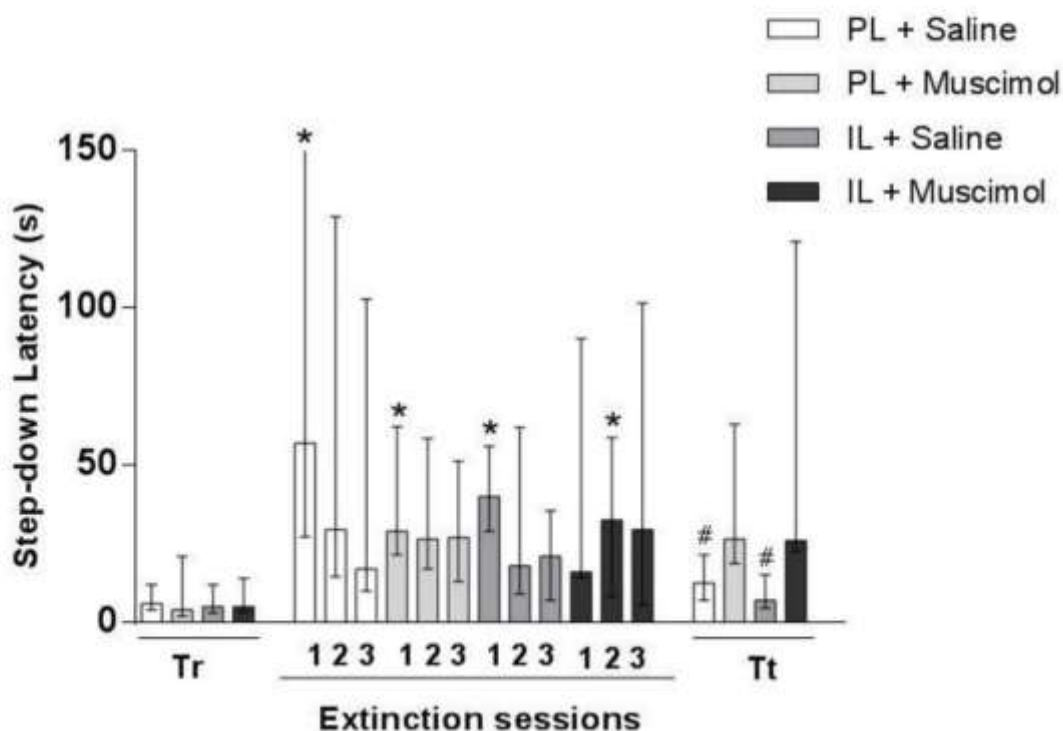


Figure 3. The Infralimbic (IL) and Pre-limbic (PL) regions of the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) are essential for the facilitatory effect of reactivation on extinction of aversive memory. On day 1, the rats were trained in the EI task, in which all groups showed a low latency of descent. On day 2 (extinguishing sessions) all animals were submitted to reactivation of aversive memory 10 minutes before the extinction protocol, however, the animals of the experimental group received the infusion of muscimol (0.01 μ g / μ l), (0.25 μ l / side) (a gabaergic agonist, GABA being an inhibitory neurotransmitter, its injection promotes inactivation of the structure) in the IL or PL regions. On day 3 (test) the groups that received the infusion of muscimol showed higher latencies than those receiving saline, demonstrating that the PL and IL areas participate in the facilitatory effect of extinction through reactivation. . The data represent the descent latency in IE, expressed as median \pm interquartile range (n = 10 animals per group). * $P \leq 0.05$ in the Wilcoxon test (training vs. test); # $P \leq 0.05$ in the Mann-Whitney U test (group comparisons on the day of the test). Tr = workout; Tt = test.

3.3 Hippocampal drug infusions do not impair anxiety and locomotor and exploratory behaviors

Rats were tested in the OF, EPM, and HP after the saline and muscimol infusions and reactivation exposure to verify whether exploratory and locomotor activities, anxiety, and pain thresholds, respectively, were affected by the drug or vehicle infusions. Neither the drugs or vehicle, or the exposure to novelty, affected the evaluated parameters. There was no statistical difference when comparing the groups regarding the number of crosses and elevations in the open field, number of entries and permanence in the open arms of the EPM and paw withdrawal latency in HP ($P = 0.13$, $P = 0.072$, $P = 0.66$, $P = 0.073$ and $P = 0.56$, respectively).

4. Discussion

Here we investigate the participation of different regions of ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), the infralimbic (IL) and prelimbic (PL) regions, in facilitation of fear extinction induced by memory reactivation and demonstrated, according our best knowledge for the first time, that the facilitation of extinction promoted by the reactivation requires IL and PL regions of vmPFC function.

Some researches were developed in order to find strategies that facilitate extinction process, since it is an important strategy to treat fear disorders. Experiments with rodents have demonstrated that the systemic use of some drugs can facilitate extinction without altering the expression of fear, as NMDA agonist d-cycloserine (Walker et al. 2002), cannabinoids (Lafenetre et al. 2007), estradiol (Milad et al. 2009a), corticosterone (Gourley et al. 2009), growth factor FGF-2 (Graham & Richardson 2011), histamine (Bonini et al. 2011), and BDNF receptor agonist (Andero et al. 2011).

Some behavioral strategies have also shown to be effective in facilitating aversive and fear memory extinction. Myskiw et. al. (2012) shown that a brief exposure to a novel environment enhances the extinction of contextual fear in rats, effect that is to the synaptic tagging and capture process (de Carvalho Myskiw, Benetti, and Izquierdo, 2013). Similarly, a brief exposure to a novel environment enhances the extinction of aversive memory when the animals are trained in the inhibitory avoidance (IA) task

(Menezes et al., 2015). The reactivation of fear memory, when performed before the extinction sessions, contributes promoting a strong extinction memory (Monfils et al. 2009, Schiller et al. 2009).

In fact, we observed that the reactivation in IA previously to extinction sessions facilitates this process. The experimental group (with reactivation) showed a longer step-down latency than control group (without reactivation) in the retention test, showing a better effect of the extinction procedures. However, when the rats received an infusion of muscimol (a GABA agonist) in both vmPFC regions studied, IL and PL, after reactivation the facilitation of extinction by reactivation were not observed. These results suggested that both IL and PL vmPFC regions are involved in aversive memory reactivation.

Unlike fear learning, extinction began to be investigated in the 1990s. In this time was shown that GABA transmission and GABA(A) receptors are involved in the inhibition of fear extinction (Harris and Westbrook, 1998), and that N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the basolateral nucleus of the amygdala (Falls, Miserendino, and Davis, 1992) are also required. Only in 1993 Morgan and coworkers (1993) showed the involvement of vmPFC in extinction when made pretraining lesions of the vmPFC (Morgan, Romanski, and LeDoux, 1993), however lesions of vmPFC or visual cortex were unable to replicate extinction deficits (Falls and Davis, 1993), suggesting a possible difference between the specific location of the lesions.

More recently, research has indicated that IL region activation inhibits fear expression and strengthens extinction recall (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez, Santini, and Quirk, 2007; Sierra-Mercado et al., 2011; Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez, Rauch, and Quirk, 2006), while PL region activity increases fear expression (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez, and Quirk, 2009; Burgos-Robles et al., 2007; Vidal-Gonzalez et al., 2006). Our findings show that both regions are needed to facilitate extinction through reactivation, evidencing that there is still a contradiction regarding the role of the PL region in extinction, and so more research are needed.

Aknowledgments

This work was supported by research grants from the Federal University of Rio Grande do Sul, Federal University of Pampa, and Brazilian National Council of Research of (CNPq/Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/RS/Brazil). CAPES (PROCAD). LSV, II and PBMC are supported by CNPq/Brazil. KL is supported by FAPERGS.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

References

- Berman, D. E., Hazvi, S., Stehberg, J., Bahar, A., & Dudai, Y. (2003). Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery. *Learn Mem*, 10, 16-25.

- Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Zinn, C. G., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav*, *50*, 308-313.
- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., & Quirk, G. J. (2009). Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *J Neurosci*, *29*, 8474-8482.
- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., & Quirk, G. J. (2007). Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*, *53*, 871-880.
- Corcoran, K. A., & Maren, S. (2004). Factors regulating the effects of hippocampal inactivation on renewal of conditional fear after extinction. *Learn Mem*, *11*, 598-603.
- Davis, M. (2011). NMDA receptors and fear extinction: implications for cognitive behavioral therapy. *Dialogues Clin Neurosci*, *13*, 463-474.
- de Carvalho Myskiw, J., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*, 1071-1076.
- de Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2014). Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*, 4572-4577.
- Falls, W. A., & Davis, M. (1993). Visual cortex ablations do not prevent extinction of fear-potentiated startle using a visual conditioned stimulus. *Behav Neural Biol*, *60*, 259-270.
- Falls, W. A., Miserendino, M. J., & Davis, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci*, *12*, 854-863.
- Furini, C., Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2014). The learning of fear extinction. *Neurosci Biobehav Rev*, *47*, 670-683.
- Harris, J. A., & Westbrook, R. F. (1998). Evidence that GABA transmission mediates context-specific extinction of learned fear. *Psychopharmacology (Berl)*, *140*, 105-115.
- Hermans, D., Craske, M. G., Mineka, S., & Lovibond, P. F. (2006). Extinction in human fear conditioning. *Biol Psychiatry*, *60*, 361-368.
- Hermans, D., Dirikx, T., Vansteenwegen, D., Baeyens, F., Van den Bergh, O., & Eelen, P. (2005). Reinstatement of fear responses in human aversive conditioning. *Behav Res Ther*, *43*, 533-551.
- Mello-Carpes, P. B., & Izquierdo, I. (2013). The Nucleus of the Solitary Tract --> Nucleus Paragigantocellularis --> Locus Coeruleus --> CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, *100*, 56-63.
- Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., de Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2015). Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*, E1652-1658.
- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol*, *63*, 129-151.
- Morgan, M. A., Romanski, L. M., & LeDoux, J. E. (1993). Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, *163*, 109-113.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, *14*, 149-167.
- Porto, P., Oliveira, L., Volchan, E., Mari, J., Figueira, I. and Ventura, P. (2008). Scientific evidences from neurosciences to cognitive behavioral therapy. *Paidéia*, *18*, 9.
- Rescorla, R. A. (2004). Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. *Learn Behav*, *32*, 401-408.
- Rodriguez, B. I., Craske, M. G., Mineka, S., & Hladek, D. (1999). Context-specificity of relapse: effects of therapist and environmental context on return of fear. *Behav Res Ther*, *37*, 845-862.

- Rossato, J. I., Bevilacqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, *325*, 1017-1020.
- Schiller, D., Monfils, M. H., Raio, C. M., Johnson, D. C., Ledoux, J. E., & Phelps, E. A. (2010). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature*, *463*, 49-53.
- Sierra-Mercado, D., Jr., Corcoran, K. A., Lebron-Milad, K., & Quirk, G. J. (2006). Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *Eur J Neurosci*, *24*, 1751-1758.
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. J. (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, *36*, 529-538.
- Sotres-Bayon, F., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2006). Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*, *60*, 329-336.
- Tita, B., Abdel-Haq, H., Vitalone, A., Mazzanti, G., & Saso, L. (2001). Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Farmaco*, *56*, 341-343.
- Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S. L., & Quirk, G. J. (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem*, *13*, 728-733.
- Watson, G. P. C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.

ANEXO VI – Manuscrito: Estudo 3

DOPAMINERGIC HIPPOCAMPAL ACTIVATION IS NECESSARY FOR OBJECT RECOGNITION MEMORY PERSISTENCE INDUCED BY ONE-SINGLE PHYSICAL EXERCISE SESSION

Liane S Vargas^a, Karine Ramires Lima^b, Bruna Piaia Ramborger^c, Rafael Roehrs^c, Iván Izquierdo^{d,e}, Pâmela B. Mello-Carpes^{a,b*}

^aPhysiology Research Group, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Physiology Research Group, Federal University of Pampa, Urugaiana, RS, Brazil

^cInterdisciplinary Group of Research in Teaching Practice, Federal University of Pampa, Urugaiana, RS, Brazil

^dMemory Center, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^eNational Institute of Translational Neuroscience/CNPq, Brazil

*Corresponding author at: Physiology Research Group, Federal University of Pampa, Urugaiana, RS, Brazil. E-mail address: pamelacarpes@unipampa.edu.br (P. Mello-Carpes)

Abstract: Previously we demonstrated that a single physical exercise session promotes the persistence of object recognition (OR) memory and this effect involves the activation of the noradrenergic system. Here, using adult male Wistar rats (3 months old) we confirm that an aerobic single physical exercise session (30 min of treadmill running at an intensity of 60–70% of indirect VO₂ max.) after OR learning promotes memory persistence. We also demonstrate that this effect involves the dopaminergic system, since it is blocked when a D1-family receptor antagonist (SCH-23390, 1 µg/µl) is infused into the hippocampus after the physical exercise session. Additionally, through HPLC experiments we demonstrate that a physical exercise session increases the hippocampal dopamine levels. Taken together, our results demonstrate that acute post-learning physical exercise is able to promote the persistence of OR memory, inducing the release of dopamine in hippocampus, which is necessary for the modulation of memory persistence. This work brings new evidences on the benefit of a single physical exercise session to memory, as well as suggests that dopaminergic mechanisms are behind this effect.

Key-words: Acute physical exercise; Running; Memory persistence; Dopamine; Hippocampus.

1 Introduction

The recognition memory provides adaptive advantages related to survival, since this memory enables the identification and discrimination of specific characteristics of an event, as well as the comparison with characteristics of previously acquired memories [1]. So, the persistence of this type of memory is important.

Persistence is the main feature attribute to long-term memory (LTM) [2, 3]. After consolidated, the LTM can persist for hours, days or years [2]; its persistence under physiological conditions will depend on different factors, such as age, the level of emotional stimulation at the moment of consolidation, alertness, and others [4, 5].

Previous researches defined some processes that determine the persistence of a memory [5, 6]. One of them involves the activation of dopaminergic neurons of ventral tegmental area (VTA), whose axons innervate the CA1 region of the hippocampus, stimulating dopamine D1 receptors and leading to rapid synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus. The activation of this system results in the strengthening of hippocampal synapses, which participate in the consolidation and persistence of memory for at least two or three more weeks [5, 6].

In parallel, positive effects of long-term aerobic exercise on memory and central nervous system (CNS) have been extensively described [7-10]. However, studies on the effects of acute exercise on memory are still few. Considering that physical exercise is a non-invasive behavioral practice that favors the immediate release of norepinephrine and dopamine [11], important neurotransmitters involved in the process of memory consolidation and persistence [6, 12], our group has dedicated efforts to investigate the effects of one-single physical exercise session on memory.

Recently, we show that a physical exercise session performed immediately after object recognition (OR) learning promotes memory persistence and increases norepinephrine levels in the hippocampus [13]. Additionally, effects of exercise on memory are avoided by an intra-hippocampal beta-adrenergic antagonist infusion, demonstrating that acute exercise promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms [13].

The aim of this study was to confirm the effects of a single session of physical exercise on the modulation of memory persistence, and investigate the possible role of dopaminergic system. We confirmed that a single session of treadmill running after OR training promotes memory persistence; additionally, we demonstrated that it increases dopamine levels in hippocampus. So, apart of the noradrenergic system, the effects of a single physical exercise session on memory depend on the dopaminergic system activation. These data are important, since they suggest that the physical exercise could be used after a specific learning to modulate memory persistence.

2 Methods

2.1 Rats and groups

Adult male Wistar rats (3 months old) purchased from the vivarium of the Federal University of Santa Maria (RS/Brazil) were used. They were housed four per cage and maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a temperature of 23 ± 2 °C and humidity of $50 \pm 10\%$) with free access to food and water. All experiments were conducted in accordance with the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication n. 80-23, revised 1996) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee from the Federal University of Pampa/RS/Brazil (Institutional Review Board 020/2017).

This work involves two main experiments, which groups are described below. Figure 1 summarizes the groups and the experiments conducted.

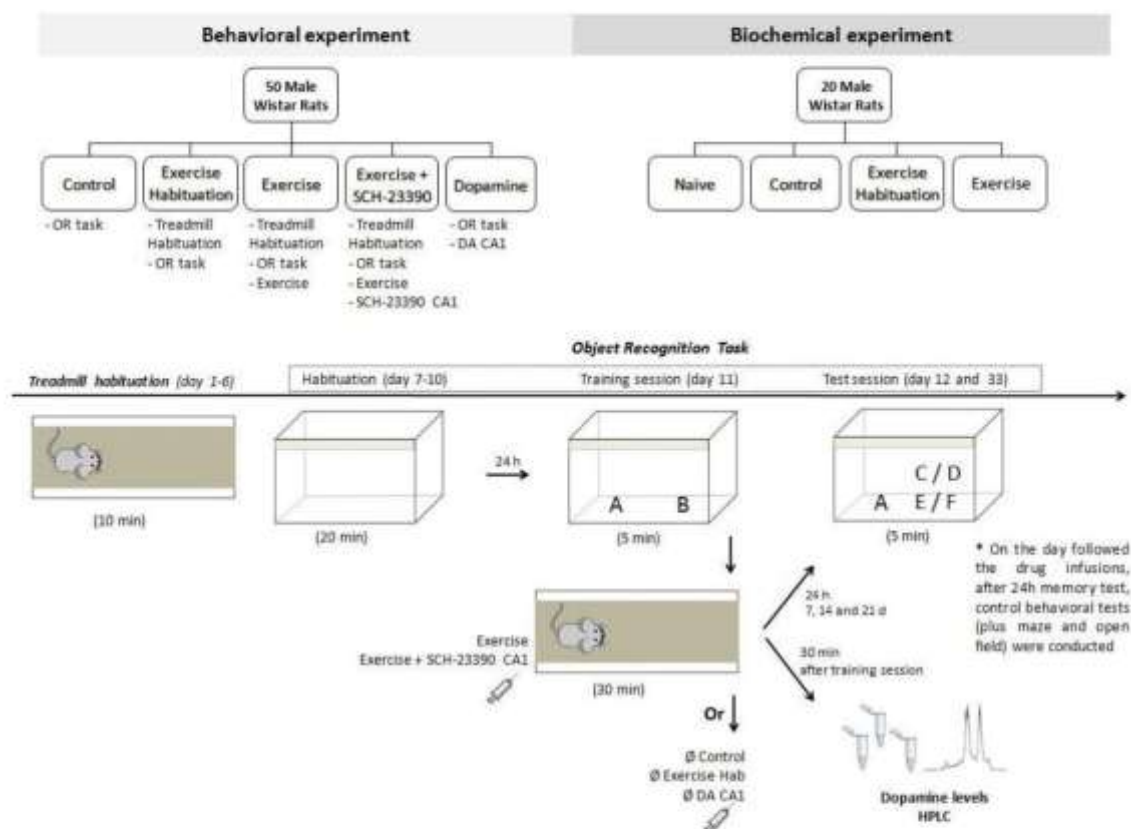


Fig. 1. Experimental design. Behavioral and biochemical experiments were conducted. **For behavioral experiment** rats were divided in five groups: control, treadmill habituation, physical exercise, physical exercise + SCH-23390 and dopamine. All animals were habituated and trained in OR task, and, according groups, they were submitted or not to: treadmill habituation; one-single physical exercise session, followed or not by intra-hippocampal SCH-23390 infusion; intra-hippocampal dopamine infusion, or nothing. OR test sessions were made 24h, 7, 14 and 21 days after training. In the day after drug infusions, control behavioral tests were done (Plus

Maze and Open Field) after OR memory test. **For biochemical experiment** rats were divided in four groups: naïve, control, treadmill habituation and physical exercise. These groups were submitted or not to: treadmill habituation; OR habituation and training; one-single physical exercise session after OR habituation and training. Thirty minutes after OR training the rats were euthanized and their hippocampus were dissected and quickly prepared to dopamine levels measurement by HPLC. Ø: without exercise; DA: dopamine; OR: object recognition. (n = 8-10/group for behavioral experiment, and n=5/group for biochemical experiment).

2.1.1. Experiment 1 (behavioral): Effects of a single physical activity on OR in the present or absence of the D1 receptor antagonist memory. For this experiment the rats were divided in five groups:

- (i) control, which rats were only trained in the OR task;
- (ii) treadmill habituation, which rats were habituated to treadmill and trained in the OR task;
- (iii) physical exercise, in which rats were habituated to treadmill, trained in OR task and submitted to one-single physical exercise session in the treadmill for 30 minutes immediately after OR training;
- (iv) physical exercise + SCH-23390 (D1-family receptor antagonist), which rats were habituated to treadmill, trained in OR task, submitted to one-single physical exercise session on treadmill and received a SCH-23390 intra-hippocampal infusion immediately after the physical exercise session; and,
- (v) Dopamine (DA), in which rats were trained in the OR task and received DA intra-hippocampal infusion immediately after.

Animals from all groups were habituated and trained in OR task, and, according groups, they were submitted or not to: treadmill habituation; one-single physical exercise session, followed or not by intra-hippocampal SCH-23390 infusion; intra-hippocampal dopamine infusion, or nothing, according protocols described bellow. OR test sessions were made 24h, 7, 14 and 21 days after training. In the day after drug infusions, control behavioral tests were done (Plus Maze and Open Field).

2.1.2 Experiment 2 (biochemical): Dopamine levels following an exercise session. For this experiment, the rats were divided in four groups:

- (i) naïve;
- (ii) control, in which rats were only trained in the OR task;
- (iii) treadmill habituation, which rats were habituated to treadmill and trained in the OR task;

(iv) physical exercise, in which rats were habituated to treadmill, trained in OR task and submitted to one-single physical exercise session in the treadmill for 30 minutes immediately after OR training.

The animals from these groups were submitted or not to: treadmill habituation; OR habituation and training; one-single physical exercise session after OR habituation and training, according protocols described bellow. Thirty minutes after OR training the rats were euthanized and their hippocampus were dissected and quickly prepared to dopamine levels measurement by HPLC.

2.2 Surgery and drug infusion procedures

In order to implant brain cannulas, the rats that were subsequently submitted to behavioral experiments were deeply anesthetized with ketamine and xylazine (i.p., 75 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) and 27-gauge cannulas were placed stereotaxically aimed at CA1 region of the dorsal hippocampus (A – 4.2, L 3.0, V – 2.0 mm) (coordinates according to[14]). The cannulas were affixed with dental cement. Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting them to any other procedure.

At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulas were tightly fitted into the guides. Infusions (1 μ l/side in CA1 region of hippocampus; 1 μ g/ μ l of SCH-23390 or DA dissolved in saline for groups (v) and (vi), respectively; groups (ii), (iii) and (iv) received only saline infusion) were carried out over 60 s with an infusion pump, and the cannulas were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. Cannula placements were verified postmortem: 2–4 h after the last behavioral test a 4% methylene-blue solution was infused at the same volume used in the experiments as described earlier, and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal (Mello-Carpes and Izquierdo, 2013).

2.3 Reagents and drugs

Drugs were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO): SCH-23390 (R(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-H3benzazepine hydrochloride), DA (dopamine). The drugs were dissolved in saline and stored at - 20°C, protected from light until use, at which time an aliquot was thawed and diluted to working concentration in saline 0.9% (pH 7.2). These are the doses found to be effective previously [3, 15]. Other reagents used in the experiments were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.4 Physical exercise protocol

One-single physical exercise session was performed immediately after OR training in a motorized treadmill built for rodents (Insight Ltda., Sao Paulo, Brazil) as previously described by others [13]. The protocol used was an adaptation made from the protocol previously proposed [16], in which the running exercise was performed at an intensity of 60–70% maximal oxygen uptake (VO_2) (treadmill belt velocity between 9 m/min and 13 m/min) in an one-single physical exercise session with 30 min of duration, realized immediately after OR learning.

Previously to initiate memory tasks, the rats were adapted to the treadmill in order to avoid novelty and/or stress effects. The habituation to the treadmill was made one week before the memory tasks and exercise session. Initially, the rats were habituated to treadmill for two days (treadmill velocity 2 a 5 m/min for 10 minutes). After, they were subjected to the "good runner protocol", which consists in placing the animals on the treadmill for three consecutive days (velocity 8 m/min for 10 min), without tilting, and then evaluate the level of trainability in a range from 1 to 5 points (1: refuses to run; 2: below the average of the runners - runs and stops or runs in the wrong direction; 3: average runner; 4: above the average – runs well, with sporadic stops; 5: good runner – always stays in front part of treadmill); at the end the animals that maintained an average of three or more points were included in the exercise group [17]. According the protocol, the rats that did not maintain an average of 3 or more points were excluded and used in other projects of our group. In fact, was needed to exclude only two rats.

In the next and last day, an indirect VO_2 running test was performed to determine the individual intensity of exercise (starting with low velocity and increasing it in 5 m/min every 3 min until the rat was unable to keep running). Time to fatigue (min) and the work volume (m/min) were considered as an indirect measure of VO_2 maximum [18, 19]. Here, we denominated the two days of habituation in the treadmill plus the three days of the good runner protocol and the VO_2 test day as "treadmill habituation". Additionally to exercise groups (iv and v), one group (iii) was submitted only to this habituation period without the physical exercise session to isolate possible effects of the habituation *per se* (see fig. 1).

2.5 Behavioral experiments

2.5.1 Object Recognition task

Training and testing in the object recognition (OR) task were carried out in an arena (50 x 50 x 50 cm) built of polyvinyl chloride plastic, plywood and

transparent acrylic as previously described [20]. First, the animals were habituated to the OR apparatus by placing them in it for 20 min per day to freely explore it during 4 consecutive days before the training. On training day two different objects (A and B) were placed in the apparatus and the animals were allowed to explore them freely for 5 min. The objects were made of metal, glass, or glazed ceramic. Exploration was defined as sniffing or touching the objects with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. Twenty-four hours, 7, 14 and 21 days later, on test phase, one of the objects was randomly exchanged for a novel object and rats were reintroduced into the apparatus for an additional 5 min period of free exploration (see figure 1 – behavioral experiments) [13, 21]. Here, we named the familiar object always as A and each novel object with a different letter (C, D, E and F) to facilitate the understanding. However, in experimental conditions, to avoid memory reconsolidation in each testing session, each test was made using a novel combination of a familiar and a new object, respecting the time of the first familiar object presentation (i.e., 7, 14 or 21 days before the test). To avoid confounds by lingering olfactory stimuli and preferences, the object and the arena were cleaned after testing each animal with 70% ethanol.

The effect of the intra-hippocampal infusions and/or of the exercise were studied by post training administration, following the classic studies [see 2] showing that treatment given at that time are more likely to affect consolidation and, possibly, persistence (see additional references in [22]).

2.5.2 Control behavioral tests

To analyze exploratory and locomotor activities and to ensure that the drugs infusion or others procedures proposed in the study design did not impair such behaviors, altering the results of the memory tests, in the day after saline, SCH-23390 or DA infusion, after OR 24h memory test, rats were placed on the left quadrant of a 50 x 50 x 39 cm open field (OF) made with wood painted white, with a frontal glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures for locomotor and exploratory activities respectively, were measured over 5 min [23]. To evaluate the animals' anxiety state, 24 h after infusions rats were exposed to an elevated plus maze (PM) [24]. The total number of entries into the four arms, the number of entries and the time spent into the open arms were recorded over a 5 min session.

2.6. Dopamine levels measurement/HPLC

The determination of hippocampal dopamine (DA) levels by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) was measured in homogenates prepared from the hippocampi using a reverse-phase HPLC system (YL9100, Young Lin). Rats' brains were removed and bilateral hippocampus were quickly dissected out in an iced surface and homogenized in 50 mMTrisHCl, pH 7.4 (1/10, w/v). Afterwards, samples were centrifuged at 2400g for 20 min, and supernatants were filtered and then stored at -80°C until use [25, 26]. The HPLC system consisted of a Vacuum Degasser (YL9101) and quaternary pump (YL9110) connected to a reversed phase column (SYNERGI 4I FUSION-RP 80 Å 250 x 4.60 mm; Phenomenex) on a Column Compartment (YL9131) coupled to a Diode Array Detector (YL9160). The mobile phase consisted of methanol and water (12/88, v/v) adjusted to pH 3 with phosphoric acid. To separate DA, we used the programming isocratic with a flow rate of 0.8 mL/min. The sample was filtered through 0.22 µm syringe filters. We injected 20 µL samples into the HPLC system by an auto sampler device (YL9150). The detection was at 198 nm by DAD. Chromatograms were recorded and integrated by PC integration software (YLClarity). All analyses were run in triplicate. The analytical parameters were as follows: linear range, 0.1–10.0 µg/ml; determination coefficient, 0.999; and calibration equation, $y = 628.12x - 34.342$. Dopamine for HPLC was supplied by Sigma-Aldrich Brazil. Other reagents used in this experiment were of analytical grades and obtained from standard commercial suppliers.

2.7. Statistical Analyze

Object exploration time in the OR task was converted to percent of total exploration time and so a one-sample t-test was used to compare the percent of total time exploration spent in each object with a theoretical mean (50%). Additionally, the discrimination index (DI) for each test day was calculated taking into account the difference of time spent exploring the new (T novel) and the familiar (T familiar) objects: $DI = ((T \text{ novel} - T \text{ familiar}) / (T \text{ novel} + T \text{ familiar})) \times 100 (\%)$, and was used as a memory parameter [27]. The DI data were analyzed using non-parametric tests, considering the data distribution verified by Shapiro-Wilk test. The 24h and the 21 days DI were compared between groups using a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc. A Friedman repeated measures test was used to analyze the DI in each group along the test days. OF and PM results were analyzed using one-way ANOVA. The HPLC results were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. All data were expressed as mean ± SD. The sample size (n, number of animals in each group) for each experiment is stated in the

figure legends. The differences were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

3 Results

3.1 Object Recognition Task

The consolidation of OR memory was tested on rats from different groups 24h after training, and the OR memory persistence 7, 14 and 21 days after training (fig. 2A). In training day, all the rats from different groups explored the two new objects for a similar percent of total exploration time (~50% for A and B; Fig. 2B-F, training, $P > 0.05$).

The animals from the control group, which were not exposed to any additional procedure besides the OR task, explored significantly more than 50% of total exploration time the new object (C) in the 24h test (Fig. 2B; $t_{(11)} = 7.66$; $P < 0.0001$), but not in 7, 14 and 21 days testing (Fig. 2B; $t_{(11)} = 1.59$; $P = 0.1385$ in 7d test; $t_{(11)} = 0.38$; $P = 0.74$ in 14d test; $t_{(11)} = 0.06$; $P = 0.95$ in 21d test). The same results can be observed in the rats that were habituated to the treadmill; the rats remember the familiar object in the 24h test (Fig. 2C; $t_{(9)} = 5.73$; $P = 0.0003$), but were unable to recognize the new object on the 7, 14 and 21 days tests (Fig. 2C; $t_{(9)} = 0.45$; $P = 0.66$ in 7d test; $t_{(9)} = 2.04$; $P = 0.07$ in 14d test; $t_{(9)} = 1.17$; $P = 0.27$ in 21d test), demonstrating that there was good consolidation but no persistence of memory.

In contrast, when exposed to one-single physical exercise session immediately after OR training, the rats were able to remember the familiar object up to 21 days after training, spent significantly more than 50% of total exploration time exploring the novel object in the different days of tests (Fig. 2D; $t_{(9)} = 4.95$; $P = 0.0008$ in 24h test; $t_{(9)} = 2.23$; $P = 0.05$ in 7d test; $t_{(9)} = 3.28$; $P = 0.009$ in 14d test; $t_{(9)} = 6.19$; $P = 0.0002$ in 21d test), showing both good consolidation and good persistence of OR memory. In the other hand, the animals that received intra-hippocampal SCH-23390 infusion after physical exercise were able to consolidate memory (Fig. 2E; $t_{(7)} = 7.36$; $P = 0.0002$ in 24h test), but they were not able to remember the familiar object, and spent about the same time exploring each object in all memory persistence tests (Fig. 2E; $t_{(7)} = 0.55$; $P = 0.60$ in 7d test; $t_{(7)} = 0.69$; $P = 0.51$ in 14d test; $t_{(7)} = 2.30$; $P = 0.05$ in 21d test). The dopamine (DA) infusion, in turn, promoted an effect similar to that of one-single physical exercise session, i.e., it increased memory persistence (Fig. 2F; $t_{(9)} = 4.63$; $P = 0.001$ in 24h test; $t_{(9)} = 1.97$; $P = 0.05$ in 7d test; $t_{(9)} = 3.47$; $P = 0.007$ in 14d test; $t_{(9)} = 8.24$; $P < 0.0001$ in 21d test).

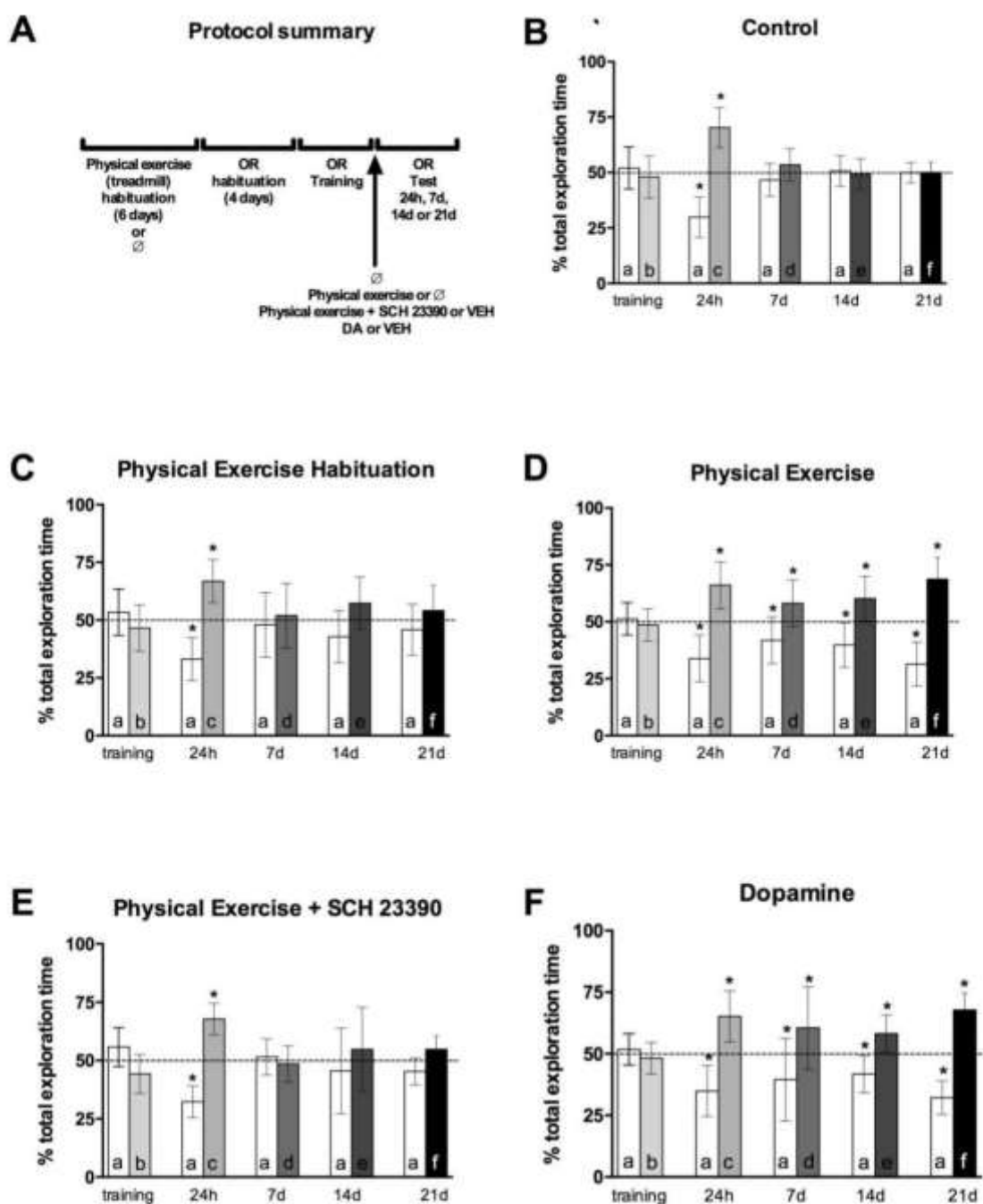


Fig. 2. One-single physical exercise session after learning promotes OR memory persistence; this effect do not occur with SCH-23390 infusion; DA infusion has an effect similar to that of exercise. A. Summary of the experiments conducted. Some rats were habituated to treadmill before the OR task. On OR training session all rats were exposed to two different objects (named a and b) for 5 min. According the group, immediately after training the rats were submitted to one-single physical exercise session on treadmill for 30 minutes (D) or were submitted to one-single physical exercise session on treadmill for 30 minutes followed by bilateral intra-hippocampal infusions (1 μ l/side in CA1) of SCH-23390 (1 μ g/ μ l) (E) or immediately after training received just an intra-hippocampal infusion (1 μ l/side in CA1) of dopamine (DA; 1 μ g/ μ l). Twenty-four hours and 21 days later, on test phase, one of the objects was randomly exchanged for a novel object (named c, d, e and f, respectively) and rats were reintroduced into the apparatus for an additional 5 min period of free exploration. Control animals were able to

recognize the objects in the 24h test, but not in the 21d test (B). Animals habituated to treadmill presented the same results of control group (C). The physical exercise realized immediately after training promoted persistence of OR memory tested 21 days after training (D). The infusion of SCH-23390 in CA1 region of dorsal hippocampus immediately after physical exercise avoided the effects of exercise on memory persistence (E). The infusion of DA in CA1 region of dorsal hippocampus immediately after training promoted persistence of OR memory until 21 days (F). Data (mean \pm SD) are presented as percentage of total exploration time; * $P \leq 0.05$ in one-sample Student's t-test with theoretical mean = 50%; $n = 8-10$ per group/test.

According to the 24h OR discrimination index (DI), we can observe that all groups were able to consolidate the OR memory, since no differences were verified between groups (Fig 3A; $H_{(5)} = 2.21$; $P = 0.69$). On day 21, differences between groups were observed (Fig 3B; $H_{(5)} = 30.44$; $P < 0.0001$). Exercise group present higher discrimination index than control group ($P < 0.001$), habituated group ($P < 0.05$) and Exercise + SCH 23390 group ($P < 0.05$). Dopamine group present higher discrimination index than control group ($P < 0.001$), habituated group ($P < 0.05$) and Exercise + SCH 23390 group ($P < 0.05$). No differences were observed between exercise and dopamine group ($P > 0.05$).

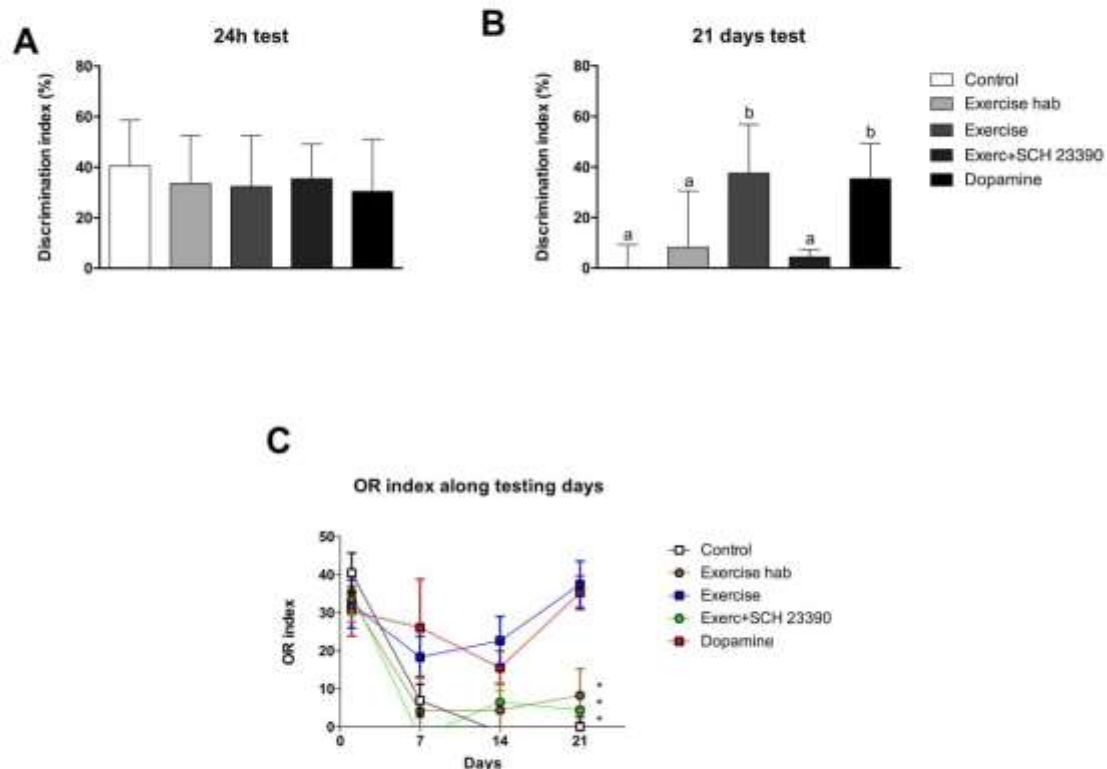


Fig. 3. One-single physical exercise session and intra-hippocampal dopamine (DA) infusion after OR learning promote memory persistence. Discrimination index for novel object in the 24h (A), 21 days (B) tests, and along all test days (C). In graphs A and B groups (bars) with different letters were significantly different ($P < 0.05$ on Kruskal-Wallis followed by

Dunn's post-hoc). In graph C each line represent a group, * $P < 0.05$ in Friedman repeated measure test. Data is presented as mean \pm SD; $n = 8-10$ per group/test.

Along the testing days, differences were identified in the control group (Fig. 3C/control; $F_{(4,12)} = 17.90$; $P = 0.0005$); differences were found between 24h and 7d ($P < 0.05$), 24h and 14d ($P < 0.01$), and 24h and 21d test ($P < 0.01$). No differences in OR discrimination index (DI) were detected on exercise (Fig. 3C/exercise; $F_{(4,9)} = 7.53$; $P = 0.06$) and dopamine groups (Fig. 3C/dopamine; $F_{(4,10)} = 9.30$; $P = 0.06$). Differences were identified in the exercise habituated group (Fig. 3C/exercise hab; $F_{(4,10)} = 8.76$; $P = 0.03$) and in the exercise + SCH 23390 group (Fig. 3C/exerc+SCH 23390; $F_{(4,8)} = 11.40$; $P = 0.009$).

3.2 Control experiments

24h after the drug infusions, to verify exploratory and locomotor activity and anxiety, the rats were exposed to OF and PM, respectively. The intra-hippocampal infusion of DA or SCH-23390 ($1.0 \mu\text{l}/\text{side}$; $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) did not affect the number of crossings and rearing during the 5 min long free exploration session at the open field (Table 1 – Open Field). Similarly, no effects in the total number of entries or in time spent at open arms during the plus maze session were found (Table 1 – Plus maze).

	Control	Treadmill habituation	Physical exercise	Physical exercise + SCH-23390	Dopamine	P, F (df)
<i>OR total exploration time (s)</i>						
Training	45.2 \pm 21.2	38.7 \pm 18.6	45.9 \pm 14.2	48.25 \pm 17.4	48.3 \pm 17.7	0.97; 0.11 (4, 45)
Test (24h)	32.6 \pm 10.8	32 \pm 17.4	41.3 \pm 10.8	30.5 \pm 10.5	47.7 \pm 18.5	0.13; 1.83 (4, 45)
Test (7d)	35.4 \pm 14.9	25 \pm 12.4	31.9 \pm 19.9	36.8 \pm 17.9	27 \pm 10.6	0.45; 0.89 (4, 45)
Test (14d)	28.9 \pm 13.8	18.4 \pm 5.7	25.3 \pm 13.8	20.6 \pm 8.4	26.6 \pm 9.9	0.6; 0.69 (4, 45)
Test (21d)	44.2 \pm 18	35.3 \pm 12	41.3 \pm 17.8	25.74 \pm 4	37.7 \pm 12	0.08; 2.18 (4, 45)
<i>Plus maze</i>						
Time in open arms (s)	132 \pm 41.2	135.6 \pm 53	148.9 \pm 40.2	149.8 \pm 39.06	146.8 \pm 39.06	0.85; 0.33 (4, 45)
<i>Open field</i>						
Crossings	36 \pm 14.98	43 \pm 26.03	30.40 \pm 13.7	48.1 \pm 26.22	43.5 \pm 21.84	0.66; 0.59 (4, 45)
Rearings	19.7 \pm 7.55	18.1 \pm 8.9	16.2 \pm 5.7	23.1 \pm 8.9	19.7 \pm 7.45	0.64; 0.62 (4, 45)

Table 1. Infusion of dopamine, SCH-23390 or saline and the others procedures proposed in the study design have no effect on total exploration time in training and tests on OR task, on anxiety in a plus maze, and on locomotor and exploratory activities in an open field and ($P > 0.05$; one-way ANOVA). Data are expressed as mean \pm SD of the total exploration time, in seconds, on OR training and tests (OR; $n = 8-10$ per group/day), the total time spent in the open arms (plus maze; $n = 8-10$ per group), and the number of crossings and rearings (open field; $n = 8-10$ per group).

3.3 Dopamine levels

To testing our hypothesis that a single physical exercise session could promote the persistence of memory through the increase in the hippocampal DA release, twenty animals were divided in four groups, according described for experiment 2. Rats from group (ii), (iii) and (iv) were euthanized for hippocampus dissection 30 min after OR training. The CA1 regions of both dorsal hippocampi were homogenized and processed for HPLC determination of DA levels. Differences between groups were detected (Fig. 4; $F_{(3,30)} = 21.63$; $P < 0.0001$). The rats of exercise habituation and exercise group presented a higher hippocampal level of DA than naïve and control group (Fig. 4, $P < 0.01$).

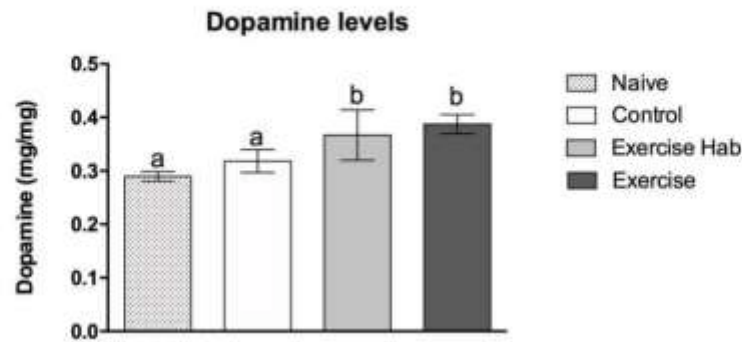


Fig. 4. Previously habituation to exercise apparatus and a physical exercise session after OR learning promote an increase of DA levels. Groups (bars) with different letters were significantly different in their tissue content of DA ($P < 0.05$) in the hippocampus homogenate ($\mu\text{g/L}$) (ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). Data presented as mean \pm SD; $n = 5$ per group/test.

Discussion

Our study is one of only a few to investigate the effects of one-single aerobic physical exercise session on memory persistence. We observed that when performed in a time near to the memory consolidation, exercise promotes the persistence of object recognition (OR) memory at least for 21 days, confirming our previously observation [13].

Physical exercise is a non-invasive behavioral practice that favors the release of norepinephrine (NE) and dopamine (DA) [11], both important neurotransmitters involved in the process of memory consolidation and persistence [6, 12, 28, 29]. We previously demonstrated that the effects of a session of physical exercise on memory persistence are dependent of NE increased release in hippocampus [13]. It is likely to assume that acute exercise effects on memory could also be mediated by the dopaminergic system activation. In fact, in our experiments an intra-hippocampal infusion of dopamine

immediately after OR learning had the same effects of the exercise session. Yet, confirming our hypothesis about the necessity of dopaminergic activation to acute exercise effects, the memory persistence induced by exercise is blocked when the animals submitted to exercise received an intra-hippocampal infusion of D1-family receptor antagonist (SCH 23390).

Rossato et al. (2009) demonstrated the important role of dopamine in memory persistence; the authors blocked dopaminergic (D1) receptors in the hippocampal region of rats after learning and observed that long-term memory disappears quickly; in contrast, the intra-hippocampal infusion of the D1 agonist after training made the memory persists [6]. Here, dopamine, by hippocampal injection or endogenously release through a behavioral practice (the acute exercise) promoted memory persistence. In order to make clear the relationship between physical exercise and dopaminergic system, direct measurements demonstrated that hippocampal DA levels increases after a physical exercise session.

In fact, the habituation to physical exercise apparatus (treadmill) realized for 6-days, before to the OR task, was able o improve DA levels *per see*. This hippocampal increase of dopamine in habituated rats did not resulted in memory persistence. We have some hypotheses to explain this result: (i) physical activity performed during exercise habituation period was sufficient to promote neurotransmitters changes, mobilizing dopaminergic system, but this mobilization was not sufficient to guarantee memory improvement in a task learned some days after; (ii) dopamine levels in habituated and physical exercise groups were measured as no different considering that dopamine was higher in exercised animals, but was metabolized in the brain, originating norepinephrine by dopamine beta-hydroxylase enzyme action (in our previously work [13] we observed increase in norepinephrine levels of exercised rats, but not in habituated ones, and NE is also important to memory persistence); maybe performing additional experiments using microanalysis could help in the test of this hypothesis.

Memory has an important role in the daily life of each individual and studies addressing the cognitive effects of physical exercise have shown positive effects of this practice on memory [7, 12, 27]. However, most of the results refer to the effects of regular and habitual physical exercise practice. For example, chronic aerobic physical exercise has a positive effect in factors that contribute to the improvement of cognitive function [30], as neural plasticity, cellular survival, neurogenesis and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) synthesis [31, 32]. There are few studies investigate the effects of acute exercise on memory. Findings suggest that BDNF plays an important role in the cognitive benefits of acute exercise [33]. It has recently been demonstrated that exercise in different intensities is able to promote the increase of BDNF, but that this increase has no direct relation with the memory improvement; on the other

hand, the improvement of long-term memory is associated with the exercise intensity [34]. Probably these findings are justified by the other effects elicited by exercise, as the modulation of neurotransmitters systems [11].

In addition, studies suggest that factors such as the duration of exercise, and the type of exercise performed (eg, forced vs. voluntary) could influence the results observed [35]. There are evidences about the benefits of both forced and voluntary aerobic exercise [19, 36, 37]. In the voluntary exercise the animal has free access to the execution of the activity to perform it on a voluntary basis, such as in activity wheels [38]; while in the forced exercise, the animal is obliged to perform the physical exercise in an intensity and duration determined by the experimenter, such as running on a treadmill [17]. Each of these types of exercise have advantages and disadvantages. Despite the forced exercise involves a higher stress degree, it permits the control of exercise intensity and time, it is why we choose this modality (we promoted an habituation to treadmill to minimize the stress). Anyway, the physical activity, regardless of the modality, brings several benefits to the nervous system of animals in healthy and pathological state in different age groups [7, 8, 27, 35, 37, 38]. Here we prefer use the healthy adult rats, in order to mimic a condition that we easily find the population: adults not engaged in regular physical activity [39]. However, the positive effects of exercise on memory persistence probably would promote benefits to older animals, since the memory persistence is less in elderly [40-42].

Taken together, our results provides important complementary evidence about the mechanisms involved in the effects of acute exercise in memory persistence [13], demonstrating that an one-single post-learning physical exercise session is able to promote the persistence of OR memory. Accordantly our best knowledge, this is the first report that relates the memory persistence induced by an exercise session to dopaminergic system activation. This work brings new evidence on the benefit of a single physical exercise session to memory, as well as suggests additional mechanisms behind this practice.

Acknowledges

This work was supported by research grants from the Federal University of Rio Grande do Sul, Federal University of Pampa, Brazilian National Council of Research of (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nivel Superior (CAPES/Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/RS/Brazil). CNPq/Brazil supports LSV, II and PBMC. KL is supported by FAPERGS. PBMC is supported by For Women in Science Program from L'Oreal and UNESCO.

References

- [1] T. Steckler, W.H. Drinkenburg, A. Sahgal, J.P. Aggleton, Recognition memory in rats--I. Concepts and classification, *Progress in neurobiology* 54(3) (1998) 289-311.
- [2] J.L. McGaugh, Memory--a century of consolidation, *Science* 287(5451) (2000) 248-51.
- [3] I. Izquierdo, L.R. Bevilaqua, J.I. Rossato, J.S. Bonini, J.H. Medina, M. Cammarota, Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation, *Trends in neurosciences* 29(9) (2006) 496-505.
- [4] L. Cahill, J.L. McGaugh, Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory, *Trends in neurosciences* 21(7) (1998) 294-9.
- [5] J.H. Medina, P. Bekinschtein, M. Cammarota, I. Izquierdo, Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate?, *Behavioural brain research* 192(1) (2008) 61-9.
- [6] J.I. Rossato, L.R. Bevilaqua, I. Izquierdo, J.H. Medina, M. Cammarota, Dopamine controls persistence of long-term memory storage, *Science* 325(5943) (2009) 1017-20.
- [7] B.H. Neves, J. Menezes, M.A. Souza, P.B. Mello-Carpes, Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation, *Physiology & behavior* 152(Pt A) (2015) 99-105.
- [8] H.L. Schimdt, A. Vieira, C. Altermann, A. Martins, P. Sosa, F.W. Santos, P.B. Mello-Carpes, I. Izquierdo, F.P. Carpes, Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation, *Neurobiology of learning and memory* 114 (2014) 242-50.
- [9] J.E. Ahlskog, Y.E. Geda, N.R. Graff-Radford, R.C. Petersen, Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging, *Mayo Clinic proceedings* 86(9) (2011) 876-84.
- [10] L.D. Baker, L.L. Frank, K. Foster-Schubert, P.S. Green, C.W. Wilkinson, A. McTiernan, S.R. Plymate, M.A. Fishel, G.S. Watson, B.A. Cholerton, G.E. Duncan, P.D. Mehta, S. Craft, Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial, *Archives of neurology* 67(1) (2010) 71-9.
- [11] R. Meeusen, K. De Meirleir, Exercise and brain neurotransmission, *Sports Med* 20(3) (1995) 160-88.
- [12] P.B. Mello-Carpes, I. Izquierdo, The Nucleus of the Solitary Tract --> Nucleus Paragigantocellularis --> Locus Coeruleus --> CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory, *Neurobiology of learning and memory* 100 (2013) 56-63.
- [13] L. da Silva de Vargas, B.S.D. Neves, R. Roehrs, I. Izquierdo, P. Mello-Carpes, One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms, *Behavioural brain research* 329 (2017) 120-126.
- [14] G. Paxinos, C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed., Academic Press, Sydney ; Orlando, 1986.
- [15] C.R. Furini, J.C. Myskiw, B.E. Schmidt, L.A. Marcondes, I. Izquierdo, D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories, *Behavioural brain research* 271 (2014) 212-7.
- [16] M.H. Malek, M. Huttemann, I. Lee, J.W. Coburn, Similar skeletal muscle angiogenic and mitochondrial signalling following 8 weeks of endurance exercise in mice: discontinuous versus continuous training, *Experimental physiology* 98(3) (2013) 807-18.
- [17] R.M. Arida, F.A. Scorza, S. Gomes da Silva, R.M. Cysneiros, E.A. Cavalheiro, Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents, *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 90(6) (2011) 452-65.
- [18] G.A. Brooks, T.P. White, Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise, *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 45(6) (1978) 1009-15.

- [19] F. Cechetti, P.V. Worm, V.R. Elsner, K. Bertoldi, E. Sanches, J. Ben, I.R. Siqueira, C.A. Netto, Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat, *Neurobiol Learn Mem* 97(1) (2012) 90-6.
- [20] A. Ennaceur, J. Delacour, A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data, *Behavioural brain research* 31(1) (1988) 47-59.
- [21] P.B. Mello-Carpes, L. da Silva de Vargas, M.C. Gayer, R. Roehrs, I. Izquierdo, Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence, *Neurobiology of learning and memory* 127 (2016) 84-92.
- [22] I. Izquierdo, C.R. Furini, J.C. Myskiw, Fear Memory, *Physiological reviews* 96(2) (2016) 695-750.
- [23] J.S. Bonini, L.R. Bevilaqua, C.G. Zinn, D.S. Kerr, J.H. Medina, I. Izquierdo, M. Cammarota, Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval, *Hormones and behavior* 50(2) (2006) 308-13.
- [24] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *Journal of neuroscience methods* 14(3) (1985) 149-67.
- [25] J. Menezes, N. Alves, S. Borges, R. Roehrs, J. de Carvalho Myskiw, C.R. Furini, I. Izquierdo, P.B. Mello-Carpes, Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(13) (2015) E1652-8.
- [26] R. Nirogi, R. Abraham, P. Jayarajan, R.B. Medapati, D. Shanmuganathan, V. Kandikere, S. Irappanavar, R. Saralaya, V. Benade, G. Bhyrapuneni, N. Muddana, Difference in the norepinephrine levels of experimental and non-experimental rats with age in the object recognition task, *Brain research* 1453 (2012) 40-5.
- [27] M.F. Flores, A. Martins, H.L. Schimdt, F.W. Santos, I. Izquierdo, P.B. Mello-Carpes, F.P. Carpes, Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging, *Neurochemistry international* 78 (2014) 53-60.
- [28] R.Y. Moore, F.E. Bloom, Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems, *Annual review of neuroscience* 2 (1979) 113-68.
- [29] J.E. Lisman, A.A. Grace, The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory, *Neuron* 46(5) (2005) 703-13.
- [30] Z. Radak, T. Kaneko, S. Tahara, H. Nakamoto, J. Pucsek, M. Sasvari, C. Nyakas, S. Goto, Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain, *Neurochemistry international* 38(1) (2001) 17-23.
- [31] T. Kobil, Q.R. Liu, K. Gandhi, M. Mughal, Y. Shaham, H. van Praag, Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment, *Learn Mem* 18(9) (2011) 605-9.
- [32] J. Farmer, X. Zhao, H. van Praag, K. Wodtke, F.H. Gage, B.R. Christie, Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo, *Neuroscience* 124(1) (2004) 71-9.
- [33] K. Knaepen, M. Goekint, E.M. Heyman, R. Meeusen, Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects, *Sports medicine* 40(9) (2010) 765-801.
- [34] J.L. Etner, L. Wideman, J.D. Labban, A.T. Piepmeier, D.M. Pendleton, K.K. Dvorak, K. Becofsky, The Effects of Acute Exercise on Memory and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), *Journal of sport & exercise psychology* 38(4) (2016) 331-340.
- [35] N.C. Berchtold, N. Castello, C.W. Cotman, Exercise and time-dependent benefits to learning and memory, *Neuroscience* 167(3) (2010) 588-97.



- [36] R.M. O'Callaghan, R. Ohle, A.M. Kelly, The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning, *Behavioural brain research* 176(2) (2007) 362-6.
- [37] M.A. Rajizadeh, K. Esmaeilpour, Y. Masoumi-Ardakani, M.A. Bejeshk, M. Shabani, N. Nakhaee, M.P. Ranjbar, F.M. Borzadaran, V. Sheibani, Voluntary exercise impact on cognitive impairments in sleep-deprived intact female rats, *Physiology & behavior* 188 (2018) 58-66.
- [38] C. Engesser-Cesar, A.J. Anderson, D.M. Basso, V.R. Edgerton, C.W. Cotman, Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury, *Journal of neurotrauma* 22(1) (2005) 157-71.
- [39] C.E. Matthews, K.Y. Chen, P.S. Freedson, M.S. Buchowski, B.M. Beech, R.R. Pate, R.P. Troiano, Amount of time spent in sedentary behaviors in the United States, 2003-2004, *American journal of epidemiology* 167(7) (2008) 875-81.
- [40] D.L. Murman, The Impact of Age on Cognition, *Seminars in hearing* 36(3) (2015) 111-21.
- [41] M. Sugiura, Functional neuroimaging of normal aging: Declining brain, adapting brain, *Ageing research reviews* 30 (2016) 61-72.
- [42] F.G. Coelho, S. Gobbi, C.A. Andreatto, D.I. Corazza, R.V. Pedroso, R.F. Santos-Galduroz, Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly, *Archives of gerontology and geriatrics* 56(1) (2013) 10-5.

Manuscript Details

Manuscript number	PHB_2018_190_R1
Title	DOPAMINERGIC HIPPOCAMPAL ACTIVATION IS NECESSARY FOR OBJECT RECOGNITION MEMORY PERSISTENCE INDUCED BY ONE-SINGLE PHYSICAL EXERCISE SESSION
Article type	Research Paper

Abstract

Previously we demonstrated that a single physical exercise session promotes the consolidation and persistence of object recognition (OR) memory and these effects involve the activation of the noradrenergic system. Here we confirm that a single physical exercise session after learning promotes persistence of OR memory, and demonstrate that this effect also involves the dopaminergic system, since it is blocked when a D1-family receptor antagonist (SCH-23390, 1µg/µl) is infused into the intra-hippocampal region after the performance of a physical exercise. Additionally, through HPLC experiments we also demonstrate that one-single physical exercise increases the hippocampal dopamine levels. Taken together, our results demonstrate that acute post-learning physical exercise is able to promote the persistence of OR memory, inducing the release of dopamine in hippocampus, which is necessary for memory persistence. This work brings new evidences on the benefit of a single physical exercise session to memory, as well as suggests additional mechanisms behind this effect.

Keywords	Acute physical exercise; Running; Memory persistence; Dopamine; Hippocampus.
Taxonomy	Learning, Memory, Behavioral Neuroscience, Cognitive Neuroscience, Exercise
Corresponding Author	Pamela Mello-Carpes
Corresponding Author's Institution	Federal University of Pampa
Order of Authors	Liane Vargas, Karine Lima, Bruna Ramborger, Rafael Rohers, IVAN IZQUIERDO, Pamela Mello-Carpes
Suggested reviewers	
Opposed reviewers	

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter Liane P&B.doc [Cover Letter]
Reply to reviewer_R1_Vargas_PB_AcExercise.docx [Response to Reviewers]
REV2912_PersistROexercDOPALiane.docx [Review Reports]
Highlights.doc [Highlights]
FINAL_REV2912_PersistROexercDOPALiane.docx [Manuscript File]
figura 1 artigo dopa.jpg [Figure]
Fig2.jpg [Figure]
Fig 3.pdf [Figure]
Fig 4.jpg [Figure]
Table 1.docx [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.