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

Fernanda Nogueira Lotz Alves

DIFERENTES FORMAS DE GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA E SUA RELAÇÃO COM A CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA

Porto Alegre
2025

Fernanda Nogueira Lotz Alves

DIFERENTES FORMAS DE GENERALIZAÇÃO DA MEMÓRIA E SUA RELAÇÃO COM A CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt
Coorientadora: Dra. Ana Paula Crestani

Porto Alegre

2025

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Resumo

A consolidação da memória é um processo dinâmico que envolve transformações sinápticas e sistêmicas, nas quais o traço mnemônico inicial, dependente do hipocampo, passa progressivamente a recrutar áreas corticais para sua evocação. Dentre essas áreas, o córtex entorrinal lateral e o córtex cingulado anterior se destacam por sua relevância funcional nesse processo. O córtex entorrinal, em especial, atua como um intermediário anatômico e funcional entre o hipocampo e o neocórtex, embora sua participação na discriminação contextual ainda seja pouco compreendida. Paralelamente a essa reorganização neuroanatômica característica da consolidação sistêmica, o traço mnemônico tende a perder detalhamento contextual, podendo ser evocado em contextos neutros — um processo de generalização dependente do tempo. Considerando-se que hormônios sexuais tendem a induzir, por si sós, generalização de memórias aversiva, perguntamo-nos que transformações qualitativas da memória contextual podem ser induzidas pela ação de hormônios sexuais, a ponto de alterar o curso temporal. A hipótese central deste trabalho sustenta que essas duas formas de indução são mediadas por mecanismos subjacentes distintos de maneira sexo-dependente. O objetivo desta tese foi investigar como o tempo, o sexo e o contexto interagem na expressão da generalização dependente e independente do tempo em ratos adultos jovens, machos e fêmeas. De forma geral, os resultados indicam que tanto a consolidação sistêmica quanto a generalização independente do tempo manifestam-se de modo distinto entre os sexos, refletindo diferenças nas dinâmicas temporais da reorganização neuroanatômica e nas estratégias cognitivas utilizadas, em função dos parâmetros contextuais. Esses achados reforçam a importância de considerar o sexo como uma variável biológica essencial em estudos sobre a memória e sugerem que a compreensão dos mecanismos de generalização pode contribuir para elucidar vulnerabilidades específicas de transtornos relacionados ao medo e à ansiedade em humanos.

Palavras-chave: Consolidação sistêmica, discriminação contextual, memória de medo, dimorfismo sexual, ratos

Abstract

Memory consolidation is a dynamic process involving both synaptic and systemic transformations, through which the initial hippocampus-dependent mnemonic trace gradually recruits cortical areas for retrieval. Among these regions, the lateral entorhinal cortex and the anterior cingulate cortex stand out for their functional relevance in this process. The entorhinal cortex, in particular, serves as an anatomical and functional interface between the hippocampus and the neocortex, although its role in contextual discrimination remains poorly understood. In parallel with the neuroanatomical reorganization that characterizes systems consolidation, the mnemonic trace tends to lose contextual detail and can be retrieved in neutral environments — a process known as time-dependent generalization. Given that sex hormones tend to induce, on their own, the generalization of aversive memories, we asked ourselves what qualitative transformations of contextual memory might be induced by the action of sex hormones, to the point of altering the temporal course of contextual generalization. The central hypothesis of this work posits that these two forms of induction are mediated by distinct underlying mechanisms in a sex-dependent manner. The aim of this doctoral dissertation was to investigate how time, sex, and context interact in the expression of time-dependent and time-independent generalization in young adult male and female rats. Overall, the results indicate that both systems consolidation and time-independent generalization manifest differently between sexes, reflecting distinct temporal dynamics of neuroanatomical reorganization and sex-specific cognitive strategies that depend on contextual parameters. These findings underscore the importance of considering sex as a fundamental biological variable in memory research and suggest that understanding the mechanisms underlying generalization may help elucidate sex-specific vulnerabilities to fear- and anxiety-related disorders in humans.

Keywords: Systems consolidation, contextual discrimination, fear memory, sex dimorphism, rats

Lista de figuras

Figura 1. Comparação simplificada entre a consolidação sináptica e sistêmica.

Figura 2. Representação esquemática da consolidação sistêmica e generalização dependente de tempo.

Figura 3. Esquema clássico e atualizado da hierarquia de processamento.

Figura 4. O córtex entorrinal como intermediário anatômico e funcional entre formação hipocampal e neocórtex.

Figura 5. Vias de biossíntese de andrógenos e estrógenos a partir de precursor lipídico.

Figura 6. Esquema representativo dos circuitos locais no hipocampo e no córtex cingulado anterior.

Figura 7. Exemplo da dinâmica temporal da consolidação sistêmica envolvendo áreas distintas.

Figura 8. Comparação entre o ciclo menstrual humano e o ciclo estral do rato em termos de duração e flutuações nos níveis circulantes de estrogênio e progesterona.

Figura 1 (Apêndice I). Porcentagem de *freezing* em ratas, separada por fase estral, dois dias após o treino.

Figura 1 (Apêndice II). Porcentagem de *freezings*, separada por sexo e grupo de tratamento, em ratos testados no contexto de condicionamento dois dias após o treino.

Figura 2 (Apêndice II). Curva dose-resposta em machos OCX testados no contexto novo.

Figura 3 (Apêndice II). Curva dose-resposta em machos OCX testados no campo aberto.

Figura 1 (Apêndice III). Participação do dHPC e do ACC na evocação de uma memória contextual de medo recente e remota.

Lista de abreviaturas e siglas

ACC – córtex cingulado anterior

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

AMPA – ácido α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPAR – receptor de AMPA

AMY – amígdala

AR – receptor de androgênio

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

BNST – núcleo do leito da estria terminal

CA1 – corno de Amon 1

CA3 – corno de Amon 3

CAC – condicionamento aversivo ao contexto

CaMKII – a proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina

CeA – núcleo central da amígdala

CNQX – 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

CREB – proteína de ligação ao elemento de resposta a AMPc

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

DG – giro denteado

DHEA – desidroepiandrosterona

DHEA-S – DHEA sulfatada

dHPC – hipocampo dorsal

DHT – di-hidrotestosterona

E2 – estradiol

EC – estímulo condicionado

EGR-1 – proteína 1 de resposta precoce ao crescimento

EI – estímulo incondicionado

ERE – elemento de resposta ao estrogênio

ER – receptor de estrogênio

ERa – receptor de estrogênio alfa

ERβ – receptor de estrogênio beta

GABA – ácido gama-aminobutírico

GDX – gonadectomizado

HPA – hipotálamo- pituitária – adrenal

HPC – hipocampo

ILC – córtex infralímbico

LEC – córtex entorrinal lateral

LTD – depressão de longa duração

LTP – potenciação de longa duração

mPFC – córtex pré-frontal medial

mRNA – RNA mensageiro

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMDAR – receptor de NMDA

OCX – orquiectomizado

OVX – ovariectomizada

PACAP – peptídeo ativador de adenilil ciclase da pituitária

PFC – córtex préfrontal

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

PLC – córtex prélimbico

PMKζ – proteína cinase M zeta

PSD – densidade pós-sináptica

s.c – subcutânea

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

TP – propionato de testosterona

TrkB – receptor de tropomiosina cinase B

Veh – veículo

vHPC – hipocampo ventral

vmPFC – córtex pré-frontal ventromedial

Agradecimentos

É um desafio agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, fizeram parte dessa trajetória sem transformar estes agradecimentos em um texto mais longo do que a própria tese — e, inevitavelmente, muitos nomes que mereciam estar aqui não aparecerão.

Começo pela minha família, que ao longo desses anos me deu todo o suporte necessário para que eu concluísse esta etapa. Sem vocês, não sei se teria conseguido chegar até aqui. Vocês são meus pilares e, se eu não desmoronei, é porque sempre estiveram presentes e fortes. À minha mãe, que sempre incentivou minhas decisões e, sabendo que incentivo é importante, mas nem sempre suficiente, assumiu tantas responsabilidades para que eu pudesse focar no laboratório e na escrita da tese, mesmo quando ela mesma já estava sobrecarregada. Ao meu pai e ao meu irmão, pela ajuda financeira durante toda a jornada, especialmente neste último ano sem bolsa. Foi graças a vocês que pude dedicar-me inteiramente ao doutorado, sem o peso adicional de buscar outras fontes de renda. À minha irmã e à minha sobrinha, sempre generosas e de portas abertas em todos os momentos em que precisei.

Ao meu orientador, professor Jorge, que me “atura” no laboratório desde 2014, quando comecei como Iniciação Científica (IC). Agradeço pela orientação sempre estimulante e humana. Sentir-me valorizada e tratada com respeito, tanto nos momentos bons quanto nos difíceis, fez toda a diferença nessa caminhada.

À minha coorientadora, Ana Paula, que me acompanha desde o TCC, sempre com boa disposição e respostas úteis para qualquer dúvida que eu tivesse.

Aos integrantes do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, que fizeram parte do meu cotidiano de doutorado: à veterana Kétlyn, pela amizade e pelas frases de efeito que hoje têm lugar permanente na porta do meu armário; à caçula Giuliana, pela ajuda constante nos experimentos; às ICs Kauani, Eduarda, Nátali e Catarine, pela assistência nas cirurgias e em tantos outros procedimentos; à Jociane Myskiw, pelas conversas produtivas sobre a carreira

científica; e a tantos outros que passaram pelo laboratório e contribuíram para essa experiência.

Ao meu orientador no exterior, Fabrício Do Monte, por me receber em seu laboratório na UTHealth em Houston e pelo amparo durante o período em que estive sozinha fora do Brasil. Agradeço também à Vicky e ao Stephen, por me acolherem na chegada, pela ajuda no dia a dia e até por encontrarem um apartamento acessível e bem localizado. Ainda que eu tivesse menos contato com os coelhos de estimação Lenny e Rosemary — talvez por serem ainda mais tímidos do que eu — estendo a eles minha gratidão pela hospitalidade. À pós-doc Michelle, pela amizade e pelos conselhos sobre a vida após o doutorado. Nada melhor do que aprender com quem já trilhou esse caminho. Ao pós-doc Guillermo, sempre acessível para tirar dúvidas e com brilho nos olhos ao falar de seus projetos. À Nikita, que impressionantemente sabia onde estava cada item de laboratório — e que respondia todas as minhas perguntas de recém-chegada com bom humor e muita disposição. À Claire, por me ensinar a extrair dados dos vídeos de *miniscope* e tantos outros protocolos. Ao Xu, pelo acompanhamento nas cirurgias de vírus, lente GRIN e *baseplate*, e por me mostrar como fazer os registros com *miniscope*. Ao Cana, pela boa vontade em conversar sobre qualquer assunto, inclusive sobre o que fazer (e o que não fazer) em Houston. E aos demais membros do Do Monte Lab, que também fizeram parte dessa vivência que levarei para a vida toda.

Aos integrantes passados e presentes do Laboratório de Neurobiologia da Memória: Mirelle, meu braço direito durante o desenvolvimento do meu TCC e mestrado; Bruno, por me ensinar a realizar a gonadectomia dos ratos machos e fêmeas e pelas pérolas de humor negro durante os procedimentos; e Jordana, por ajudar com os protocolos de imunohistoquímica, entre outros, vocês são melhores do que qualquer tutorial. Aos demais membros prof. Lucas, Débora, Luquinhas, Aline, Angel, Haron, Marina, Breno e tantos outros, por tornarem essa jornada ainda mais rica.

À Tina, pelos cuidados com os ratos e pela amizade ao longo desses anos.

Agradeço também à relatora Denise Zancan e aos membros da banca, Leandro Bertoglio e Raquel Fornari, pela disponibilidade e pela cuidadosa avaliação da tese.

À Capes, pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche no exterior.

E, por fim, aos ratos — sem os quais nada disso seria possível.

Sumário

1. Introdução 14

1.1 Classificação da memória e suas fases 14

1.2 O engrama dinâmico 15

1.3 Consolidação sináptica e sistêmica da memória 16

1.4 Dois lados de uma mesma moeda: consolidação sistêmica e generalização dependente do tempo 19

1.5 Lesões cerebrais e casos clínicos: bases históricas do modelo de consolidação 20

1.6 Hierarquia e dinâmica temporal da consolidação sistêmica 21

1.7 Diferenciação e dimorfismos sexuais 23

2. Objetivos 30

2.1 Objetivo Geral: 30

2.2 Capítulo I 30

2.3 Capítulo II 31

2.4 Capítulo III 31

3. Hipótese Central 33

3.1 Hipótese Geral – Capítulo I 33

3.2 Hipótese Geral – Capítulo II 33

3.3 Hipótese Geral – Capítulo III 34

4. Capítulo I 35

5. Capítulo II 47

6. Capítulo III 82

7. Discussão Geral 117

7.1 Contextos e representações contextuais 117

7.2 Caminhos múltiplos para a generalização da memória 123

7.2.1 Generalização dependente do tempo 123

7.2.2 Generalização independente do tempo 126

7.3 Diferenças sexuais na dinâmica temporal da consolidação sistêmica: da adolescência tardia à idade adulta 127

7.4 Hormônios sexuais e ansiedade 128

7.5 Estrogênio, estresse e espinhos 131

7.6 E os androgênios? 135

7.7 Tratamento agudo versus crônico 136

8. Conclusões 139

8.1 Capítulo I 139
8.2 Capítulo II 139
8.3 Capítulo III 140
8.4 Conclusão geral 141
9. Limitações e perspectivas 142
10. Referências bibliográficas 144
11. Apêndice I (Capítulo I) 156
11.1 Experimento Piloto: Generalização Contextual em Fêmeas Intactas 156
11.2 Material Suplementar (Capítulo I) 157
12. Apêndice II (Capítulo II) 194
12.1 Avaliação da dependência hipocampal em ratos machos e fêmeas gonadectomizados com reposição hormonal 194
12.2 Machos OCX: Curva Dose Resposta (2 dias) 195
12.3 Machos OCX: Campo Aberto (2 dias) 196
13. Apêndice III (Capítulo III) 198
13.1 Avaliação da dinâmica temporal da consolidação sistêmica em fêmeas não-gonadectomizadas 198
13.1.1 Hipocampo dorsal 198
13.1.2 Córtex Cingulado Anterior 198
14. Considerações finais 200
15. Anexo I 203

1. Introdução

1.1 Classificação da memória e suas fases

A memória pode ser definida como o processo de aquisição de informações por meio dos sentidos, seguido pela formação de um traço mnemônico que é subsequentemente armazenado ou consolidado no encéfalo e que, em momento posterior, pode ser evocado (Izquierdo, 2021).

O processamento da memória inicia-se com a aquisição de informações sensoriais, que são posteriormente codificadas e consolidadas no encéfalo. A consolidação sináptica estabiliza progressivamente o traço mnemônico (engrama) ao longo de horas, transformando uma representação inicialmente lábil em uma memória duradoura (McGaugh, 2000). Em paralelo, ocorre a consolidação sistêmica, um processo de reorganização cerebral que se estende por dias, anos ou mesmo décadas em seres humanos.

As memórias consolidadas podem ser posteriormente evocadas. Durante a evocação, o traço mnemônico torna-se novamente lábil, podendo passar por reconsolidação — um novo processo de estabilização que incorpora informações atualizadas (Nader et al., 2000; Suzuki et al., 2004). Alternativamente, pode ocorrer a extinção, caracterizada pela formação de um novo traço inibitório que suprime temporariamente a expressão da memória original (Monfils et al., 2009; Suzuki et al., 2004). Ainda, o traço pode decair ao longo do tempo, levando ao esquecimento (Izquierdo, 2021).

As memórias são didaticamente classificadas segundo sua duração e conteúdo. Quanto à duração, incluem-se as memórias de registro rápido, como a sensorial (com duração de milissegundos) e a de trabalho (segundos a minutos), que possuem caráter predominantemente operacional e não são consolidadas no encéfalo (Öğmen & Herzog, 2016; Polti et al., 2018; Thaut & Hömberg, 2025). Em contraste, as informações destinadas ao armazenamento duradouro são consolidadas na memória de curto prazo (minutos a horas em ratos) e de longo prazo (que pode persistir por toda a vida) (Izquierdo, 2021).

Quanto ao conteúdo, as memórias de longo prazo subdividem-se em declarativas (ou explícitas) e não declarativas (ou implícitas). O processo da consolidação sistêmica pode ser amplo e envolver tanto memórias explícitas quanto implícitas, porém, no contexto das memórias explícitas, podem ser classificadas como episódicas ou semânticas, as quais podem ter destinos distintos no encéfalo ao longo do tempo (Figura 2).

1.2 O engrama dinâmico

Na mitologia grega, Teseu resgatou as crianças de Atenas do Minotauro e fugiu em um barco rumo à pequena ilha de Delos. Para celebrar a vitória sobre o monstro, os atenienses realizavam anualmente uma peregrinação até Delos no navio de Teseu. Com o passar dos anos, no entanto, todas as partes da embarcação foram sendo substituídas. Os filósofos da época se perguntavam: se todas as peças originais foram trocadas, ainda seria o mesmo barco? E, se não, em que momento deixou de sê-lo?

De maneira análoga, o *turnover* é uma inevitabilidade biológica. Proteínas, células e circuitos neurais são continuamente renovados, o que suscita a questão: o que define a identidade material e funcional de algo? Pode-se argumentar que o *blueprint* geral — o padrão de organização — permanece, mas pequenas modificações cumulativas transformam gradualmente o sistema. O cérebro, com suas complexas interações entre moléculas, sinapses e redes, não é uma estrutura estática, mas sim um sistema em permanente fluxo, se transformando a cada novo aprendizado, o que impacta a memória e o comportamento.

O conceito de engrama é central no estudo da memória, referindo-se ao substrato neural que dá suporte aos diferentes componentes mnemônicos, dessa forma gerando o registro físico da memória (Josselyn & Tonegawa, 2020; Kitamura et al., 2017). Antes visto como uma rede estável de conexões entre neurônios alocados durante a aquisição, hoje se reconhece que assembleias neurais dinâmicas contribuem para os engramas (Rule et al., 2019; Sweis et al., 2021). No hipocampo, por exemplo, novos engramas surgem e se desfazem

espontaneamente, podendo ser reutilizados para representar novos contextos (Dragoi & Tonegawa, 2011, 2013; Ziv et al., 2013). Essa plasticidade sugere que os engramas não são entidades fixas, mas unidades flexíveis que podem sustentar transformações qualitativas da memória ao longo do tempo.

1.3 Consolidação sináptica e sistêmica da memória

As sinapses apresentam notável plasticidade, sendo sua força passível de modificação pela experiência e aprendizagem. Essas alterações podem persistir por intervalos variáveis, de minutos ou horas até toda a vida do organismo. Os mecanismos fundamentais da consolidação sináptica são altamente conservados ao longo da evolução, sendo observados desde organismos com sistemas nervosos simples, como *Aplysia* (cerca de 20 mil neurônios), até vertebrados complexos (Kandel, 2013).

A consolidação da memória é um fenômeno dependente do tempo, que envolve reorganizações progressivas em níveis sináptico e sistêmico (Figura 1) (Dudai, 2004; Dudai et al., 2015).

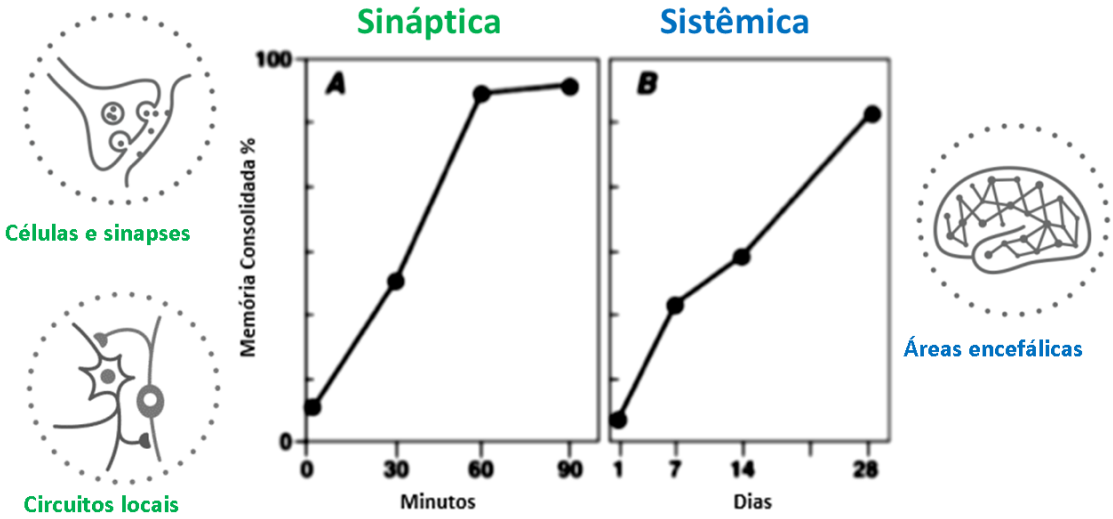


Figura 1. Comparação simplificada entre a consolidação sináptica (à esquerda) e sistêmica (à direita). Enquanto a sináptica é rápida e envolve principalmente alterações nas sinapses e circuitos locais, a sistêmica é prolongada e abrange diferentes regiões encefálicas. Adaptado de Dudai (2004).

A consolidação sináptica refere-se à estabilização gradual de memórias, processo que pode variar conforme a intensidade do treino (Casagrande et al., 2018). Durante essa fase, espinhos dendríticos passam por reestruturações que facilitam a incorporação de receptores de glutamato do tipo AMPA e NMDA na membrana pós-sináptica (Kandel et al., 2013). Os receptores NMDA atuam como “detectores de coincidência” entre a atividade pré e pós-sináptica, consolidando a potenciação de longa duração (LTP), mecanismo central da formação de memórias. Sua ativação promove a entrada de íons Ca^{2+}, desencadeando cascatas de sinalização intracelular mediadas por quinases como PKA, PKC e CaMKII (Huang et al., 2013; Lisman et al., 2012; Malenka & Bear, 2004). Essas enzimas fosforilam receptores, aumentando sua densidade sináptica (Johansen et al., 2011), e regulam fatores de transcrição que induzem a síntese proteica essencial à consolidação do traço mnemônico. Esse processo inclui a formação de novas sinapses e a remodelação de conexões preexistentes (Dudai, 2004; Kandel et al., 2013). Interferências nessa fase comprometem a formação de memórias de longo prazo (Frankland & Bontempi, 2005).

Além da consolidação sináptica, ocorre, em paralelo, a consolidação sistêmica, que envolve o recrutamento progressivo de múltiplas regiões cerebrais (Dudai, 2004; Frankland & Bontempi, 2005; Moscovitch et al., 2005). Com o tempo, há uma reorganização dos circuitos neurais subjacentes à evocação: regiões neocorticais tornam-se gradualmente mais importantes enquanto o hipocampo se torna menos essencial (Quillfeldt et al., 1996; Squire, 2004; Squire & Alvarez, 1995).

Inspirado pelos trabalhos de David Marr (1970, 1971), que propôs um sistema dual de armazenamento — o hipocampo, responsável pela consolidação rápida, e o neocórtex, pela consolidação lenta —, McClelland et al. (1995) e Squire e Alvarez (1995) formularam a Teoria Padrão da Consolidação, segundo a qual as memórias de longo prazo inicialmente dependem do hipocampo, mas, com o tempo, passam a ser evocadas de modo independente dessa estrutura. Entretanto, observações incompatíveis com essa proposta levaram Nadel e Moscovitch (1997) a proporem a Teoria dos Múltiplos Traços, que distingue as memórias episódicas (dependentes do hipocampo) das semânticas (dependentes do neocórtex) (Figura 2). O hipocampo e o neocórtex interagem

de maneira dinâmica para sustentar a persistência das memórias ao longo do tempo, e, por meio de reativações sucessivas, ocorre a criação ou o fortalecimento de novas traços entre essas regiões encefálicas (Nadel & Moscovitch, 1997; Quillfeldt, 2019).

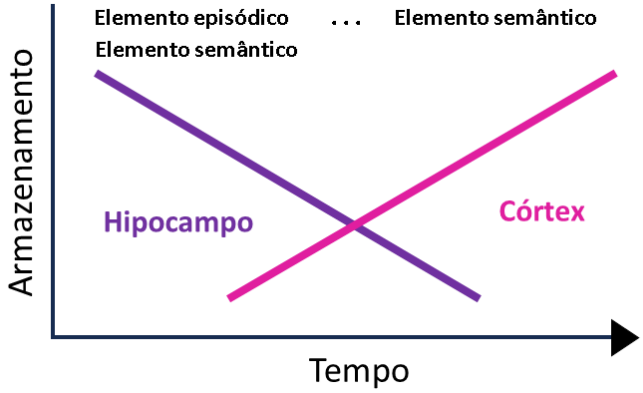


Figura 2. Representação esquemática da consolidação sistêmica e generalização dependente de tempo. Com o tempo, ocorre a transferência gradual do hipocampo, importante para a evocação de memórias precisas, para as áreas corticais. Com a corticalização, ocorre a perda de detalhamento contextual, tornando as memórias mais semantizadas e generalizadas. Fonte: autora.

Segundo esse modelo, memórias antigas com múltiplos traços distribuídos entre hipocampo e neocórtex são menos vulneráveis a prejuízos na evocação do que memórias recentes. Essa proposta foi refinada por Winocur et al. (2010) na Teoria da Transformação do Traço, que sustenta que memórias episódicas e semânticas coexistem e interagem dinamicamente, competindo por dominância. Esse modelo enfatiza os paralelos entre as características neuroanatômicas das estruturas encefálicas que sustentam a memória e as propriedades qualitativas das informações evocadas (Quillfeldt, 2019).

McClelland (2013), inspirado nas ideias de Marr, desenvolveu o *Complementary Learning Systems Model*, que explica como os sistemas rápido (hipocampo) e lento (neocórtex) coexistem sem que haja interferência catastrófica na memória. Versões mais recentes desse modelo incorporam achados de Tse et al. (2007, 2011), demonstrando que o neocórtex também pode suportar aprendizado rápido quando conhecimentos prévios (*schemas*) já estão estabelecidos.

O hipocampo atua, portanto, como um “índice” que conecta elementos distribuídos pelo neocórtex, convergindo-os para gerar representações contextuais integradas (Squire & Zola-Morgan, 1991; Teyler & DiScenna, 1986; Teyler & Rudy, 2007). Essa função é evidenciada em estudos que mostram que animais com lesões hipocampais podem formar memórias explícitas, mas falham em associá-las ao contexto em que foram adquiridas (Smith & Bulkin, 2014).

1.4 Dois lados de uma mesma moeda: consolidação sistêmica e generalização dependente do tempo

Vários estudos sugerem que os dois fenômenos — a consolidação sistêmica e a generalização dependente do tempo — são processos temporalmente entrelaçados (Pedraza et al., 2016; Wiltgen et al., 2010). O curso natural desses processos pode ser antecipado ou atrasado em função de variáveis não relacionadas ao intervalo entre o condicionamento e o teste, como a idade do animal (Crestani et al., 2022), estresse (Dos Santos Corrêa et al., 2019; Pedraza et al., 2016), reativações periódicas ou aprendizados novos intercalados entre o condicionamento e teste (Crestani et al., 2018; De Oliveira Alvares et al., 2012; Finnie et al., 2018; Haubrich et al., 2016; Pedraza et al., 2017) e pré-exposição ao contexto (Keiser et al., 2017). Além disso, observa-se um aumento da atividade neural no mPFC em paralelo ao surgimento da generalização do medo para memórias remotas, concomitante a uma redução da atividade nas regiões hipocampais (Bontempi et al., 1999; Cullen et al., 2015). Esses achados sugerem que o hipocampo e o mPFC desempenham papéis complementares e temporalmente distintos na generalização da memória: enquanto o hipocampo é mais recrutado durante a evocação de memórias recentes e precisas, o PFC, principalmente o córtex cingulado anterior (ACC), torna-se progressivamente mais necessário para a evocação de memórias remotas, mais genéricas e com menor detalhamento contextual.

A generalização, portanto, pode manifestar-se como um processo dependente do tempo, intrinsecamente associado à consolidação sistêmica, ou como um processo independente do tempo, podendo ser rapidamente induzido por

moduladores fisiológicos, como os hormônios sexuais (Frankland & Bontempi, 2005; Jasnow et al., 2017; Lynch et al., 2014, 2016).

1.5 Lesões cerebrais e casos clínicos: bases históricas do modelo de consolidação

O entendimento atual sobre a consolidação da memória e sua dinâmica temporal deve muito às observações clínicas de pacientes com lesões cerebrais. O caso clássico de Henry Molaison (H.M.) revolucionou o campo ao demonstrar que o hipocampo é essencial para a formação de novas memórias explícitas (Scoville & Milner, 1957). Após a remoção bilateral do hipocampo e de partes adjacentes do lobo temporal medial, H.M. apresentou profunda amnésia anterógrada — incapacidade de formar novas memórias declarativas —, embora sua memória de trabalho e de procedimentos permanecessem preservadas.

Casos subsequentes reforçaram essa dissociação funcional e neuroanatômica entre memórias explícitas e implícitas. Estudos com pacientes portadores de lesões corticais mostraram que memórias antigas podiam ser evocadas mesmo com danos hipocampais extensos, sustentando a hipótese de uma transferência gradual da dependência hipocampal para regiões neocorticais (Squire & Alvarez, 1995).

Evidências adicionais provenientes de estudos neuroanatômicos e neuropsicológicos demonstraram a contribuição diferenciada das sub-regiões hipocampais nos processos mnemônicos (Rempel-Clower et al., 1996). Outros casos clínicos em que pacientes apresentem danos mais extensos à formação hipocampal são acompanhados de amnésia retrógrada mais severa quanto maior for a extensão da lesão. Esses achados em humanos são consistentes com estudos em roedores, nos quais lesões hipocampais após o treino resultaram em amnésia retrógrada gradual (Anagnostaras et al., 1999; Kim & Fanselow, 1992; Squire & Alvarez, 1995).

Essas evidências clínicas e experimentais ilustram um aspecto fundamental da amnésia retrógrada: a presença de um gradiente temporal, segundo o qual as memórias mais recentes são mais vulneráveis a prejuízos na evocação,

enquanto as mais antigas tendem a ser melhor preservadas. Esse fenômeno, descrito pelo psicólogo francês Théodule Ribot (1839–1916) oferece um modelo explicativo para observações em condições neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, caracterizadas pelo comprometimento progressivo da evocação de memórias recentes (Sadek et al., 2004).

1.6 Hierarquia e dinâmica temporal da consolidação sistêmica

Desde o caso do paciente H.M., uma vasta literatura em humanos e modelos animais demonstrou a importância do lobo temporal medial na consolidação de memórias. Essa região organiza-se junto com áreas superiores em uma hierarquia de redes associativas, nas quais informações uni e polimodais oriundas de córtices associativos convergem para os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal, antes de alcançar a formação hipocampal onde informações contextuais e espaciais são integradas e processadas (Figura 3) (Lavenex & Amaral, 2000; Rudy, 2009).

As projeções da formação hipocampal de volta ao neocórtex dependem de estruturas como o córtex entorrinal, o que as torna fundamentais para a consolidação sistêmica de memórias remotas.

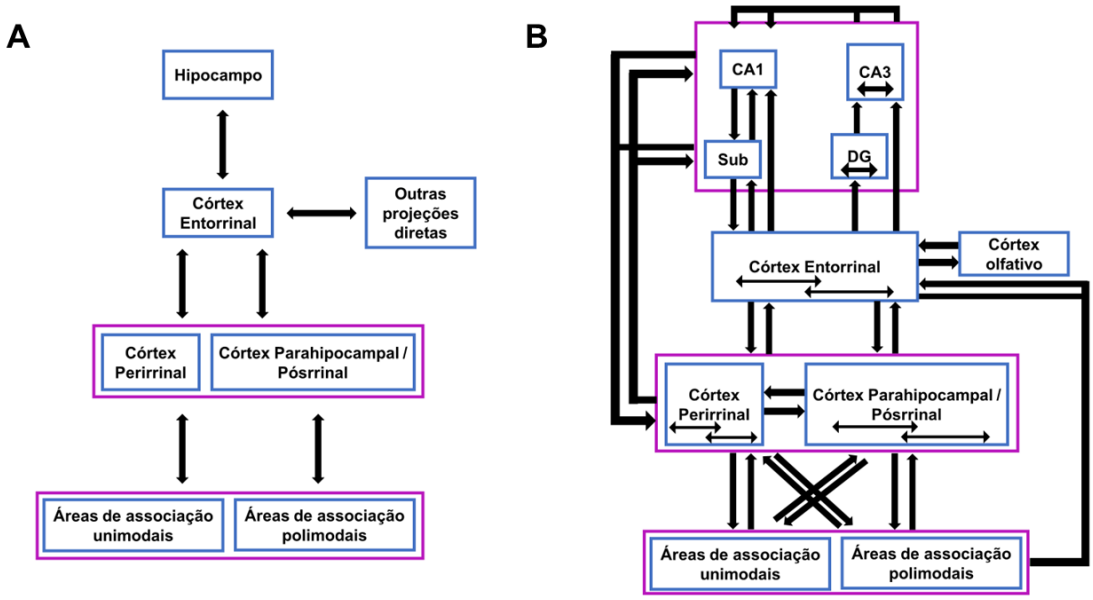


Figura 3. Esquema clássico e atualizado da hierarquia de processamento. A: Esquema clássico. B: Esquema atualizado, destacando maior integração de informações. *Sub*: subículo; *DG*: giro denteado; *CA*: corno de Amon. Adaptado de Lavenex & Amaral (2000).

A consolidação da memória contextual de medo envolve a ativação coordenada de diversas estruturas encefálicas, entre elas o hipocampo (HPC), a amígdala (AMY) e regiões do córtex pré-frontal, como o córtex cingulado anterior (ACC). A amígdala, em especial sua porção basolateral, é essencial tanto para memórias de medo condicionadas ao contexto (Kitamura et al., 2017) quanto ao tom (Bergstrom, 2016). O hipocampo (pallidum medial, antigo arquicórtex) é altamente conservado no reino animal — possui três camadas principais e uma divisão funcional: a porção dorsal (dHPC), associada a processos cognitivos e espaciais, e a ventral (vHPC), relacionada ao processamento afetivo e à expressão de respostas de medo em contextos neutros com o passar do tempo (Casagrande et al., 2023; Cullen et al., 2015; Fanselow & Dong, 2010). O vHPC conecta-se diretamente à AMY e a regiões neocorticais, enquanto o dHPC o faz indiretamente via estruturas como o núcleo reuniens do tálamo (Ramanathan et al., 2018; Varela et al., 2014; Xu & Südhof, 2013). O neocórtex (pallidum dorsal) – com seis camadas – é bastante proeminente em mamíferos e áreas como o ACC suportam a evocação de memórias contextuais remotas e mais genéricas. Embora o hipocampo seja essencial para a formação e o armazenamento inicial de memórias contextuais, evidências mostram que neurônios corticais são “marcados” (*tagged*) já durante a aquisição (Lesburguères et al., 2011) e, com o tempo, a evocação torna-se menos dependente do hipocampo (Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004) e mais dependente de áreas corticais (Ding et al., 2008; Einarsson et al., 2015; Restivo et al., 2009; Vetere et al., 2019).

Já o córtex entorrinal (córtex lateral, antigo paleocórtex) (Kardong, 2012), ocupa posição intermediária entre hipocampo e neocórtex, e possui de 4–5 camadas (Purves, 2012). Ele sustenta a codificação rápida de novas associações (Pilkiw et al., 2022; Takehara-Nishiuchi, 2014) e atua como um nó funcional de integração entre regiões hipocampais e corticais (Figura 4). O entorrinal lateral (LEC) mostrou-se crucial para a evocação da memória aversiva recente e remota, mas não de memórias muito antigas, quando apenas regiões

neocorticais parecem ser necessárias (Figura 7) (Quillfeldt et al., 1996). Outros trabalhos, contudo, indicam uma atuação mais restrita do entorrinal a fases iniciais (Frankland & Bontempi, 2005; Kitamura et al., 2017). Assim, permanece em aberto se seu envolvimento é permanente ou temporalmente limitado (Takehara-Nishiuchi, 2014).

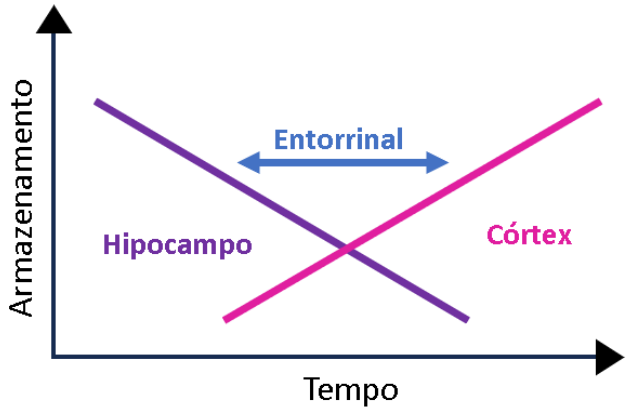


Figura 4. O córtex entorrinal como intermediário anatômico e funcional entre formação hipocampal e neocórtex. Fonte: autora.

Embora há muitas evidências evidenciando a dinâmica temporal da consolidação sistêmica (Cho et al., 1993; Haubrich et al., 2016; Kitamura et al., 2017; Maviel et al., 2004; Quillfeldt et al., 1996; Quinn et al., 2014; Wiltgen & Tanaka, 2013), outras apontam para a relevância do hipocampo para o recrutamento da memória independentemente da idade (Lehmann et al., 2009; Ocampo et al., 2017). Tais discrepâncias podem refletir diferenças nos parâmetros experimentais, no grau de detalhamento espacial da memória ou na carga cognitiva envolvida. Além disso, o sexo biológico é um fator modulador importante na aquisição e evocação de memórias contextuais e espaciais (Adkins et al., 2019; Keeley et al., 2015; Lotz et al., 2025; Lynch et al., 2013, 2014, 2016).

1.7 Diferenciação e dimorfismos sexuais

Existem poucos dimorfismos sexuais de fato no cérebro — isto é, diferenças robustas que possam ser atribuídas ao sexo biológico e não a outros fatores —,

sendo que a maioria das distinções observadas são sutis e dizem respeito principalmente a padrões de ativação e conectividade, além de diferenças volumétricas regionais (Koss & Frick, 2017; McCarthy et al., 2015). Um exemplo de aparente dimorfismo sexual em seres humanos é a maior densidade neuronal no córtex temporal posterior, uma área associativa relacionada à linguagem (Witelson et al., 1995). Em roedores, um exemplo classicamente dimórfico é o núcleo pré-óptico medial, região fundamental na regulação de comportamentos sexuais e maternos (Gorski et al., 1978; Lenz et al., 2012; Nugent et al., 2015).

Durante a ontogenia, um aumento pré-púbere na secreção de andrógenos, ocorre com a adrenarca, um conjunto de eventos endócrinos que se estende até a puberdade para modular o fenótipo sexual e contribuir para o desenvolvimento e a diferenciação cerebral (Cumberland et al., 2021). Esse período é caracterizado pelo aumento da produção, na *zona reticularis* da glândula adrenal, de andrógenos precursores da testosterona, como a desidroepiandrosterona (DHEA), sua forma sulfatada (DHEA-S) e a androstenediona (Figura 5). A biossíntese local de DHEA no tecido neural estimula o crescimento axonal e a sinaptogênese, enquanto a DHEA-S promove o crescimento e a ramificação dendrítica no neocórtex em desenvolvimento (Compagnone & Mellon, 1998). Além disso, o DHEA exerce efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato e contra a neurotoxicidade provocada por glicocorticoides, particularmente durante o desenvolvimento cerebral (Kurata et al., 2004). Assim, pode prevenir a atrofia de neurônios vulneráveis à ação dos glicocorticoides, como os do hipocampo (Cumberland et al., 2021). Embora a adrenarca seja mais proeminente em humanos e outros primatas, há evidências de que processos análogos ocorram em alguns outros mamíferos, ainda que em menores concentrações, com efeitos fisiologicamente relevantes (Cutler et al., 1978; Rege et al., 2019).

Com o início da gonadarca, as diferenças estruturais e volumétricas entre cérebros de machos e fêmeas tornam-se mais pronunciadas. Nessa fase, predominam os efeitos ativacionais mediados por esteroides sexuais, os quais se mantêm ao longo da vida adulta. Embora a maior parte dos efeitos organizacionais ocorra nas fases iniciais do desenvolvimento — quando hormônios gonadais modulam a arquitetura neural e o comportamento —, há

continuidade desse processo até a adolescência tardia em certas regiões cerebrais (Schulz et al., 2009).

Em ratos, a puberdade inicia-se aproximadamente entre os dias pós-natais (PND) 30 a 39 nas fêmeas e 40 a 45 nos machos, período que corresponde, respectivamente, à abertura do canal vaginal e à separação prepucial, sendo que essas idades podem variar conforme a linhagem (Koss & Frick, 2017). Durante esse intervalo, múltiplas estruturas envolvidas em processos mnemônicos, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal, passam por intensas remodelações estruturais, algumas das quais persistem até a vida adulta (Koshibu et al., 2004; Spear, 2000). Por exemplo, a presença de hormônios sexuais após a puberdade aumenta a apoptose neuronal no córtex pré-frontal ventromedial (vmPFC) de fêmeas, mas não de machos, e a ovariectomia atenua essa perda neuronal no córtex pré-frontal medial (Koss et al., 2015; Markham et al., 2007). Outro fenômeno característico da adolescência é a intensificação da poda sináptica, processo que também pode estar associado à diferenciação sexual do cérebro.

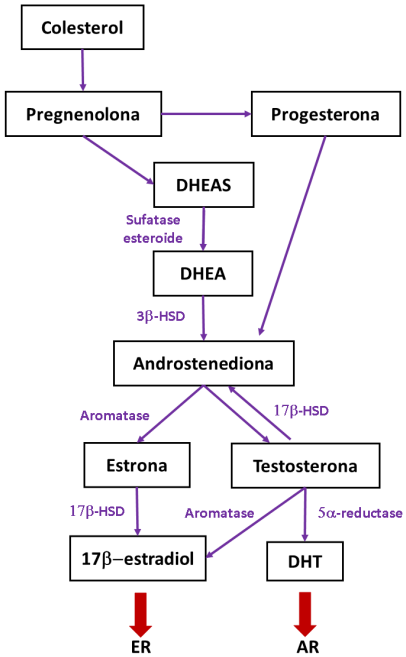


Figura 5. Vias de biossíntese de andrógenos e estrógenos a partir de precursor lipídico. Adaptado de Vrtačnik et al., (2014)

Os hormônios sexuais podem se ligar a diferentes receptores e exercer efeitos diversos, dependendo da organização cerebral estabelecida durante a ontogenia. Enquanto alguns autores definem como verdadeiros dimorfismos comportamentais apenas aqueles decorrentes de diferenças organizacionais estabelecidas nas fases precoces do desenvolvimento, outros consideram também os efeitos ativacionais dos hormônios em animais adultos (Frick et al., 2015).

A ação dos hormônios sexuais nas fases iniciais do desenvolvimento tem efeito predominantemente organizacional, moldando o “substrato neural” de modo que, posteriormente, modificações celulares em resposta à presença de esteroides sexuais possam resultar em diferentes efeitos neurais e comportamentais na vida adulta. Em termos de plasticidade neural, durante as fases iniciais do desenvolvimento, diversos mecanismos celulares são envolvidos, como a diferenciação, proliferação e migração neuronal, além do crescimento e da ramificação dendrítica. Já na vida adulta, esses processos parecem depender principalmente de modificações em estruturas localizadas, como espinhos dendríticos e densidades pós-sinápticas (Frankfurt & Luine, 2015).

Embora essa plasticidade diminua com o avanço da idade, ela se mantém ao longo de toda a vida, e os hormônios sexuais exercem efeitos complexos sobre o cérebro adulto, modulando múltiplos aspectos da plasticidade sináptica e estrutural, como o crescimento e a ramificação dendrítica, densidade de espinhos sinápticos, proliferação e a sobrevivência de novos neurônios no giro denteado e no bulbo olfatório. Ainda, podem potencializar a indução da LTP em ambos os sexos (Taxier et al., 2020). Por exemplo, neuroesteroides regulam diversas vias de sinalização envolvidas na plasticidade neuronal. Em roedores, o estrogênio ativa Akt, LIM cinase e o receptor de BDNF TrkB, cuja expressão varia de acordo com a fase do ciclo estral — sendo mais elevada no hipocampo de fêmeas em proestro quando comparadas a fêmeas em diestro e a machos. Além disso, o estrogênio exerce efeitos diretos sobre proteínas da densidade pós-sináptica, como o PSD-95, atuando assim no remodelamento da actina, na formação de sinapses e na excitabilidade neuronal (Hara et al., 2015), o que pode exercer papéis importantes na consolidação sistêmica e transformações qualitativas da memória. Por exemplo, o estradiol regula a expressão de BDNF

no cérebro, promovendo aumento da densidade dendrítica por mecanismos rápidos de membrana e transcrição mediada por CREB (Luine & Frankfurt, 2013; Solum & Handa, 2002). Assim, as interações entre hormônios gonadais e neurotrofinas, como o BDNF, podem modular significativamente o processamento de informações neurais.

Tanto machos quanto fêmeas produzem hormônios sexuais tradicionalmente associados a cada sexo — andrógenos e estrogênios —, configurando um verdadeiro mosaico fisiológico. Essa constatação desafia a noção de um dimorfismo sexual rígido e sugere que as diferenças hormonais entre os sexos são mais complexas e graduais do que uma simples dicotomia binária. Tal perspectiva reforça a importância de se considerar a complexidade biológica ao investigar como diferentes neuroesteroides interagem para moldar fenótipos distintos ao longo do desenvolvimento e entre os sexos.

No caso da generalização de medo contextual, em fêmeas, é mediada pelo receptor de estrogênio citosólico ERβ (Lynch et al., 2014). No entanto, esses receptores são pouco detectáveis em neurônios neocorticais que expressam BDNF, sendo mais abundantemente encontrados em interneurônios gabaérgicos. Blurton-Jones e Tuczynski (2006) observaram que a reposição aguda de estradiol em ratas OVX reduziu os níveis de GABA no neocórtex e concluíram, a partir de ensaios imunohistoquímicos, que essa diminuição de GABA atenua a inibição sobre neurônios excitatórios que expressam BDNF. Assim, a maior expressão dessa neurotrofina em neurônios corticais pode representar um mecanismo adicional subjacente à generalização precoce observada em fêmeas. Embora o efeito da reposição de estradiol não tenha sido testado em machos, é plausível supor que, como a generalização depende também de receptores ERα além de ERβ, as vias de sinalização envolvendo neurotrofinas, como o BDNF, sejam distintas entre os sexos. Apesar de receptores de estrogênio e de andrógenos estarem amplamente distribuídos pelo encéfalo em machos e fêmeas, há diferenças significativas na regulação e expressão desses receptores entre os sexos, o que contribui para as ações multifacetadas dos neuroesteroides sobre esses fenótipos.

Além dos estrogênios, a progesterona — outro hormônio gonadal — tem sido implicada na proteção contra a neurotoxicidade induzida por excitotoxicidade

glutamatérgica (via NMDA), bem como na modulação da produção de neurotrofinas, incluindo BDNF. Por exemplo, em amostras *in vitro* de fatias hipocampais, a exposição prévia ao estradiol (24h antes) conferiu proteção contra excitotoxicidade; contudo, a aplicação de progesterona 4 h após o tratamento com estradiol reverteu esse efeito (Aguirre et al., 2010). Em outro estudo, a progesterona também reverteu o aumento da expressão de mRNA e proteínas de ERβ, os níveis de proteína de ERα e o mRNA de BDNF induzidos por E2 (Aguirre & Baudry, 2009). De forma semelhante, a progesterona antagoniza o efeito do estradiol ao reduzir a densidade de espinhos dendríticos no hipocampo (Murphy & Segal, 2000). Em contraste, outros trabalhos relatam que a progesterona exerce efeitos semelhantes aos do estradiol na sinaptogênese em um modelo de AVE hipocampal e facilita tanto LTP quanto LTD no hipocampo (Foy et al., 2008; Frick et al., 2015). No conjunto, essas evidências sugerem que progesterona e estradiol podem modular efeitos neuroprotetores por meio de vias dependentes de neurotrofinas, como o BDNF (Singh & Su, 2013).

A neurogênese no giro denteado (DG) tem sido amplamente implicada em processos mnemônicos dependentes de hipocampo, como a memória espacial. De maneira geral, hormônios sexuais são potentes moduladores da neurogênese no hipocampo adulto. Em fêmeas, esses efeitos variam conforme o estágio do ciclo estral: durante o proestro, observa-se um aumento da proliferação celular no DG, e esse aumento correlaciona-se com a preferência por estratégias de aprendizado dependentes de hipocampo, embora sem necessariamente melhorar o desempenho na tarefa (Korol et al., 2004; Tanapat et al., 1999). Contudo, outro estudo relatou uma melhora de desempenho em ratos OVX tratados com estradiol (Yagi et al., 2024). Em machos, apenas os andrógenos testosterona e DHT aumentam a sobrevivência de novos neurônios, enquanto o estradiol não exerce esse efeito (Hamson et al., 2013). Embora menos estudos têm investigado contribuições de estratégias de aprendizado para os dimorfismos na discriminação contextual, é plausível supor que, dada a função crítica do DG na competição entre separação e completamento de padrões (*pattern separation* e *pattern completion* em inglês), diferenças nas taxas de proliferação, sobrevivência e migração de novos neurônios possam

influenciar a discriminação e generalização contextual. O DG projeta para áreas corticais e outras sub-regiões hipocampais envolvidas nessa competição mnemônica, modulando tanto a evocação de memórias contextualmente precisas — no caso da separação de padrões — quanto o surgimento de memórias generalizadas, via completamento de padrões baseado em dicas parciais ou ambíguas (Atucha et al., 2023; Hainmueller & Bartos, 2020; Rolls, 2013).

Dessa forma, considerando que hormônios sexuais por si só modulam a generalização de memórias aversivas, questionamos que transformações qualitativas na memória contextual sua ação pode gerar, a ponto de alterar seu curso temporal, e a forma como dependem (ou não) do hipocampo ou de áreas corticais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Considerando que existem ao menos duas formas de produção da generalização da memória aversiva — uma independente do tempo, potencialmente modulada pela presença de hormônios sexuais (Capítulos I e II), e outra dependente do tempo, resultante da reorganização neuroanatômica (Capítulo III) -, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar como machos e fêmeas intactos generalizam a memória de medo ao longo do tempo em múltiplos contextos com diferentes graus de similaridade com contexto aversivo (Capítulo I). Este trabalho foi complementado pela análise da dinâmica da discriminação contextual ao longo do tempo em machos e fêmeas gonadectomizados, com e sem reposição hormonal (Capítulo II). No terceiro capítulo, buscou-se verificar a dependência de diferentes estruturas encefálicas — hipocampo, córtex entorrinal lateral e córtex cingulado anterior — na evocação da memória em distintos contextos e intervalos pós-treino.

2.2 Capítulo I

Objetivos Específicos:

1. *Piloto de padronização dos diferentes contextos*: padronizar os contextos alternativos (B, C e D) quanto ao grau de similaridade com o contexto de condicionamento (A) em um intervalo de 2 dias (memória recente), em ratos adultos, machos e fêmeas, não-gonadectomizados;
2. *Discriminação contextual em fêmeas*: avaliar a generalização parcial ou total em diferentes intervalos treino-teste (2, 28 e 45 dias) em contextos novos (B, C ou D) com graus variados de similaridade em relação ao contexto de condicionamento (A);
3. *Discriminação contextual em machos*: avaliar a generalização parcial ou total em diferentes intervalos treino-teste (2, 28 e 45 dias) em contextos

novos (B, C ou D), com diferentes graus de similaridade em relação ao contexto de condicionamento (A).

2.3 Capítulo II

Objetivos Específicos:

1. *Replicação dos efeitos comportamentais dos hormônios sexuais sobre a discriminação contextual*: verificar o efeito da injeção aguda de hormônios sexuais 24h antes do teste em ratos machos orquiectomizados (OCX) e fêmeas ovariectomizadas (OVX) na memória de longo prazo recente (2 dias), remota (28 dias) e mais remota (45 dias), em testes realizados no contexto de condicionamento (A) ou em contexto novo (B);
2. *Efeitos comportamentais em animais sham*: avaliar o efeito da injeção aguda de hormônios sexuais em machos e fêmeas submetidos à cirurgia *sham*, sem remoção das gônadas, nos mesmos intervalos e contextos descritos acima;
3. *Participação da área hipocampal em ratos machos e fêmeas gonadectomizados com ou sem reposição hormonal*: verificar a dependência do hipocampo dorsal em animais gonadectomizados para a evocação da memória de longo prazo recente (2 dias) e sua interação com o estado hormonal.

2.4 Capítulo III

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a participação do hipocampo dorsal (dHPC) na evocação da memória nos contextos de condicionamento (A) e novo (B), por meio da infusão bilateral de muscimol ou veículo 15 minutos antes do teste realizado 2 ou 28 dias após o treino;

2. Avaliar a participação do córtex entorrinal lateral (LEC) na evocação da memória nos contextos A, B ou C, por meio da infusão bilateral de muscimol ou veículo antes dos testes realizados 2, 28 ou 45 dias após o treino;
3. Avaliar a participação do hipocampo ventral (vHPC) na evocação da memória no contexto A por infusão bilateral de muscimol ou veículo 15 minutos antes do teste realizado 2 ou 28 dias após o treino;
4. Avaliar a participação do córtex cingulado anterior (ACC) na evocação da memória no contexto A, mediante infusão bilateral de muscimol ou veículo 15 minutos antes do teste realizado 2 ou 28 dias após o treino.

3. Hipótese Central

A hipótese central deste trabalho é a de que duas formas distintas de indução de generalização da memória de medo estudadas - (i) um dependente do tempo, que se intensifica paralelamente ao processo de consolidação sistêmica e (ii) outra independente do tempo, mediada pela ação dos hormônios sexuais – apesar do mesmo desfecho comportamental, possuem mecanismos subjacentes significativamente distintos, incluindo sua capacidade de discriminação contextual, seus perfis temporais e estruturas encefálicas recrutadas. Considerando-se que machos e fêmeas podem apresentar distintas dinâmicas nesses processos, propõe-se que a expressão da memória generalizada seja diferencialmente modulada pelos distintos hormônios sexuais.

3.1 Hipótese Geral – Capítulo I

Vários estudos sobre a discriminação contextual tendem a variar poucos elementos isolados do contexto (por exemplo, a textura do assoalho), para configurar um contexto novo. Partimos do pressuposto de que um contexto – principalmente em condições naturais – constitui um conjunto integrado e variado de atributos multissensoriais, convergentes, porém distinguíveis entre si. Assim, propomos que é possível estabelecer um gradiente de generalização utilizando contextos com diferentes graus de similaridade em relação ao contexto de treino variando atributos sensoriais. Especificamente, hipotetizamos que a generalização da memória de medo aumenta com o tempo, de modo dependente de determinados parâmetros contextuais, e que existem diferenças significativas entre os sexos nessa dinâmica.

3.2 Hipótese Geral – Capítulo II

Após verificar diferenças sexuais e temporais na generalização da memória em múltiplos contextos, a hipótese subsequente é que a dinâmica temporal da generalização do medo pode ser modulada pelos hormônios gonadais.

Propomos que a administração exógena desses hormônios em animais gonadectomizados produzirá efeitos distintos sobre a generalização, dependendo do sexo biológico.

3.3 Hipótese Geral – Capítulo III

Com base em dados prévios de nosso laboratório e de outros grupos, que caracterizaram o perfil temporal da consolidação sistêmica, nossa hipótese é que distintas regiões corticais exibem perfis temporais específicos, em função de suas conexões e funções particulares. Adicionalmente, considerando evidências de dimorfismos sexuais comportamentais em ratos adolescentes, propomos que a janela temporal da consolidação sistêmica e o recrutamento de regiões cerebrais específicas podem diferir entre machos e fêmeas jovens adultos.

4. Capítulo I

Artigo científico publicado em 2025 na revista *Learning and Memory Vol. 32, Nos. 5–6*: “**Multiple context discrimination in adult rats: sex variability and dynamics of time-dependent generalization of an aversive memory**”.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Research Paper

Multiple context discrimination in adult rats: sex variability and dynamics of time-dependent generalization of an aversive memory

Fernanda Nogueira Lotz,[1,2] Kétlyn Talise Knak Guerra,[1,2] Ana Paula Crestani,[3] and Jorge Alberto Quillfeldt[1,2,4]

[1]*Psychobiology and Neurocomputation Laboratory, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 91.501-970, Brazil;* [2]*Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 90.035-003, Brazil;* [3]*Department of Psychology, University of California Davis, Davis, California 95616, USA;* [4]*Brazilian Network of Memory Investigation (ReBraEM), Brazil*

Memory generalization involves the transfer of conditioned fear responses to novel contexts, a phenomenon observed in systems consolidation, whereby a time-dependent reduction in discrimination precision occurs due to the reorganization of brain regions supporting memory retrieval. To understand the fine temporal structure of this process across sexes, young adult female and male rats were trained in contextual fear conditioning and tested in the same or one of three distinct novel contexts at 2, 28, or 45 days post-training. Neutral contexts were designed to allow graded levels of fear expression relative to the training context, and sex differences were evident at the recent memory test. This pattern, however, disappeared over time due to partial generalization, with fear converging into similar, higher values, grouped into two levels for both sexes. In all experiments, females were better discriminators and displayed lower fear responses than males, apparently prioritizing different sensory modalities, with multivariate analysis suggesting that chamber size was salient for females and floor texture for males. This study is the first to compare fear responses between adult female and male rats across multiple neutral contexts and time points revealing several dimorphic findings.

[Supplemental material is available for this article.]

The ability to store and retrieve information is a highly adaptive, evolutionarily conserved trait in animals, and in many situations the ability to predict the safety or threat of future events overcomes the capacity to retain more precise memories of past events, which is understood as an adaptive advantage (Suddendorf 2006; Asok et al. 2019b). This is especially true of fear memories in which the generalization of threat cues allows animals to increase their survival through the transference of learned behaviors to these new and potentially dangerous environments or situations based on similar cues (Young 2012; Bergstrom 2020).

Mammalian brains appear to have evolved to alternate between discrimination and generalization when encountering novel situations. However, the exact boundary conditions that determine whether a slightly distinct context triggers one outcome or the other are not completely understood. To what extent feature detection relies on a specific sensory modality, or a combination of modalities, remains unclear, and it can be difficult to isolate which elements—e.g., floor texture, wall shape, chamber size, room, size, chamber shape, or cleaning agent scent—actually support graded levels of contextual discrimination, enabling measurable, statistically significant increments/decrements in responses, resembling, for instance, a "staircase" pattern (Burn 2008; Huckleberry et al. 2016; Wotjak 2019; Giachero et al. 2024).

While aversive memory generalization can be of adaptive value, overgeneralization—an exaggerated fear response to neutral cues or contexts—can have maladaptive consequences, such as restricting important resource-seeking behaviors or even inducing mental disorders as seen in humans. Therefore, to maximize the possibility of survival and successful offspring rearing, there has to be an optimal balance between threat avoidance and safety perception. This form of fear discrimination can also be understood as learned fear inhibition in the presence of safety signals, whereas generalization may arise from impaired safety signaling (Day and Stevenson 2020).

In humans, excessive fear generalization is a hallmark of anxiety and trauma-related disorders such as posttraumatic stress disorder (PTSD) and generalized anxiety disorder (GAD), with women being at disproportionately higher risk of developing these conditions (McLean et al. 2011; Lissek and Grillon 2012; Besnard and Sahay 2016; Jasnow et al. 2017; Keiser et al. 2017), suggesting an involvement of sex steroids in this process. While different behavioral phenotypes are nothing new, only recently has there been an increase in the awareness of the importance of symmetrically including subjects of both sexes in preclinical and clinical studies to avoid overlooking important differences (e.g., NIH Policy on Sex as a Biological Variable, 2016).

Despite the fact that sex hormones are known to interfere with spatial, social, and fear memory formation (Taxier et al.

Corresponding author: fernandanlalves@gmail.com
Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISSN 1549-5485/25
Article is online at http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.054081.124.

© 2025 Lotz et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first 12 months after the full-issue publication date (see http://learnmem.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

2020), discrimination/generalization studies have produced mixed results, with some showing females generalizing before males (Lynch et al. 2013, 2014), while others indicating the exact opposite (Foilb et al. 2018; Crestani et al. 2022), or simply finding no difference between sexes (Reppucci et al. 2013; Keeley et al. 2015; Clark et al. 2019). This underscores the importance of elucidating the experimental parameters and contextual configurations that could explain contradictory findings, i.e., knowing the extent to which these might rely on sex differences and/or sensory modality, and how this allows a graded discriminatory response. In other words, knowing how specific cues present in a neutral, supposedly safe context, can trigger the aversive memory, either partially or completely, and to which extent cues signaling safety can effectively induce learned fear inhibition (Asok et al. 2019a), or whether they only undergo time-dependent generalization.

In rodents, the retrieval of an aversive contextual memory depends, initially, on the hippocampus, but, with time, becomes more reliant on neocortical structures, a process known as *Systems Consolidation* (Dudai 1996; Haubrich et al. 2016). Evidence suggests this process develops in two interrelated dimensions—a gradual neuroanatomical reorganization, and a progressive loss of the ability to discriminate between contexts, in which animals display, for instance, fear in contexts not previously paired with the aversive stimulus (Rudy 2009; Wiltgen et al. 2010; De Oliveira Alvares et al. 2012; Cullen et al. 2015; Quillfeldt 2019), a contextual memory generalization that progresses with the increasing interval between training/conditioning and test (Wiltgen and Silva 2007).

In this work, we trained young adult female and male rats in the contextual fear conditioning task and tested them 2, 28, or 45 days later, either in the conditioning context (A) or in any of three novel/neutral contexts aiming to obtain graded responses according to the different degrees of similarity in relation to the training context. To our knowledge, no previous study has compared fear responses between adult female and male rats in *multiple neutral contexts,* both in recent and remote test sessions.

Results

Pilot study

Subjects of both sexes were fear conditioned to context A, and, 2 days later, retrieval tests were performed in the same or in an alternative set of neutral contexts (P1, P2, P3, and P1′, Fig. 1A), sorted according to distinct intuitive criteria—at first, mostly defined by chamber shape and floor texture (see Supplemental Material for a more detailed discussion on this point).

Independent two-way ANOVA of female and male rats tested in one of a new set of four contexts (Supplemental Fig. S1B) plus a version of P1 without wood shavings on the floor (Context P1′) revealed significant effects of Context × Sex Interaction ($F_{(4,\ 86)}$ = 3.059; P = 0.0208, ω^2 = 0.08), Context ($F_{(4,\ 86)}$ = 16.44; P < 0.0001, ω^2 = 0.39), and Sex ($F_{(1,\ 86)}$ = 30.62; P < 0.0001, ω^2 = 0.24) (Fig. 1B): according to the ω^2, all detected effects were large and robust. Number of subjects per context (A, P1, P2, P3, and P1′), respectively: females, 8, 15, 9, 9, 10 and males, 9, 10, 10, and 7.

In females (Fig. 1B), Tukey post hoc test revealed significant differences between groups tested in the conditioning context A and all novel contexts (Ps < 0.0001) with large effect sizes (respectively, A × P1, g = 1.896; A × P2, g = 4.55; A × P3, g = 3.848; A × P1′, g = 2.069), though freezing levels did not differ significantly between the novel contexts P1, P2, P3, and P1′ (Ps > 0.90, see Supplemental Table S1). For males (also Fig. 1B), Tukey post hoc test showed groups differed significantly between Context A and novel contexts P2 (P < 0.0001, g = 2.49) and P3 (P < 0.0001, g = 2.962), but not between A and P1 (P = 0.98), A and P1′ (P = 0.57), or P1 and P1′ (P = 0.90). Also, context P1 differed from P2 (P = 0.0011, g = 1.727) and P3 (P = 0.0021, g = 1.872). Male and female groups did not differ in freezing levels in the conditioning context A (P > 0.99), context P2 (P = 0.324), P3 (P = 0.675), and P1′ (P = 0.12), but females displayed less freezing than males in context P1 (P < 0.0001, g = 1.656) (Fig. 1C).

To estimate the degree of discrimination, we plotted the individual and average *Z*-scores for every neutral context (P1, P2, P3, or P1′). For females, all data points have significantly lower values compared to A, showing that females were better discriminators across all the novel contexts compared to males (Fig. 1D). Also different from males, females were able to discriminate between the conditioning context and P1 (and its modified version P1′), while males displayed high levels of fear in these contexts.

Main experiment

Subjects of both sexes were fear conditioned to context A, and 2, 28, or 45 days later, different groups were submitted to retrieval tests in this or three other neutral contexts (B, C, and D, Fig. 2A), also sorted according to distinct intuitive criteria (see Discussion and Supplemental Material for a more detailed discussion).

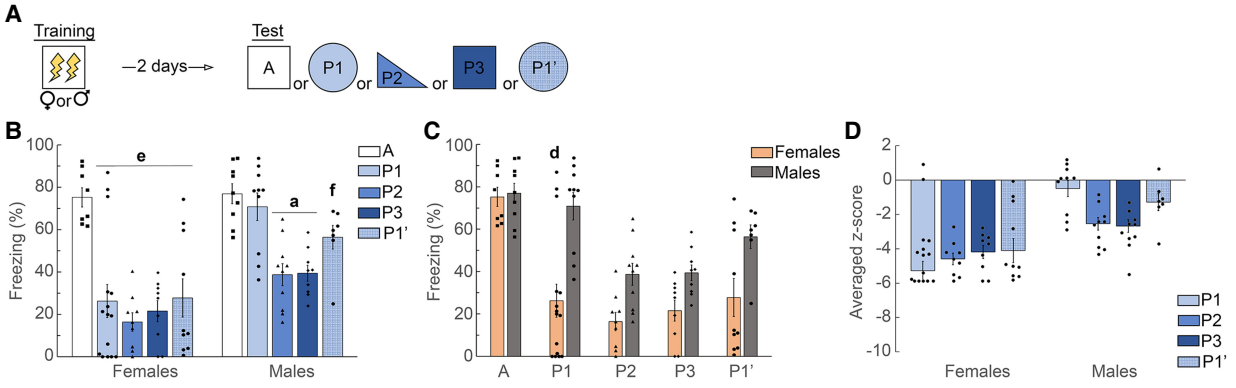


Figure 1. Contextual discrimination of female and male rats trained in a fear conditioning task and tested 2 days later. (*A*) Experimental protocol: all subjects were trained in Context A and subsequently tested either in A, P1, P2, P3, or P1′ 2 days after training (P1′ being a slight modification of context P1). (*B*) Histogram showing mean ± SEM of the % freezing time in each context grouped by sex, with individual dots overlaid representing individual animals. (*C*) Same data (and statistical analysis) grouped by context. (*B,C*) Data analyzed by independent two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test: **a** (different from A/P1), P < 0.0055; **f** (different from P2/P3), P < 0.032; **d** (females differ from males tested in the same context), P < 0.0001; and **e** (all groups differ from A), P < 0.0001. (*D*) Individual (and the average) *Z*-scores for contexts P1, P2, P3, and P1′ (standard deviations, all compared to A).

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

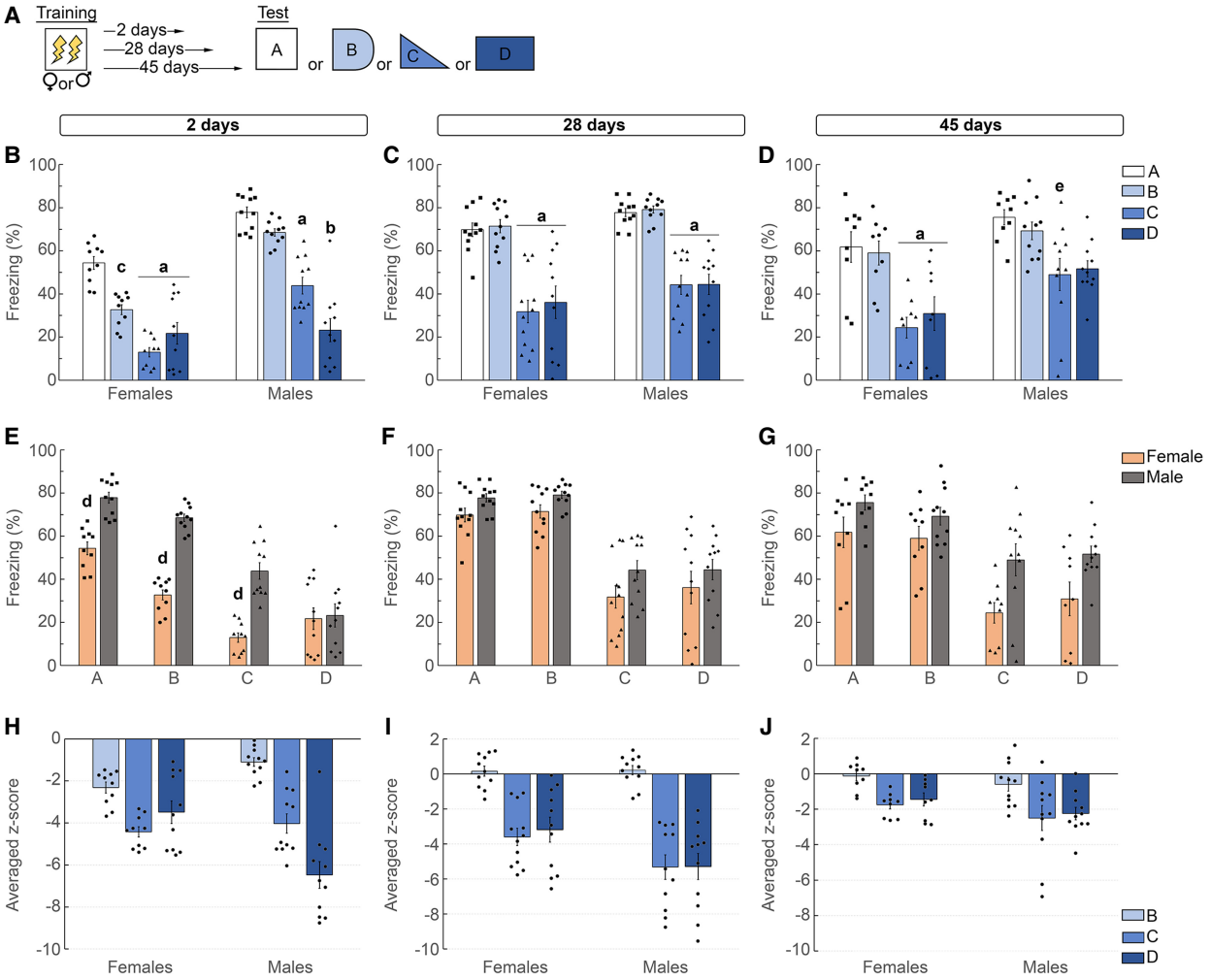


Figure 2. Context discrimination of female and male rats 2, 28, or 45 days after training in a fear conditioning task. (*A*) Experimental protocol: all subjects were trained in Context A and subsequently tested either in A, B, C, or D 2, 28, or 45 days later. (*B–D*) Histograms showing mean ± SEM of the % freezing time in each context grouped by sex with individual dots overlaid representing individual animals. (*E–G*) Same data (and statistical analysis) grouped by context. (*B–G*) Data analyzed by independent two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. **a** (different from A/B), $P<0.015$; **b** (differs from same sex groups tested in all other contexts), $P<0.002$; **c** (different from A), $P=0.002$; **d** (females differ from males in this specific context E), $P<0.0005$; and **e** (different from A), $P=0.03$. (*H–J*) Individual (and average) *Z*-scores for contexts B, C, and D (standard deviations compared to A).

When animals were tested 2 days after training in one of four distinct contexts (Supplemental Fig. S1A), independent two-way ANOVA revealed significant effects in the interaction between Context × Sex ($F_{(3,\ 77)}=9.182$; $P<0.0001$, with effect size $\omega^2=0.22$), Context ($F_{(3,\ 77)}=63.92$; $P<0.0001$, $\omega^2=0.699$), and Sex ($F_{(1,\ 77)}=82.17$; $P<0.0001$, $\omega^2=0.49$) (Fig. 2B,E,H): according to the ω^2, all detected effects were large and robust. Number of subjects per context (A, B, C and D respectively): females, 10, 10, 10, 11, males, 11, 11, 11, 11. In females, Tukey Multiple Comparisons post hoc test revealed different freezing levels in contexts A and B ($P=0.002$, $g=2.256$), but not between contexts C and D ($P=0.67$); in males, there are significant differences between A and C ($P<0.0001$, $g=3.132$) and A and D ($P<0.0001$, $g=3.923$), B and C ($P=0.0001$, $g=2.483$) and C and D ($P=0.002$, $g=1.331$), but not between A and B ($P=0.572$) (Fig. 2B and see Supplemental Table S1).

For rats tested at 28 days in one of four distinct contexts, independent two-way ANOVA revealed no significant effect in the interaction between Context × Sex ($F_{(3,\ 81)}=0.132$; $P=0.94$), while Context ($F_{(3,\ 81)}=43.81$; $P<0.0001$, $\omega^2=0.62$) and Sex ($F_{(1,\ 81)}=8.65$; $P<0.0043$, $\omega^2=0.09$) differ significantly (Fig. 2C,F,I): according to the ω^2, effect size was just moderate to large for Sex, while for Context they were large and robust. Number of subjects per context (A, B, C, and D, respectively): females, 11, 11, 12, 11, and males, 11, 11, 11, 11. For both females and males, Tukey Multiple Comparisons post hoc test revealed similar freezing levels in all contexts, with no differences observed between contexts A and B ($P>0.99$) and between C and D ($P>0.99$) (Fig. 2C and see Supplemental Table S1).

Finally, for animals tested 45 days after training, independent two-way ANOVA revealed no significant effect in the interaction between Context × Sex ($F_{(3,\ 70)}=0.6543$; $P=0.583$), while Context ($F_{(3,70)}=15.52$; $P<0.0001$, $\omega^2=0.36$) and of Sex ($F_{(1,\ 70)}=18.27$; $P<0.0001$, $\omega^2=0.18$) differ significantly (Fig. 2D,G,J): according to the ω^2, all detected effects were large and robust. Number of subjects per context (A, B, C, and D, respectively): females, 9, 9, 9, 9, and males, 9, 11, 11, 11. Tukey Multiple Comparisons post hoc test revealed that females maintained a profile similar to that of 28 days, with no significant differences between A and B ($P>0.99$) or C and D ($P=0.99$), while males keep discriminating

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

between contexts A and C ($P = 0.029$, $g = 1.348$), but not between A and D ($P = 0.07$). Also, when compared in the same context, there were no differences between males and females ($P > 0.05$ for all comparisons, see Supplemental Table S1) (Fig. 2D).

To estimate the degree of discrimination, we plotted the individual and average *Z*-scores for every neutral context (B, C, or D) compared to the conditioning context A. For rats tested at 2 days (Fig. 2H), all data points have lower values compared to A, and they differ among them, except for context C, that seems to be equally well discriminated by both sexes. Importantly, the salient "staircase effect" in the degree of discrimination of the males was a sorting pattern not followed by the females in these contexts. For animals tested at 28 days (Fig. 2I), the main effect was the dramatic response to context B—now indistinguishable from A—for both females and males, while contexts C and D converged to a similar degree of discrimination: in sum, females appear to better discriminate these contexts than males. The same convergence of responses (% freezing level) between contexts B and A observed at 28 days persisted at 45 days (Fig. 2J). Discrimination of contexts C and D in males, however, was much less evident now, suggesting that, at this time point, all neutral contexts tended to evoke a fear response similar to A, with average *Z*-scores falling within −0.6 and −2.5 standard deviations for males, and −0.131 and −1.760 for females.

Discussion

We initially selected multiple novel contexts based on intuitive criteria, with the goal of obtaining graded levels of fear expression, i.e., each one a statistically significant reduction in the freezing levels in relation to the conditioning context. Then, we observed and quantified eventual changes in freezings over time to investigate the fine temporal structure of systems consolidation in rats of both sexes. This phenomenon is characterized by a time-dependent fear increase in novel contexts, usually interpreted as memory generalization. With this experimental setup, we aimed to verify how generalization to distinct contexts evolves over time in females and males, either continuous or discontinuously.

There is no clear definition regarding which components of a behavioral context are preferred by rodents, and even less is known about preferences in relation to the subject's sex (Burn 2008; Huckleberry et al. 2016; Wotjak 2019; Giachero et al. 2024). In planning our *graduated contexts*, instead of simply varying one or two sensory criteria, as usually done (Shepard 1987; Young 2012), we tried an intuitive, naturalistic *approach* that respected the multidimensional nature of the task, since discrimination between contexts involves the integration of several sensory modalities simultaneously. Supplemental Figure S1 summarizes several of these parameters in the selected contexts, and while clearly not an exhaustive list, it aims to capture the more salient sensory modalities—such as olfactory, tactile, or visual features.

Sorting of multiple contexts: recent memory versus sex

As mentioned above, we attempted to obtain graded responses with a first set of neutral contexts—P1, P2, P3, and P1′—but were not very successful (Fig. 1B). There was a noticeable difference between sexes, with females discriminating context P1 from A, while males did not. This was surprising because P1 looked, intuitively, to be the least similar context to the conditioning one. Since context P1 had wood chips spread on its smooth floor, we suspected this could have acted as a reminder of their home cage (in which it is used as bedding), somehow signaling safety in an otherwise very different environment—or even acting as a distractor. Therefore, we tested the animals in a cleaner variant, P1′, devoid of wood chips, but the freezing response of males remained higher to this context, while females had, again, lower levels, discriminating it from A just as they had with P1. In sum, females appear to be better discriminators than males at least for recent memory, distinguishing each of the four neutral contexts used in the pilot study equally well, all exhibiting a significantly lower freezing compared to the fear response in the conditioning context A. This dimorphic behavioral response suggests each sex prioritizes different parameters in distinct ways.

It is possible that the abnormally higher fear response of males in such dissimilar contexts P1/P1′ just 2 days after training might be due to a novelty-induced effect (Maren 2014; Greggor et al. 2015). We did not pursue this avenue of investigation, but in order to avoid this kind of interference in recent memory and verify which contextual features might endure across a time-dependent generalization, a different set of neutral contexts was chosen for the main experiment (B, C, and D—see Supplemental Fig. S1A) in order to compare female and male fear responses at different training-test intervals.

These contexts, despite also intuitively sorted based mainly on chamber size and cleaning agent scent, allowed us to obtain a clear series of decreasing freezing values in males (Fig. 2B, right panel). Females, however, displayed a completely different pattern of fear expression, evincing again a difference between sexes (Fig. 2B, left panel). We intentionally pursued the "staircase-like" aspect observed in male freezings in contexts A, B, C, and D, but females also displayed a graduated set of responses, only in a different order —A, B, D, and C—and with distinct statistical robustness. Females and males definitely exhibit distinct behavioral responses when exposed to multiple contexts.

Using the above protocol, with this selection of contexts, high levels of freezing were obtained in the conditioning context A in all training-test intervals, indicating *good acquisition (learning) and retention* of the aversive experience (Fig. 2B–D).

Of note, 2 days after training, males were definitely *not able to distinguish* context B from A, while females displayed a statistically significant lower freezing level in B compared to A (**c** in Fig. 2B and **d** in 2E). This sex asymmetry is no longer observed at 28 days, when B becomes indistinguishable from A for both females and males (Fig. 2C,F), persevering up to 45 days (Fig. 2D,G). A study by Huckleberry et al. (2016) using male mice tested how different sensory modalities—scent, floor texture, or chamber roof shape, or a combination of all three—influenced the generalization of fear to a novel, modified version of the conditioning context. They found that floor texture and scent were more salient than predominantly visual cues (roof) to produce a higher fear response in the novel context. Despite having some control upon context design, this work only covers recent memory (1–2 days), but the main problem is that it was done in mice (and males only), and several behavioral differences are known to exist between these species.

In our recent memory test, context B is a modified version of the original conditioning chamber A, with the grid covered by a smooth linoleum floor, a curved wall added inside the chamber and cleaned with the same solution as in A (ethanol). Nevertheless, based on how males reacted, we cannot discard the possibility that, for them, the same odor from the original training context A was inadvertently detected in B (reinforced by the fact that the same cleaning agent—ethanol—was used in A and B), notwithstanding the other modified parameters (inner chamber shape and floor texture). The higher fear response of male rats could be due to the *transference* of enough aversive information from A to B. However, if this is true, considering that females were able to adequately discriminate between these contexts, suggest that males, somehow, value olfactory cues more than females, at least when testing recent memory. This is consistent with several studies that show the prominence of olfactory threat signals in rodent life (Takahashi et al. 2005; Canteras et al. 2008; Grella et al. 2020).

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Another noticeable fact is that, in the main experiment recent memory test, females express *a lower maximum freezing level* compared to males not only in context A, but also in B and C (Fig. 2B), but not in D—the least similar, in our view (Fig. 2E and Supplemental Fig. S1), pointing again to a superior discriminative capacity of young adult females relative to males, a general difference in fear expression that could be considered another sexual dimorphism if not for the fact that in the Pilot experiment this difference was not observed (Fig. 1B), possibly due to seasonal variability of rat behavior over a span of months. Nonetheless, lower fear in females compared to males is consistent with some studies comparing conditioned fear between sexes (Colon et al. 2018; Morena et al. 2021; Trott et al. 2022b; Soares et al. 2024; Vazquez et al. 2024), but might differ from other findings using a distinct aversive task (Lynch et al. 2013).

Figure 3, below, schematically summarizes most of the similarities and differences of fear responses between the Pilot study and the Main experiment in multiple contexts 2 days after training.

Time-dependent partial or complete generalization of remote fear memories

In murine fear conditioning models, the most frequent indicator of poor context discrimination is the expression of freezing in neutral contexts in levels close to that of the conditioning one. This aligns well with the definition of generalization as the "transference of conditioned responding to stimuli that perceptually differ from the original one" (Bergstrom 2020), but does not provide enough information on *how much* "conditioned responding" is actually necessary. Over time, our results show at least two degrees of generalized response, one nearly complete, and the other, partial (see Fig. 2C,D): while contexts A and B become statistically indistinguishable from 28 days onward—a case of *full* or *complete* generalization—contexts C and D show statistically significant differences from the conditioning context A (and B) at 28 days for both sexes and at 45 days for females (males do not distinguish D from A at 45 days), and from their previous values, at 2 days, which implies *generalization* to an intermediate degree. However, what could account for the *partial* increase in fear response? Poorer context recognition? True lower fear? Forgetting? A trade-off strategy between pursuing rewards and avoiding harm? There might be different explanations, some even mutually exclusive, but discussions on subtypes of generalization are rarely found in the literature (but see Shepard 1987; Pearce and Bouton 2001; Kehoe 2008; Young 2012). Therefore, to ensure the phenomenon is accurately represented, why not refer to it as what it appears to be, a *partial* generalization (or perhaps *undergeneralization*, or even *subgeneralization*)? Thus, assaying multiple, graded neutral contexts may be a useful approach to quantify distinct levels of generalization.

The main experiment consisted of investigating how discrimination of each context A, B, C, and D (Supplemental Fig. S2) evolves over time for both sexes, testing two instances of remote memory compared to a recent memory performance. What we observed was that 28 and 45 days after training, animals of both sexes expressed similar freezing values, grouped in two levels. At 28 days, discrimination of contexts C and D converged to a similar level—of ~50% fear expression—significantly lower (statistically) than the response to A and B (Fig. 2C). The grouping of contexts C and D versus A and B effectively disrupted the multilevel pattern observed in the recent memory test, and in particular, dismantled the "staircase-like" effect more explicitly exhibited by males at 2 days (ABCD), but also by females in another order (ABDC—Fig. 2B). This new pattern persisted until 45 days, with a slight performance increase in context D in males (Fig. 2D,G). Importantly, all novel contexts displayed a statistically significant increase in freezing levels at the remote tests compared to the test at 2 days, which demonstrates the partial time-dependent contextual generalization process described above.

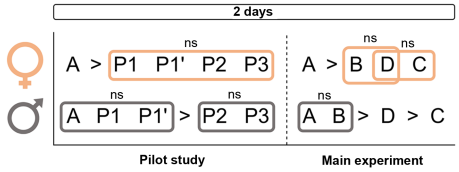


Figure 3. Graphic summary of the behavioral response of females and males to each context in both experiments (recent memory only). All subjects were equally trained in Context A (3 min habituation plus two 0.5 mA/2 sec footshocks within 30 sec intervals) and, 2 days later, tested either in A, P1, P2, P3, or P1′ or in A, B, C, or D (Main Experiment). (> or <) Statistically significant difference; (ns) nonsignificant difference.

The persistence of the partial generalization in contexts C and D from 28 to 45 days suggests a discontinuous progression, but to shed more light on this it would be necessary to examine much older remote memories than those explored in the present experiments in order to verify if C and D converge asymptotically to the same level of freezing in A and B (i.e., a full generalization). But considering that forgetting would also be expected to increase and counterweigh the variable being measured (% freezing), this seems less probable. For now, for females at least, with the contexts we used, there was no indication that, over time, fear generalization exhibited any type of continuous increment, much less increasing until reaching the conditioning context performance level. For males, we observed statistically equivalent levels between freezing in contexts A and D at 45 days, but the same cannot be said for context C.

Multiple instances of dimorphism

Our experiments, using two sets of multiple contexts allowed the detection of a wide variety of behavioral responses, evincing some instances of sexual dimorphism (see Table 1). Young adult rats exhibited a diversity of sex- and time-dependent fear responses in contexts sorted according to multisensory criteria (tactile, visual, olfactory, or their combinations), displaying at least two kinds of time-dependent transitions from precise to generalized fear memory. The diversity of responses, coupled with the challenge of accurately defining truly graded contexts, may help explain the pervasive difficulties encountered by researchers in identifying suitable neutral contexts when planning experimental setups to investigate memory generalization (Rosas and Alonso 1997; De Oliveira Alvares et al. 2012; Bouton et al. 2021; Giachero et al. 2024). Any specific animal preference, including sexual differences, should be added to a much-needed list of *Systems Consolidation Boundary Conditions* (SCBC).

Table 1 summarizes these dimorphic findings, most of which may (or may not) share a common cause, the investigation of which was beyond the scope of this study.

Memory generalization or something else?

As Shepard (1987) explains, "generalization is thus a cognitive act, not merely a failure of sensory discrimination" that amounts to "inferring if an object or context belongs or not to what may be considered 'a consequential region,' " i.e., a safety "region in an individual's psychological space." The kind of fear generalization we try to evince here is specifically the time-dependent loss of trace precision characteristic of Systems Consolidation, i.e., the transference, with time, of a conditioned memory to novel contexts (Young 2012; Bergstrom 2020), but since our quantifiable variable is the fear response itself, we must consider that different processes

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Table 1. Summary of dimorphic and nondimorphic behaviors observed in the pilot study and main experiment

Dimorphic findings		
Experiment	**Females**	**Males**
Pilot	Discriminate P1/1′ < A	P1/1′ = A, due to higher fear in P1/1′
Main	ABDC graded fear pattern different from males at 2 days	ABCD graded fear at 2 days
Main	Discriminate B from A at 2 days	B equals A at 2 days
Main	From discriminating A × B at 2 days to full generalization at 28/45 days	B equals A at every test time interval
Main	D = C < B < A (sign. differences)	D < C < B = A (sign. differences)
Main	Possible fear incubation in A from 2 to 28 days	Unable to observe fear incubation due to ceiling effect
Main	Partial generalization in D at 45 days	Full generalization in D at 45 days
Main	No *flight* behavior observed	*Flight* behavior (jumps) observed
Main	Do not discriminate floor texture at any time but seem to distinguish chambers by size at 2 and 28 days (PCA result)	Do not discriminate floor texture at 2 days and chamber size at 2 and 28 days, but tend to reverse this with time (PCA result)
Pilot and Main	Pilot study: freezing in A *similar* to males at 2 days Main study; lower freezing in A at 2 days than at 28/45 days	Maximum freezing level in A at every test interval (with ceiling effect)
Pilot and Main	Better discriminators (lower fear to neutral contexts)	Poorer discriminators

Nondimorphic findings	
Experiment	**Both sexes**
Main	No sexual dimorphism is observed in three parameters—wall geometry, test session room, and cleaning agent scent (PCA result)
Main	Ethanol is the dominant, most distinguishable scent at all times. Other cleaning agent scents tend to cluster according to sex at 45 days (PCA result)

Both sexes	**Recent memory**	**Remote memory**
Exhibit good memory acquisition (learning) and retention—with no deficit in consolidation (Fig. 2B,E)	X	X
Generalize partially or completely in one discrete step		X
Converge to similar grouped levels of fear expression over time		X
Do not display significant forgetting		X
Do not exhibit darting behavior (but males jump/flight occasionally in some contexts)	X	X

could explain the observed change. Our data allow to discard at least two confounding factors, *forgetting* of the aversive experience and *fear incubation*.

It is well established that high emotional arousal such as that elicited in fear-driven tasks is important to consolidate long-lasting memories, while less emotionally charged memories tend to decay more easily with time. Here however, freezing performance in the conditioning context remained high for both sexes—over 60% of the session duration—up to 45 days post-training (see Fig. 2D,G), confirming that the amount of forgetting over time, if any, can be considered negligible.

In novel contexts, however, the specific contribution of forgetting to the retrieval of fear memories can be difficult to distinguish from a true generalization process. For instance, memory for contextual cues signaling safety might undergo gradual decay with time and give way to other threat signals that become more salient, e.g., the tactile perception of a metal grid floor similar to the one in which footshocks were delivered. One theory proposes that the main cause of generalization is *forgetting* of the stimulus attributes (Riccio et al. 1992), but there might be other explanations, such as *associative novelty-induced fear* (Kumaran and Maguire 2006; Maren 2014), *neophobia* (Greggor et al. 2015), or even—among the factors raised to explain avoidance generalization in PTSD animal models—*nonassociative novelty-induced fear*, a kind of sensitization (Pamplona et al. 2011). With the exception of forgetting, none of these additional possibilities were directly examined here. However, as males in the Pilot study expressed high levels of fear to P1 (and its variant, P1′), deemed the least similar to A, the possibility of this resulting from a novelty-induced effect motivated us to substitute the contexts of the Pilot study for another set.

Another important confounding factor would be *fear incubation*, in which fear responses incubate, i.e., increase over time (Pickens et al. 2009; Poulos et al. 2016). While the involvement of this effect in novel contexts remains an open question, some studies suggest that high levels of fear may be due, at least in part, to this phenomenon in association with retrieval error and the flattening of the generalization curve (Rosas and Alonso 1997; Poulos et al. 2016).

The dividing line between fear generalization (FG) and fear incubation (FI) remains unclear, and experimental evidence that effectively distinguish the two is scarce in the literature. We submit an operational procedure to solve this problem in the case of contextual fear conditioning: *when a time-dependent fear increase takes place only in the conditioning context,* it could be considered FI, while if the increase occurs only *in the neutral context(s)*, it could be considered a bona fide case(s) of FG (Wiltgen and Silva 2007; Poulos

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

et al. 2016). Of course, to ascertain this, the % freezing level in the conditioning context must *not be at a ceiling level* (see Quillfeldt 2018); otherwise, we would not be able to observe FI. In our study, males displayed much higher levels of freezing than females in A in all training-test intervals—which prevented us from confirming FI (Supplemental Fig. S2B), while females, tested in the conditioning context A, showed a substantial increase in % freezing from day 2 to day 28, which then remained stable up to 45 days (Supplemental Fig. S2A). This suggests that, differently from males, females might exhibit some degree of fear incubation which points to another instance of dimorphism.

Notably, in females, the increase of fear in B was even steeper than in A (Supplemental Fig. S2A), suggesting the interesting possibility that incubated fear might itself be generalized to neutral contexts depending on the degree of similarity to the conditioning one: generalization could be, to some extent, the "transference" of FI from the conditioning to the neutral context(s), resulting in a response indistinguishable from pure generalization as it becomes diluted by the overall increase of fear expression. This level of synergism would demand a distinct experimental setup in order to be more clearly dissected, which is not possible with our data. This was, however, outside the scope of the present study. One last point to consider is that our experimental protocol is quite mild in terms of aversiveness—at least compared to the most reliable known protocols of FI induction, which usually involve extensive training combined with multiple, high-intensity CS (Pickens et al. 2009), so perhaps FI is not to be really expected here.

Stress, fear, and the limits of freezing response as a measure

One additional factor that may play into sex differences in fear memory generalization is stress, since females can have heightened sensitivity to stress hormones compared to males (Daviu et al. 2014; Bangasser and Wicks 2017). Stress hormones are important modulators of memory generalization and can increase the intensity or accelerate the natural time course of memory generalization (Pedraza et al. 2016; Dos Santos Corrêa et al. 2019). Previous unpublished results from our laboratory compared adult females who had undergone several days of previous handling with those who simply remained in their home cages (Fig. 4A). Handled rats displayed significantly less fear when tested in the contextual fear conditioning 2 days after training compared to nonhandled subjects (Fig. 4B), despite not differing in anxiety behavior in the elevated plus-maze (Fig. 4C), suggesting that frequent handling increased resilience to fear in these females, while having no effect on anxiety.

In the CFC task, metal grid floors may be threat predictors, becoming more salient with time and facilitating fear generalization to neutral contexts (Huckleberry et al. 2016). Therefore, when testing a novel context D with a grid floor very similar to the one in the conditioning context A, males displayed significantly less fear in context D at 2 days (average 23% of session duration spent freezing), and a sizeable increase at 28 and 45 days, a clear time-dependent generalization for this context (average 52% of session time at 45 days, Supplemental Fig. S2B). Conversely, females displayed similar freezing levels to males in context D at 2 days (average 22% of session time spent freezing) but showed less fear than their male counterparts when tested at 45 days (average 31% of session time, Supplemental Fig. S2A), even though freezing levels between males and females in the conditioning context did not differ significantly at this remote time point, indicating both sexes learned and retrieved the task equally well (Supplemental Fig. S2C). Taken together, these results suggest that while this salient aversive contextual cue (the grid) became progressively generalized to a novel context, other background features signaling safety for males might have become less salient, and counteracted the fear response, while the female group on average still perceived the context in its entirety as relatively safe.

There are pitfalls in comparing fear responses, between females and males based solely on observable behavioral differences. The CFC task is an inescapable, classical conditioning task, and even in auditory (tone) fear conditioning, subjects cannot escape the aversive context and may tend to express a more passive response, such as freezing in response to threat, rather than engaging in more active escape mechanisms such as flight or fight (Trott et al. 2022a) For instance, it is known that females are more prone

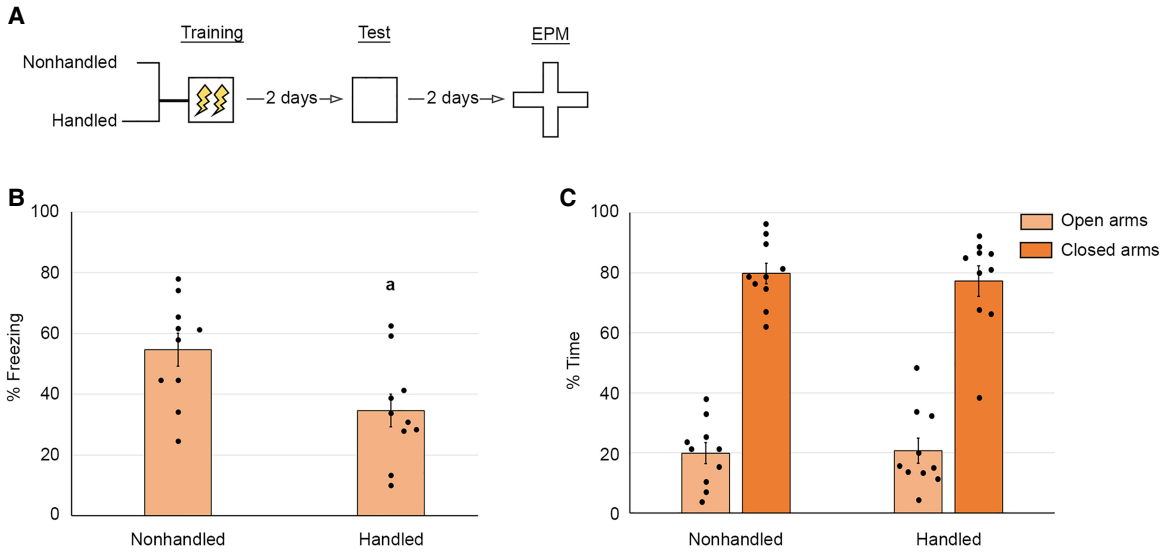


Figure 4. Comparison of conditioned fear and anxiety behavior in previously handled versus nonhandled young adult female rats. (*A*) Experimental protocol. (*B*) Histogram showing mean ± SEM of % freezing, with individual dots overlaid representing individual animals. Data analyzed by unpaired bicaudal Student's *t*-test ($t_{(18)} = 2.62$; $P < 0.0174$). **a**: (different from nonhandled females). (*C*) Histogram showing mean ± SEM of the % time spent in open and closed arms, with individual dots overlaid representing individual animals. Data analyzed by independent one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test ($F_{(3,\ 36)} = 66.86$, $P < 0.0001$). No significant difference was found between the mean time spent in the open and closed arms for handled and nonhandled rats.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

to *darting*, a common defensive behavior in the presence of auditory cues: thus, freezing itself might not always be the taken as the most reliable quantifier of fear memory retention (Gruene et al. 2015). Furthermore, females can display heightened shock reactivity (Olivera-Pasilio and Dabrowska 2023) or distinct startle responses compared to males, although results investigating these differences have been mixed (Graham et al. 2009; Zhao et al. 2018; Russo and Parsons 2021). In our contextual fear conditioning experiments, neither females nor males were observed to engage in darting, and since most of our female subjects displayed relatively high levels of freezing in the conditioning context, we discarded the possibility of this defensive behavior interfering in our results. Interestingly, despite infrequent, males, but not females, displayed some *flight behavior* (jumping), depending on the context (data shown here): females in A (zero of 10 subjects), B (zero of 10), C (zero of 10), and D (zero of 11); males in A (one jumper among 11 subjects), B (zero of 11), C (one jumper among 11 subjects), and D (zero of 11).

A closer look at the chosen contexts: PCA

The main premise behind our selection of four graded contexts was that a "context" is, indeed, a *space-confined multisensory cluster*, which involves multiple, inseparable (yet, distinguishable) parameters. Therefore, it is unreasonable to expect that controlling just one or two parameters at once in a pure contextual fear conditioning task is actually possible: animals integrate multiple sensory modalities to explore their environment, monitoring all modalities simultaneously, even when we attempt to isolate those where white noise masking is applicable (e.g., background sound and/or odor).

As previously described, our four contexts A, B, C, and D were designed primarily based on intuition, with contexts sorted according to multisensory criteria (tactile, visual, olfactory, or their combinations), which does not facilitate pinpointing which parameter, if any, dominates over the others for each sex, at each time interval (Supplemental Figs. S3A, S4C). Supplemental Figure S1 outlines the five chosen parameters—FLOOR, WALLS, SIZE, ROOM, and SCENT, which, if varied simultaneously with each limited to just two possibilities (variables), would result in an unreasonably large number of combinations to test. Therefore, we reassessed our data by pooling groups according to the parameters and their variables to analyze correlations and perform multidimensional data reduction with principal component analysis (Supplemental Figs. S3B,C, S4). The variables were, respectively, smooth versus grid (FLOOR texture), planar versus curved (WALL geometry), ethanol versus isopropyl alcohol versus quaternary ammonium (cleaning agent SCENT), large versus small (chamber SIZE), and conditioning versus novel (test session ROOM). Results are shown in Supplemental Figures S3B,C and S4A,C,E. For methodology of data regrouping and a detailed description of results, see Supplemental Material.

As illustrated in the heat maps in Supplemental Figure S3 and in Supplemental Table S2, most of the measured behavioral responses (freezing levels) in each context were highly correlated, a condition for which Principal Components Analysis (PCA) is the ideal method for extracting useful information (Kirkwood et al. 2013).

Supplemental Figure S4A–F shows the Principal Component Analysis results. No variables were fully negatively correlated (loadings at 180°), i.e., variables that exhibit different patterns of behavior, only positively correlated (clustered) ones—meaning they behave similarly—and orthogonal (loadings at 90°), i.e., uncorrelated variables—indicating independent variation.

Comparison of the four contexts A, B, C, and D (Supplemental Fig. S4A) shows that while contexts A and B are always positively correlated in females, at 45 days this pattern changes for males, consistent with what is shown in Figure 2. When examining the covariation of all the 11 variants of the five parameters grouped collectively (Supplemental Fig. S4), the most noticeable aspect is the clustering, at 2 days, of some of the variables that describe the conditioning (training) context A (grid floor, planar walls, small chamber, and conditioning room, with the exception of SCENT), and their complete regrouping as an "A" cluster at 28 days, and specially for males at 45 days, suggesting a reinforcing role of conditioning variables for the retrieval of the aversive memory.

In Supplemental Figure S4E, we explored the variables separated by parameter to distinguish sex-related and/or time-dependent differences, and the results were slightly different from those in Supplemental Figure S4C, since the covariants differed. A certain degree of sexual dimorphism was observed in the independent (orthogonal) response of females and males to FLOOR texture (through tactile sense) at 2 days; however, floor texture was not a significant parameter in distinguishing between contexts in the recent memory test, although males tend to become better discriminators for this parameter with time compared to females. In relation to chamber SIZE, females distinguished the larger ones independently from males at 2 and 28 days, with males exhibiting this characteristic at 45 days. Neither sex distinguished the variations for the parameters WALL geometry, ROOM, and ethanol at 2 and 28 days, but these patterns were disrupted at 45 days, with males diverging in their responses and females converged on a response that did not effectively distinguish the variables.

In sum, multidimensional data reduction with Principal Component Analysis showed that both sexes did not discriminate between smooth versus grid floors at first, but at more remote time points, the tactile perception of floor appeared to lose saliency for females, while males demonstrated a greater ability to distinguish between textures. Sexual dimorphism was also found for test chamber size, with females being more sensitive to this parameter at 2 and 28 days compared to males, but this sensitivity decreased over time. In contrast, males appeared to distinguish these variables better than females at 45 days: females seem to have poorer discriminatory ability with time for certain contextual features. No sexual dimorphisms were found for cleaning agent scent, wall geometry and test session room.

Despite the difficulty in separating parameters, multidimensional data reduction with Principal Component Analysis facilitated the identification of salient variables, showing that neither sex discriminated between smooth versus grid floors at 2 days; however, tactile perception of floor texture appeared to gain saliency for males at more remote time points, when they began to distinguish between textures. Sexual dimorphism was also found for test chamber size, with females being more sensitive to this parameter at 2 and 28 days compared to males, but sensitivity decreases over time, and males exhibited better discrimination of chamber size than females at 45 days. In general, females appear to lose discriminatory ability over time for certain contextual features. No sexual differences were found for cleaning agent scent, wall geometry and —surprisingly—test session room, apparently contradicting some previously published findings obtained with different experimental setups and in another strain of rats, Sprague-Dawley, or even nondisclosed detailed room differences, which may vary considerably (Zhou and Riccio 1996).

Sex-specific cognitive maps and configural discrimination

Our results suggest that different factors might be at stake in fear memory discrimination, such as distinct safety signaling perception between females and males, but with the generalization process occurring differently across sexes based on different context parameters. Dimorphic strategies have been observed in other

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

hippocampus-dependent tasks, such as spatial navigation, in which circulating estrogen levels along with volumetric differences in the hippocampus and entorhinal cortex influenced the extent to which females adopt an allocentric in opposition to an egocentric navigation strategy (Keeley et al. 2013). In the case of auditory cued fear memories, contextual foreground cues are more salient in generating a fear response in females compared to males, while males in general use more background cues when retrieving contextual fear memories (Cossio et al. 2016), suggesting increased recruitment of the amygdala in females, while males may rely more on hippocampus-dependent processes. Naming a parameter in a contextual fear conditioning task a "cue" emphasizes a presumed salience for the subjects, which differs from "cued fear conditioning," a distinct behavioral task that also involves generalization over time (Pollack et al. 2018). A cued fear conditioning task has at least one controllable parameter that strongly signals the recruitment of the expected behavioral response, such as a tone or light, thus being a simpler experimental setup compared to *pure* contextual fear conditioning, in which no single parameter is intentionally more prominent over the others. As discussed in the previous section, even in such a complex setup, some parameters may hold particular saliency, potentially due to an innate predisposition, and it is reasonable to question whether any of these intrinsically interconnected parameters—as in the so-called configural view (Pearce and Bouton 2001) might serve as a cue that facilitates generalization. To discriminate or generalize fear-related contexts, subjects likely evaluate multiple environmental variables present in neutral contexts but may gradually assign differential weights to these features, relying on a Bayesian-like, probabilistic inference process to guide behavior (Sanders et al. 2020; Valone 2024).

While in our main experiment females expressed lower freezing levels than males in the conditioning context A at 2 days, groups tested at more remote time points equaled males in terms of freezing behavior, indicating *there was no deficit in acquisition or consolidation of the fear conditioning experience*, but what was in fact observed were differences in the qualitative transformation of long-term memory, consistent with numerous other studies (Taxier et al. 2020).

Another possibility to explain our findings may be that, at least in part, females and males have different *cognitive contextual maps* (Posani et al. 2018). While females might make use of other parameters to determine how safe or threatening a context is in its entirety, resulting in better context discrimination, relevant features, such as chamber size in recent memory, and floor texture at more remote intervals, appear to be two salient parameters that might predict to some extent the behavioral outcome.

At this point, it is again relevant to cite Shepard (1987) (the italics are ours): "Because any object or situation experienced by an individual is *unlikely to recur in exactly the same form and context* (…) a full characterization of the change that even a single environmental event induces in an individual must entail a specification of how that individual's behavioral dispositions have been altered relative to any ensuing situation. Differences in the way individuals of different species represent the same physical situation implicate, in each individual, an internal metric of similarity between possible situations." At least in relation to rat behavior, we can say exactly the same for conspecifics of each sex.

Materials and Methods

Subjects

Naive female and male Wistar rats weighing 270–340 g and aged 70–75 days at the beginning of experimental procedures, were used. All animals were provided by our local breeding colony (CREAL/UFRGS) and housed in plastic cages up to four individuals per cage. Females and males were housed with same-sex littermates at opposite ends of the same facility room, which was kept under a 12 h light–dark cycle, controlled temperature of 21 ± 2°C, and ~65% humidity. Experimental procedures were conducted during the light phase. Regular chow and water were available ad libitum for all animals. To prevent additional or differential stress, estrus cycle was not verified. All experiments were conducted in accordance with local animal care legislation and guidelines (Brazilian Federal Law 11,794/2008) and approved by the Committee on Ethics in the Use of Experimental Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA–UFRGS, Project # 40,945).

Conditioning apparatus and novel contexts

All seven distinct contexts used in our pilot study and main experiment (Supplemental Fig. S1) are described below.

The Conditioning Context A was the same for both experiments, and consisted of an internally illuminated Plexiglass box (L × W × H: 22 × 22 × 33 cm) with three black and one light brown wall. The floor was a grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart. Rats were observed through a webcam mounted on the opaque upper lid. The conditioning chamber A was cleaned with 70% ethanol solution before placing each animal.

In the pilot study, Context P1 was, in our view, the least similar to Context A, and consisted of polyvinyl chloride (PVC) cylindric container (diameter: 25 cm; height: 22 cm) with vertical black and white stripes on its internal walls and a heavy transparent glass lid. The floor consisted of a smooth black plywood surface covered with wood shavings, which was replaced before placing each animal. The test chamber was cleaned with 70% isopropyl alcohol. A slightly modified version P1′, identical to P1 but without wood shavings, was also assayed.

Context P2 consisted of a scalene triangular chamber, smaller than Context C (sides × H: 35, 14.5, 23 × 6.5 cm), with brown plywood walls, white tempered glass floor, and no lid. Context P2 was cleaned with quaternary ammonium disinfectant cleaning solution before each animal.

Context P3 was a modified, half-sized version of Context D (L × W × H: 25 × 25 × 29 cm), with dimensions similar to the Conditioning chamber A and was cleaned with 70% isopropyl alcohol.

In our main experiment, Context B was a not-so-slightly modified version of Context A, in which the metal grid floor was covered with a smooth brown vinyl mat and a semicircular rubber wall placed inside the conditioning chamber. Both Contexts A and B were cleaned with 70% ethanol before each session.

Context C consisted of a right triangular chamber (sides × H: 34, 28, 48 × 19 cm) with smooth black plywood floor and walls. Differently from A and B, Context C was cleaned with quaternary ammonium disinfectant prior to placing each animal.

Context D was a larger rectangular box (L × W × H: 50 × 25 × 29 cm) and was placed in a different area of the conditioning room and contained three opaque beige walls, one transparent frontal wall, and a semitranslucent lid. A desk lamp was placed beside the frontal wall. The floor consisted of a grid of parallel 0.1 cm caliber stainless copper bars spaced 1 cm apart. The test chamber was cleaned with 70% isopropyl alcohol.

Rats were kept in their home cages and habituated to the conditioning room under a constant fan background noise for at least 30 min before the start of each session. Contexts C, P1, P1′, and P2 were located in separate rooms from that of the conditioning chamber.

Behavioral procedures

Contextual fear conditioning (CFC)

Rats were habituated to the conditioning context (A) for 3 min before receiving two 2 sec continuous 0.5 mA footshocks separated by a 30 sec interval. Thirty seconds after the second footshock, rats were removed from the chamber and returned to their home cage. Females and males were not trained in the same experimental session.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Test sessions

For each training-test interval, conditioned animals were divided into four different groups, each one tested in a different test chamber: either A, P1/P1′, P2, or P3—for the pilot study (Fig. 1)—or A, B, C, or D—for the main experiment (Fig. 2). In both experiments, test sessions lasted 5 min during which freezing responses were manually scored by an experienced observer using a stopwatch. Defensive freezing behavior, defined as the absence of all muscle movements except those related to breathing (Blanchard and Blanchard 1969), was used as an indicator of memory retention and expressed as a percentage of total session time. The number of attempted escapes (jumps) were also quantified as a secondary indicator of flight behavior. To prevent any eventual reactivation/reconsolidation of fear memory, which could influence the results, each rat group was tested in one context only. Contexts were not counterbalanced since this methodological approach reactivates memory and produces differences in fear expression based on test order (Huckleberry et al. 2016), and that this can be expressed differently in females and males (Keiser et al. 2017) adding an additional variable to our results. Females and males were never tested in the same experimental session.

Statistical analyses

After assessing data distribution for normality (Shapiro–Wilk test) and homoscedasticity (Levene's test), we used, for parametric data, the following tests to find statistical differences between groups (considering $P < 0.05$): for two independent groups, the unpaired two-tailed Student's *t*-test was used, and for *K* groups, we used independent one- or two-way ANOVAs, followed by Tukey Multiple Comparisons post hoc test in order to sort the significant differences found. To support *reproducibility*, for every statistically significant ($P < 0.05$) effect, Effect Sizes were calculated, either using Hedge's *g* (effect: small = 0.20, medium = 0.50, large = 0.80), or omega-squared (ω^2), for the ANOVAs (effect: small = 0.02, medium = 0.06, large = 0.14). Outliers beyond 2 SD above or below the mean were excluded from analyses.

To estimate the degree of discrimination between contexts, individual and average *Z*-scores for every neutral context were calculated and plotted: *Z*-scores inform where each individual score is located inside the normal curve in terms of standard deviations, compared to the average percentual freezing score for same sex control groups with the same training-test interval. In Figures 1D and 2H–J, each point represents the behavioral response of one individual animal.

Pearson's correlation analysis was used to compare mean freezing variables between different sexes, contextual features, and training-test intervals and obtain *P*-values, correlation coefficient (*r*), and confidence intervals (CIs). Subsequently, Principal Component Analysis (PCA) was used to reduce multidimensional data into principal component (PC) variables, which allow us to observe associations, identify patterns, and verify outliers within multivariate data. Supplemental Figures S3 and S4 summarize these findings. Pearson's *r* coefficients, *P*-values, and Confidence Intervals are shown in Supplemental Table S3. PCA loading scores, Eigenvalues, and Explained Variance are displayed in Supplemental Table S4.

Acknowledgments

We kindly thank Isabel Cristina Marques Scarello for her invaluable technical assistance. We also thank Jociane de Carvalho Myskiw and Giuliana Petiz Zugno for helping to perform some of the experiments. Special thanks to João Paulo Maires Hoppe (Douglas Research Centre, McGill University) for his insightful comments on our multivariate analysis. This work was supported by fellowships and grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil), and Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/Brazil).

References

Asok A, Hijazi J, Harvey LR, Kosmidis S, Kandel ER, Rayman JB. 2019a. Sex differences in remote contextual fear generalization in mice. *Front Behav Neurosci* **13:** 56. doi:10.3389/fnbeh.2019.00056

Asok A, Kandel ER, Rayman JB. 2019b. The neurobiology of fear generalization. *Front Behav Neurosci* **12:** 329. doi:10.3389/fnbeh.2018.00329

Bangasser DA, Wicks B. 2017. Sex-specific mechanisms for responding to stress. *J Neurosci Res* **95:** 75–82. doi:10.1002/jnr.23812

Bergstrom HC. 2020. Assaying fear memory discrimination and generalization: methods and concepts. *Curr Protoc Neurosci* **91:** e89. doi:10.1002/cpns.89

Besnard A, Sahay A. 2016. Adult hippocampal neurogenesis, fear generalization, and stress. *Neuropsychopharmacology* **41:** 24–44. doi:10.1038/npp.2015.167

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* **67:** 370–375. doi:10.1037/h0026779

Bouton ME, Maren S, McNally GP. 2021. Behavioral and neurobiological mechanisms of Pavlovian and instrumental extinction learning. *Physiol Rev* **101:** 611–681. doi:10.1152/physrev.00016.2020

Burn CC. 2008. What is it like to be a rat? Rat sensory perception and its implications for experimental design and rat welfare. *Appl Anim Behav Sci* **112:** 1–32. doi:10.1016/j.applanim.2008.02.007

Canteras NS, Kroon JAV, Do-Monte FHM, Pavesi E, Carobrez AP. 2008. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neurosci Biobehav Rev* **32:** 1228–1235. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.05.009

Clark JW, Drummond SPA, Hoyer D, Jacobson LH. 2019. Sex differences in mouse models of fear inhibition: fear extinction, safety learning, and fear–safety discrimination. *Br J Pharmacol* **176:** 4149–4158. doi:10.1111/bph.14600

Colon L, Odynocki N, Santarelli A, Poulos AM. 2018. Sexual differentiation of contextual fear responses. *Learn Mem* **25:** 230–240. doi:10.1101/lm.047159.117

Cossio R, Carreira MB, Vásquez CE, Britton GB. 2016. Sex differences and estrous cycle effects on foreground contextual fear conditioning. *Physiol Behav* **163:** 305–311. doi:10.1016/j.physbeh.2016.05.026

Crestani AP, Lotz FN, Casagrande MA, Popik B, Guerra KTK, De Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2022. Adolescent female rats undergo full systems consolidation of an aversive memory, while males of the same age fail to discriminate contexts. *Behav Neurosci* **136:** 172–181. doi:10.1037/bne0000501

Cullen PK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC, Jasnow AM. 2015. Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiol Learn Mem* **124:** 19–27. doi:10.1016/j.nlm.2015.07.001

Daviu N, Rabasa C, Nadal R, Armario A. 2014. Comparison of the effects of single and daily repeated immobilization stress on resting activity and heterotypic sensitization of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Stress* **17:** 176–185. doi:10.3109/10253890.2014.880834

Day HLL, Stevenson CW. 2020. The neurobiological basis of sex differences in learned fear and its inhibition. *Eur J Neurosci* **52:** 2466–2486. doi:10.1111/ejn.14602

De Oliveira Alvares L, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* **22:** 1092–1095. doi:10.1002/hipo.20983

Dos Santos Corrêa M, Vaz BDS, Grisanti GDV, De Paiva JPQ, Tiba PA, Fornari RV. 2019. Relationship between footshock intensity, post-training corticosterone release and contextual fear memory specificity over time. *Psychoneuroendocrinology* **110:** 104447. doi:10.1016/j.psyneuen.2019.104447

Dudai Y. 1996. Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* **17:** 367–370. doi:10.1016/S0896-6273(00)80168-3

Foilb AR, Bals J, Sarlitto MC, Christianson JP. 2018. Sex differences in fear discrimination do not manifest as differences in conditioned inhibition. *Learn Mem* **25:** 49–53. doi:10.1101/lm.045500.117

Giachero M, Belén Sacson A, Belén Vitullo M, Bekinschtein P, Weisstaub N. 2024. Targeting fear memories: examining pharmacological disruption in a generalized fear framework. *Neurobiol Learn Mem* **213:** 107960. doi:10.1016/j.nlm.2024.107960

Graham LK, Yoon T, Lee HJ, Kim JJ. 2009. Strain and sex differences in fear conditioning: 22 kHz ultrasonic vocalizations and freezing in rats. *Psychol Neurosci* **2:** 219–225. doi:10.3922/j.psns.2009.2.015

Greggor AL, Thornton A, Clayton NS. 2015. Neophobia is not only avoidance: improving neophobia tests by combining cognition and ecology. *Curr Opin Behav Sci* **6:** 82–89. doi:10.1016/j.cobeha.2015.10.007

Grella SL, Fortin AH, McKissick O, Leblanc H, Ramirez S. 2020. Odor modulates the temporal dynamics of fear memory consolidation. *Learn Mem* **27:** 150–163. doi:10.1101/lm.050690.119

Downloaded from learnmem.cshlp.org on June 22, 2025 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Gruene TM, Flick K, Stefano A, Shea SD, Shansky RM. 2015. Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. *eLife* **4:** e11352. doi:10.7554/eLife.11352

Haubrich J, Cassini LF, Diehl F, Santana F, Fürstenau De Oliveira L, De Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2016. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory: accelerating systems consolidation of a fear memory. *Hippocampus* **26:** 924–932. doi:10.1002/hipo.22575

Huckleberry KA, Ferguson LB, Drew MR. 2016. Behavioral mechanisms of context fear generalization in mice. *Learn Mem* **23:** 703–709. doi:10.1101/lm.042374.116

Jasnow AM, Lynch JF, Gilman TL, Riccio DC. 2017. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *J Neurosci Res* **95:** 821–835. doi:10.1002/jnr.23837

Keeley RJ, Tyndall AV, Scott GA, Saucier DM. 2013. Sex difference in cue strategy in a modified version of the Morris water task: correlations between brain and behaviour. *PLoS One* **8:** e69727. doi:10.1371/journal.pone.0069727

Keeley RJ, Bye C, Trow J, McDonald RJ. 2015. Strain and sex differences in brain and behaviour of adult rats: learning and memory, anxiety and volumetric estimates. *Behav Brain Res* **288:** 118–131. doi:10.1016/j.bbr.2014.10.039

Kehoe EJ. 2008. Discrimination and generalization. In *Learning and memory: a comprehensive reference* (ed. Byrne JH, Menzel R), pp. 123–149. Elsevier, NY.

Keiser AA, Turnbull LM, Darian MA, Feldman DE, Song I, Tronson NC. 2017. Sex differences in context fear generalization and recruitment of hippocampus and amygdala during retrieval. *Neuropsychopharmacology* **42:** 397–407. doi:10.1038/npp.2016.174

Kirkwood RN, Brandon SCE, Moreira BDS, Deluzio KJ. 2013. Searching for stability as we age: the PCA-biplot approach. *Int J Stat Med Res* **2:** 255–262. doi:10.6000/1929-6029.2013.02.04.2

Kumaran D, Maguire EA. 2006. An unexpected sequence of events: mismatch detection in the human hippocampus. *PLoS Biol* **4:** e424. doi:10.1371/journal.pbio.0040424

Lissek S, Grillon C. 2012. Learning models of PTSD. In *The Oxford handbook of traumatic stress disorders* (ed. Beck JG, Sloan DM), pp. 175–190. Oxford University Press. https://academic.oup.com/edited-volume/28265/chapter/213416813 (accessed August 4, 2024).

Lynch J, Cullen PK, Jasnow AM, Riccio DC. 2013. Sex differences in the generalization of fear as a function of retention intervals. *Learn Mem* **20:** 628–632. doi:10.1101/lm.032011.113

Lynch JF, Dejanovic D, Winiecki P, Mulvany J, Ortiz S, Riccio DC, Jasnow AM. 2014. Activation of ERβ modulates fear generalization through an effect on memory retrieval. *Horm Behav* **66:** 421–429. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.06.017

Maren S. 2014. Fear of the unexpected: hippocampus mediates novelty-induced return of extinguished fear in rats. *Neurobiol Learn Mem* **108:** 88–95. doi:10.1016/j.nlm.2013.06.004

McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. 2011. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res* **45:** 1027–1035. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.03.006

Morena M, Nastase AS, Santori A, Cravatt BF, Shansky RM, Hill MN. 2021. Sex-dependent effects of endocannabinoid modulation of conditioned fear extinction in rats. *Br J Pharmacol* **178:** 983–996. doi:10.1111/bph.15341

Olivera-Pasilio V, Dabrowska J. 2023. Fear-conditioning to unpredictable threats reveals sex and strain differences in rat fear-potentiated startle (FPS). *Neuroscience* **530:** 108–132. doi:10.1016/j.neuroscience.2023.08.030

Pamplona FA, Henes K, Micale V, Mauch CP, Takahashi RN, Wotjak CT. 2011. Prolonged fear incubation leads to generalized avoidance behavior in mice. *J Psychiatr Res* **45:** 354–360. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.06.015

Pearce JM, Bouton ME. 2001. Theories of associative learning in animals. *Annu Rev Psychol* **52:** 111–139. doi:10.1146/annurev.psych.52.1.111

Pedraza LK, Sierra RO, Boos FZ, Haubrich J, Quillfeldt JA, De Oliveira Alvares L. 2016. The dynamic nature of systems consolidation: stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus* **26:** 362–371. doi:10.1002/hipo.22527

Pickens CL, Golden SA, Adams-Deutsch T, Nair SG, Shaham Y. 2009. Long-lasting incubation of conditioned fear in rats. *Biol Psychiatry* **65:** 881–886. doi:10.1016/j.biopsych.2008.12.010

Pollack GA, Bezek JL, Lee SH, Scarlata MJ, Weingast LT, Bergstrom HC. 2018. Cued fear memory generalization increases over time. *Learn Mem* **25:** 298–308. doi:10.1101/lm.047555.118

Posani L, Cocco S, Monasson R. 2018. Integration and multiplexing of positional and contextual information by the hippocampal network. *PLoS Comput Biol* **14:** e1006320. doi:10.1371/journal.pcbi.1006320

Poulos AM, Mehta N, Lu B, Amir D, Livingston B, Santarelli A, Zhuravka I, Fanselow MS. 2016. Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. *Learn Mem* **23:** 379–385. doi:10.1101/lm.041400.115

Quillfeldt JA. 2018. Floor and ceiling effects. In *Encyclopedia of animal cognition and behavior* (ed. Vonk J, Shackelford T), pp. 1–4. Springer International Publishing, Cham http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-47829-6_1580-1 (accessed October 4, 2024).

Quillfeldt JA. 2019. Temporal flexibility of systems consolidation and the synaptic occupancy/reset theory (SORT): cues about the nature of the engram. *Front Synaptic Neurosci* **11:** 1. doi:10.3389/fnsyn.2019.00001

Reppucci CJ, Kuthyar M, Petrovich GD. 2013. Contextual fear cues inhibit eating in food-deprived male and female rats. *Appetite* **69:** 186–195. doi:10.1016/j.appet.2013.06.004

Riccio DC, Ackil JK, Burch-Vernon A. 1992. Forgetting of stimulus attributes: methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychol Bull* **112:** 433–445. doi:10.1037/0033-2909.112.3.433

Rosas JM, Alonso G. 1997. The effect of context change upon long-term memory of CS duration. *Behav Processes* **39:** 69–76. doi:10.1016/S0376-6357(96)00045-9

Rudy JW. 2009. Context representations, context functions, and the parahippocampal–hippocampal system. *Learn Mem* **16:** 573–585. doi:10.1101/lm.1494409

Russo AS, Parsons RG. 2021. Behavioral expression of contextual fear in male and female rats. *Front Behav Neurosci* **15:** 671017. doi:10.3389/fnbeh.2021.671017

Sanders H, Wilson MA, Gershman SJ. 2020. Hippocampal remapping as hidden state inference. *eLife* **9:** e51140. doi:10.7554/eLife.51140

Shepard RN. 1987. Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science* **237:** 1317–1323. doi:10.1126/science.3629243

Soares LA, Nascimento LMM, Guimarães FS, Gazarini L, Bertoglio LJ. 2024. Dual-step pharmacological intervention for traumatic-like memories: implications from D-cycloserine and cannabidiol or clonidine in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl)* **241:** 1827–1840. doi:10.1007/s00213-024-06596-8

Suddendorf T. 2006. Foresight and evolution of the human mind. *Science* **312:** 1006–1007. doi:10.1126/science.1129217

Takahashi LK, Nakashima BR, Hong H, Watanabe K. 2005. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci Biobehav Rev* **29:** 1157–1167. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.04.008

Taxier LR, Gross KS, Frick KM. 2020. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nat Rev Neurosci* **21:** 535–550. doi:10.1038/s41583-020-0362-7

Trott JM, Hoffman AN, Zhuravka I, Fanselow MS. 2022a. Conditional and unconditional components of aversively motivated freezing, flight and darting in mice. *eLife* **11:** e75663. doi:10.7554/eLife.75663

Trott JM, Krasne FB, Fanselow MS. 2022b. Sex differences in contextual fear learning and generalization: a behavioral and computational analysis of hippocampal functioning. *Learn Mem* **29:** 283–296. doi:10.1101/lm.053515.121

Valone TJ. 2024. Probabilistic inference and Bayesian-like estimation in animals: empirical evidence. *Ecol Evol* **14:** e11495. doi:10.1002/ece3.11495

Vazquez K, Cole KE, Parsons RG. 2024. Sex and the facilitation of cued fear by prior contextual fear conditioning in rats. *Learn Mem* **31:** a054010. doi:10.1101/lm.054010.124

Wiltgen BJ, Silva AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* **14:** 313–317. doi:10.1101/lm.430907

Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ. 2010. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol* **20:** 1336–1344. doi:10.1016/j.cub.2010.06.068

Wotjak CT. 2019. Sound check, stage design and screen plot – how to increase the comparability of fear conditioning and fear extinction experiments. *Psychopharmacology (Berl)* **236:** 33–48. doi:10.1007/s00213-018-5111-5

Young M. 2012. Generalization versus discrimination. In *Encyclopedia of the sciences of learning* (ed. Seel NM), pp. 1349–1352. Springer, Boston, MA. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1428-6_1030 (accessed October 4, 2024).

Zhao Y, Bijlsma EY, Verdouw MP, Groenink L. 2018. No effect of sex and estrous cycle on the fear potentiated startle response in rats. *Behav Brain Res* **351:** 24–33. doi:10.1016/j.bbr.2018.05.022

Zhou Y, Riccio DC. 1996. Manipulation of components of context: the context shift effect and forgetting of stimulus attributes. *Learn Motiv* **27:** 400–407. doi:10.1006/lmot.1996.0023

Received November 12, 2024; accepted in revised form May 16, 2025.

5. Capítulo II

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Hormones and Behavior*.

Sex differences in fear memory generalization after acute pre-test injection of testosterone or estradiol in gonadectomized young adult rats

Fernanda Nogueira Lotz[1,2#], Giuliana Petiz Zugno[1,2], Lorenzo Chaves Costa Novo[1], Kauani Vitória Frassetto Vitali[1], Kétlyn Talise Knak Guerra[1,2], Ana Paula Crestani[3], Jorge Alberto Quillfeldt[1,2,4]

[1] Psychobiology and Neurocomputation Laboratory, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

[2] Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

[3] Department of Psychology, University of California Davis, 135 Young Hall, Davis, CA 95616, United States

[4] Brazilian Network of Memory Investigation (ReBraEM), Brazil.

Corresponding author.

Corresponding author: Fernanda Nogueira Lotz Alves, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: fernandanlalves@gmail.com

ABSTRACT

Memory generalization can occur in parallel with time-dependent processes such as systems consolidation, or be rapidly inducible through modulation of experimental parameters and physiological interventions. Of these, sex steroids are widely known to orchestrate a number of roles in reproduction, but less is known on their functions in cognitive processes. To verify how acute pre-test hormone replacement might impact the temporal dynamics of fear memory retrieval in the original or novel context, young adult gonadectomized and sham surgery female and male rats were trained in a contextual fear conditioning task and tested in the same or a novel context at 2, 28 or 45 days after training. Hormone replacement resulted in different temporal dynamics for females and males, with estradiol benzoate injection inducing rapid generalization in females at 28 days after training, while injection of testosterone propionate in males produced little effect at the dose used.

Keywords: gonadectomy, context discrimination, memory generalization, Systems Consolidation, sex steroids, Contextual Fear Conditioning task, adult rats

INTRODUCTION

The ability to predict outcomes in novel situations based on past experiences may confer adaptive advantage in an ever-changing environment (Asok et al. 2019; Suddendorf, 2006), especially in the case of fear memories, in which the generalization of threat cues to new, yet similar learned experiences may inform adaptive behavioral responses (Bergstrom 2020; Young 2012).

Evidence in studies with rodents point to retrieval of aversive contextual memories depending initially on the hippocampus and becoming more reliant on neocortical structures, a time-dependent process known as *Systems Consolidation* (Frankland and Bontempi 2005; Haubrich et al. 2016; Bontempi et al. 1999). In parallel, fear memories may undergo a loss of contextual details and be retrieved in neutral contexts not previously paired with the aversive stimulus (Cullen et al. 2015; De Oliveira Alvares et al. 2012; Quillfeldt 2019; Rudy 2009; Wiltgen et al. 2010), esspecially at longer intervals between training and test sessions (Wiltgen and Silva 2007). Time-dependent memory generalization is a natural consequence of systems consolidation in which the neuroanatomical reorganization of structures supporting memory retrieval may determine the extent to which animals discriminate between an aversive and neutral context at different post-training intervals. In contrast to this time-dependent form of memory generalization occurring in parallel with systems consolidation, memory generalization can be rapidly inducible through the action of different hormones, such as in a state of heightened stress (Pedraza et al. 2016; Dos Santos Corrêa et al. 2019) and with sex steroid replacement (Lynch et al. 2016b, 2014).

While generalization of aversive memories can increase survival and generation of offspring, exaggerated fear generalization to neutral cues or contexts can be maladaptive, for instance, resulting in restricted resource-seeking and offspring-rearing behaviors. In humans, overgeneralization of fear is an important symptom that underlies stress and anxiety-related disorders such as posttraumatic stress, generalized anxiety disorder and phobias. Moreover, these affect women at higher rates, suggesting a role of sex hormones in the risk of developing these conditions (Pigott 2003; Besnard and Sahay 2016; Jasnow et al. 2017; Keiser et

al. 2017; Lissek and Grillon 2012; McLean et al. 2011), thus highlighting the need to study sex differences in preclinical and clinical studies (Clayton 2016; Miller et al. 2017; NIH guidelines on the inclusion of sex as a biological variable, 2016).

Over the years increased attention has been paid to how sex hormones modulate learning and memory, highlighting the importance of studying sex differences in preclinical and clinical research. These differences may involve the organizational (especially during early development) or activational effects of gonadal hormones, genomic and non-genomic effects, or interactions between some or all of these factors. In particular, estrogen and testosterone are important neuromodulators of long-term memory consolidation, with ample distribution of androgen and estrogen receptors in key memory areas of the brain, such as the hippocampus, amygdala and prefrontal cortex (Adkins et al. 2019; Quigley et al. 2021).

The sex steroids estrogen, androgen and progestogen are widely known to orchestrate a number of roles in sexual differentiation and reproduction, but less is known on their functions in cognitive processes. Over the years, increased attention has been paid to how sex hormones modulate learning and memory (Taxier et al. 2020; Pompili et al. 2020) through molecular and cellular processes such as adult neurogenesis (Pawluski et al., 2009; Mahmoud, Wainwright & Galea, 2016), hippocampal spine density (Woolley & McEwen, 1992; Luine et al., 2018), synaptic plasticity (Gupta et al. 2001; González-Burgos et al. 2005), genomic and non-genomic signaling (Hara et al. 2015; Levin 2005; Dumitriu et al. 2010; McEwen et al. 2012; Lynch et al. 2014, 2016a, 2016b). In particular, the estrogen 17β-estradiol (E2) is an important neuromodulator of long-term memory consolidation, acting on the hippocampus, amygdala and PFC, among other brain regions (Adkins et al. 2019) and may produce differential outcomes in females and males depending on the behavioral task and experimental parameters (Byrnes et al., 2012; Jacome et al.,2010). In a similar vein, testosterone and the aromatization of this androgen into estrogen may have different cognitive effects in rodents of either sex (Koss and Frick 2017).

Despite the fact that sex hormones are known to interfere with spatial, social and fear memory formation (McEwen and Milner 2017; Taxier et al. 2020; Koss and

Frick 2017), discrimination/generalization studies have produced mixed results, with some showing females generalizing before males (Lynch et al. 2013, 2014), while others indicating the exact opposite (Lotz et al. 2025; Crestani et al. 2022; Foilb et al. 2018), or simply finding no difference between sexes (Clark et al. 2019; Keeley et al. 2015; Reppucci et al. 2013). These sometimes disparate results based on differences in species, strain, experimental protocol, seasonal variations serve to highlight the complexity of underlying factors.

In this work, we trained young adult ovariectomized (OVX) and sham control female and orchiectomized (OCX) and sham control male rats in the contextual fear conditioning task and tested them 2, 28 or 45 days later either in the conditioning context (A) or in a novel context B, aiming to verify whether acute injection of estradiol (E2) or testosterone propionate (TP) 24 hours before the test session affected how animals retrieved contextual fear memories in the conditioning context A or in the novel context B.

RESULTS

EMBARGO

6. Capítulo III

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Neurobiology of Learning and Memory*.

Inactivation of the Lateral Entorhinal Cortex Impairs Expression of Generalized Systems Consolidated Fear Memory Depending on the Context

Fernanda Nogueira Lotz[1,3#], Kétlyn Talise Knak Guerra[1,3], Mirelle Araujo Casagrande[2,3], Ana Paula Crestani[4], Jorge Alberto Quillfeldt[1,3,5]

[1] Psychobiology and Neurocomputation Laboratory, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

[2] Neurobiology of Memory Laboratory, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

[3] Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

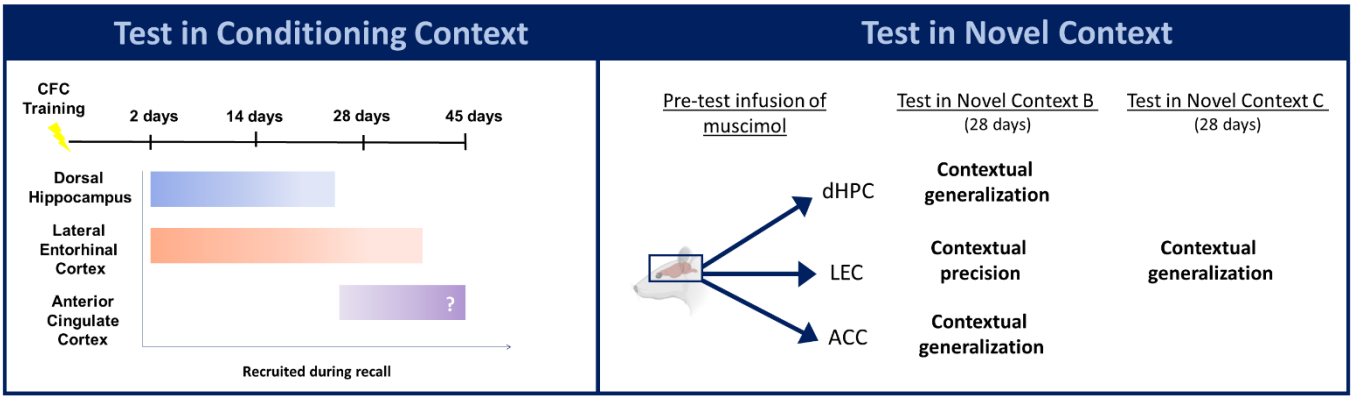
[4] Department of Psychology, University of California Davis, 135 Young Hall, Davis, CA 95616, United States

[5] Rede Brasileira de Estudos de Memória (ReBraEM), Brazil.

Corresponding author.

Corresponding author: Fernanda Nogueira Lotz, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: fernandanlalves@gmail.com

Graphical abstract



Abstract

Systems consolidation is the neuroanatomical organization of memory traces where hippocampus-dependent traces shift to cortical dependence for retrieval. In parallel, there is also a qualitative shift in memory representation, in which contextually-detailed memories depend on the hippocampal formation and generalized, gist-like memories in neocortical areas. The lateral entorhinal cortex (LEC) is an anatomical interface between the hippocampal formation and neocortical areas and a functional hub in the memory process. While some evidence suggests a temporal systems consolidation profile of the LEC consistent with its role as an intermediary structure, less is known on how this brain region may modulate the expression of generalized fear to novel contexts. Here we found that the LEC participates in the expression of generalized fear at a remote timepoint only in the novel context sharing dimensional and tactile similarities with the conditioning context. Also, this effect was observed when fear memory retrieval in the original context was still dependent on the LEC and anterior cingulate cortex, but no longer dependent on the hippocampus.

Keywords: Systems consolidation, context discrimination, generalization, aversive conditioning, rat

Introduction

Memory consolidation is a time-dependent process in which acquired information is stabilized in the brain so that it may be later retrieved (McGaugh, 2000). This process can be understood as two temporally distinct events, the first, synaptic consolidation, occurs at the cellular level or within local circuitry networks minutes or hours after acquisition. The second, systems consolidation, involves cellular networks spanning across morphohistologically and functionally different brain areas and can take weeks or up to months to occur (Asok et al., 2019; Dudai, 2004).

In the case of contextual fear memories, one natural consequence of systems consolidation is the loss of contextual precision, in which memories with time become more gist-like and more easily retrieved in neutral contexts (Asok et al., 2019; Wiltgen & Silva, 2007), resulting from a qualitative transformation known as stimulus generalization (Pearce & Bouton, 2001). While this process can be highly adaptive, allowing animals to transfer previously learned experiences to new challenges, overgeneralization of fear is a hallmark of trauma and anxiety-related disorders such as generalized anxiety and posttraumatic stress disorder in humans (Asok et al., 2019).

Initial integration of sensory information occurs in the neocortex before converging in the hippocampus where information may be consolidated as multimodal representations prior to being projected upstream to associative cortices (Fanselow, 2000; Lavenex & Amaral, 2000; Rudy, 2009). While multiple explicit memory engrams spanning across many areas of the brain may be generated during acquisition (Teyler & DiScenna, 1986; Teyler & Rudy, 2007), they may be retrieved from each at different times and under different conditions. Of these, it is well established that the hippocampus (HPC) is necessary for the consolidation and retrieval of recent contextual fear memories (Anagnostaras et al., 1999; Frankland & Bontempi, 2005; Kim & Fanselow, 1992) and that with time episodic memory retrieval may become less dependent on this structure and more reliant on extrahippocampal sites, perhaps most notably the anterior cingulate cortex (ACC), a process known as systems consolidation (Bontempi et al., 1999; Frankland & Bontempi, 2005; Haubrich et al., 2016; Kitamura et al., 2017).

While more is known on the role of the dHPC and ACC in systems consolidation, less studies have focused on the temporal dynamics of structures which act as intermediary relays between the neocortex and HPC, such as the thalamic nucleus reuniens (Sierra et al., 2017; Troyner et al., 2018), the retrosplenial cortex (Cowansage et al., 2014) and the entorhinal cortex, more specifically its lateral portion (LEC) (Pilkiw et al., 2022; Quillfeldt et al., 1996). In humans, the clinical relevance of this brain structure in memory studies can be seen in its role in the pathophysiology of Alzheimer's disease (Braak & Braak, 1985; deToledo-Morrell et al., 2004; Nosheny et al., 2019) and temporal lobe epilepsy (Bonilha, 2003; Du et al., 1993), among others, thus the importance of elucidating how this brain area contributes to memory processes.

Since the information processing and integration hierarchy involves different morphohistological brain regions with differing neural connections between them (e.g. medial pallidum/arquicortex, lateral cortex/paleocortex and dorsal pallidum/neocortex), we hypothesized that these regions would act as nodes displaying differential temporal dynamics between them in contextual fear memory retrieval. Also, these dynamics could be differently expressed when tested in a novel context. Therefore, we temporarily and reversibly inactivated brain regions of interest (dHPC, vHPC, LEC and ACC) with the GABAergic agonist muscimol and evaluated fear memory retention in the original training context (Experiment 1) and memory precision in a novel context (Experiment 2) at different post-training intervals in order to assay the temporal dynamics and involvement of each structure in memory retrieval.

Our main goal was to verify the time-dependent profile of the lateral entorhinal cortex in systems consolidation and contextual generalization. The entorhinal cortex has reciprocal projections between the hippocampus and neocortex (Arai et al., 2025) and can be differentiated between its medial (MEC) and lateral (LEC) areas based on morphohistological differences (Canto et al., 2008) and connectivity to other brain areas (Witter et al., 2000). It consists of 4 or 5 layers, placing it as an intermediary node between the medial pallidum/arquicortex (hippocampus), comprising of 3 layers, and the dorsal pallidum/neocortex, with 6. Thus, the lateral cortical/paleocortical entorhinal cortex is not only an anatomical interface between the hippocampus and neocortex but an important

functional node in the fear memory network, contributing to acquisition and retrieval even at posttraining intervals when the HPC is no longer required (Quillfeldt et al., 1996; Takehara-Nishiuchi, 2014). The LEC primarily receives inputs on unimodal sensory information on discreet objects through projections from the perirhinal cortex and in turn projects to the hippocampus proper via the perforant path (Eichenbaum et al., 2007; Lavenex & Amaral, 2000; Suzuki & Amaral, 1994), making it an important anatomical and functional hub and relay between the hippocampus proper and neocortical areas.

We found that the temporal dynamics for the LEC was consistent with its role as an intermediary node but was only recruited for fear memory expression in a novel context which shared predominantly tactile cues with the conditioning context, confirming that generalized memory retrieval does not necessarily depend on the same brain region in different contexts.

Results

EMBARGO

7. Discussão Geral

7.1 Contextos e representações contextuais

A memória, sobretudo a emocional, é um mecanismo preditivo voltado à sobrevivência. Mais do que reter fielmente o passado, o cérebro busca antecipar o futuro para guiar comportamentos adequados à situação e aumentar a sobrevivência. Para esse fim, memórias emocionais, em particular as de medo, tendem a ser mais duradouras em comparação às mais neutras. Isso é facilmente observado em estudos envolvendo modelos animais, em que a intensidade do estímulo aversivo correlaciona-se positivamente com a retenção e a expressão do medo condicionado (Cordero et al., 1998; Sigmundi et al., 1980). Contudo, esses treinos mais intensos podem reduzir a discriminação contextual na memória remota, antecipando a generalização do medo (Marin et al., 2020; Pedraza et al., 2016).

Antes de embarcar no planejamento de experimentos envolvendo condicionamento e discriminação contextual, é fundamental ter em mente uma definição razoável de que é um “contexto”. Uma definição prática é considerá-lo como um espaço físico delimitado composto por múltiplos elementos sensoriais independentes — formato da caixa, textura do assoalho e paredes, odores, iluminação, dicas visuais — mas que integrados, formam uma representação multissensorial relativamente estática. Ainda, esses elementos podem ser variados para formar um contexto diferente do original. A representação contextual inclui também a organização espacial (“onde”) e temporal (“quando”) desses elementos (“o que”) (Fanselow, 2000; Rudy, 2009). De forma mais ampla, “contexto” pode incluir tanto o ambiente externo quanto o estado fisiológico interno do organismo (Spear, 1973), podendo em alguns casos gerar uma dependência de estado (Zarrindast & Khakpai, 2020). Dessa forma, o estado fisiológico também influencia diretamente a aquisição e evocação de memórias, atuando como um “contexto endógeno”.

As diferenças entre os sexos nas tarefas de memória são amplamente documentadas. Por exemplo, diferenças atencionais e exploratórias entre machos e fêmeas em ambientes novos podem resultar em distintas

representações contextuais, afetando o desempenho em tarefas dependentes de hipocampo. Fêmeas em tarefas de memória espacial tendem a empregar estratégias distintas das dos machos, moduladas pelos níveis de hormônios ovarianos, alternando entre estratégias egocêntricas e alocêntricas conforme a fase do ciclo estral (Gresack & Frick, 2006; Luine et al., 1998; McEwen & Milner, 2017). Alguns trabalhos, porém, não encontraram correlação entre ciclo e desempenho em tarefas espaciais (Keeley et al., 2013). De modo geral, machos apresentam desempenho superior em tarefas de navegação espacial, especialmente na ausência de pistas externas — efeito observado também em humanos. Embora as memórias espaciais não sejam o foco deste trabalho, por também dependerem do hipocampo, compartilham diversos mecanismos e aspectos com o condicionamento contextual. Assim, podem contribuir para a compreensão de como as diferenças sexuais nas forças associativas e nas estratégias de aprendizado constituem um dos fatores determinantes da perda de precisão contextual observada em determinados parâmetros experimentais, manifestando-se, consequentemente, na dinâmica da generalização contextual. Fêmeas apresentam pior desempenho na codificação de erros de predição — um efeito também relatado em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (Homan et al., 2019; Ross et al., 2018). Assim, é possível que a generalização precoce do medo observada em fêmeas decorra de um desempenho inferior na aquisição das associações entre estímulo condicionado e incondicionado (EC–EI) e no processamento dos erros de predição (Asok et al., 2019). No condicionamento aversivo ao contexto, fêmeas frequentemente apresentam desempenho inferior (Asok et al., 2019; Gresack & Frick, 2006; Maren et al., 1994; Wood & Shors, 1998), embora, em alguns casos, isso reflita um *delay* na aprendizagem mediado por hormônios sexuais (Keiser et al., 2017; Wiltgen et al., 2001). Outros estudos viram o contrário ou não encontraram diferença entre sexos quando a fase estral não foi levada em conta (Colon et al., 2018; Cossio et al., 2016; Keiser et al., 2017). Em nossos experimentos, observamos diferenças de *freezing* entre machos e fêmeas intactos apenas no teste de memória recente (2 dias), e apenas em um grupo experimental (Capítulo I, Figura 1). Essa diferença desapareceu em animais intactos testados em outro momento (Capítulo I, Figura 2) e em ratos submetidos a gonadectomia (Capítulo II, Figura 3). Não analisamos a fase estral desses grupos, porém um experimento

piloto anterior, embora preliminar, sugere que a fase estral não exerce efeito significativo sobre a resposta de medo na memória recente (2 dias) no contexto A, a despeito de ser necessário aumentar o N amostral para confirmar essa hipótese (Apêndice I, Figura 1).

Estudos utilizando tarefas dependentes do hipocampo — incluindo condicionamento não aversivo e aprendizagem espacial — indicam que, em machos, a maior ativação hipocampal está associada a um melhor condicionamento (Koss & Frick, 2017; McEwen & Milner, 2017). A idade dos animais pode exercer influência significativa sobre essa diferença (Bucci et al., 1995), já que as distinções na aquisição de representações contextuais emergem ao longo do desenvolvimento e acompanham a maturação de diferentes estruturas encefálicas (Colon et al., 2018; Crestani et al., 2022; Grissom et al., 2013; Willing & Juraska, 2015). Por exemplo, o número de neurônios no córtex pré-frontal (PFC) de ratos fêmeas diminui drasticamente entre os dias PND25 e 90, e essa reorganização estrutural está associada à redução dos níveis de *freezing* quando expostas ao contexto de condicionamento, possivelmente associada a uma maior eficiência inibitória desempenhada por essa área cerebral. Em contraste, ratos machos não apresentam essa diminuição volumétrica do PFC ao longo do mesmo período (Willing & Juraska, 2015). De modo semelhante, o número de neurônios na amígdala basolateral reduz-se em fêmeas entre os PND35 e PND90, mas não em machos da mesma idade (Rubinow & Juraska, 2009). Esses achados convergem com estudos que investigaram a dinâmica da discriminação contextual em ratos machos e fêmeas adolescentes e adultos jovens, nos quais as fêmeas tendem a apresentar maiores níveis de *freezing* na juventude e menores na fase adulta, em comparação aos machos (Colon et al., 2018; Crestani et al., 2022; Lotz et al., 2025).

Curiosamente, observa-se uma maior ativação do hipocampo em machos durante o condicionamento aversivo ao contexto, no qual o estímulo condicionado (EC) corresponde ao ambiente estático e a seus componentes persistentes (*background cues*). Por outro lado, em tarefas de condicionamento aversivo ao tom, nas quais o EC é um estímulo discreto e pontual — como a apresentação de um tom que sinaliza a iminência de um choque nas patas

(*foreground cues*) —, verifica-se um dimorfismo sexual na ativação da amígdala, sendo essa estrutura mais recrutada em fêmeas do que em machos (Keiser et al., 2017). Considerando que diferentes estratégias de aprendizagem podem gerar competição associativa entre o hipocampo — responsável pelo processamento de dicas espaciais — e a amígdala — relacionada às dicas de estímulo —, potencialmente resulta em diferenças sexuais. É amplamente estabelecido que o hipocampo, especialmente sua porção dorsal, é essencial para a consolidação e o armazenamento de memórias contextuais recentes (Frankland & Bontempi, 2005), enquanto a amígdala confere a valência emocional às memórias de medo e é necessária para sua evocação (Quillfeldt et al., 1996), e a atividade hipocampal durante uma tarefa comportamental pode suprimir a ativação amigdalar, e vice-versa (Biedenkapp & Rudy, 2009; McIntyre et al., 2002). Essa competição entre representações contextuais detalhadas sustentadas pelo hipocampo e aquelas mais genéricas mediadas pela amígdala pode determinar a precisão contextual da memória.

O condicionamento aversivo ao contexto depende da integração de múltiplas pistas sensoriais (olfativas, tácteis, auditivas e visuoespaciais) (Fanselow, 2000), e um aspecto particularmente interessante diz respeito às diferenças nas forças de associação entre os sexos. Le et al. (2024) observaram que a associação entre odores e contexto varia entre camundongos machos e fêmeas adultos. Machos apresentaram uma forte associação entre um único odor e o contexto em que foi pareado, mas não em um contexto novo, sugerindo uma maior saliência dos elementos espaciais (“onde”) na evocação da memória. Já as fêmeas evocaram a associação entre diferentes odores e o contexto apenas quando os estímulos foram apresentados de forma seriada, demonstrando uma maior dependência de elementos discriminatórios e temporais (“o que” e “quando”). De maneira semelhante, nas tarefas de reconhecimento ou localização de objetos, as fêmeas tendem a recordar melhor a identidade dos itens (“o que”), enquanto os machos utilizam mais informações espaciais (“onde”), sugerindo diferenças sexuais no recrutamento de estruturas hipocampais, perirrinais e neocorticais (Barker & Warburton, 2020; Kinnavane et al., 2016). A pré-exposição ao contexto antes do treino também modula a forma como a memória é posteriormente evocada, e essa modulação difere entre os

sexos: a discriminação contextual tende a ser favorecida em fêmeas, enquanto é prejudicada em machos (Asok et al., 2019; Keiser et al., 2017), reforçando a ideia de diferenças na força associativa entre sexos.

Visto que um contexto pode ser compreendido como um conjunto de elementos sensoriais distintos que convergem para formar uma representação contextual, é relevante notar que esses elementos contribuem de maneira diferente para a generalização da memória entre os sexos (Capítulo I). Identificamos diferenças na dinâmica temporal entre ratos adultos machos e fêmeas, refletidas em sensibilidades distintas a diferentes parâmetros ao longo do tempo. De modo geral, fêmeas apresentam maior perda da capacidade discriminatória para elementos táteis e dimensionais da caixa do que machos, sugerindo diferenças importantes na evocação de memórias contextuais remotas (Resultados PCA, Apêndice I).

Essas diferenças podem ser parcialmente explicadas pelo mecanismo de deriva representacional (*representational drift*, em inglês), que propõe que o cérebro mantém um mapa ou representação interna do mundo externo, o qual pode sofrer transformações ao longo do tempo (Driscoll et al., 2022). Esse processo, decorrente do fluxo molecular contínuo, pode ter evoluído como um mecanismo que permite aos sistemas biológicos preservar a consistência das propriedades essenciais de células e redes neurais, favorecendo a regulação homeostática e garantindo certa compatibilidade entre os padrões de ativação neuronal e o engrama alocado durante a aquisição da memória (Marder & Goaillard, 2006; Sweis et al., 2021). A deriva representacional reflete tanto desafios quanto benefícios para os processos neurocomputacionais, podendo inclusive afetar o grau de detalhamento contextual das memórias por meio de mecanismos de inferência Bayesiana. Nessa perspectiva, o resultado probabilístico da eficiência sináptica depende de fatores como o “peso” sináptico e a margem de erro baseada em incertezas ou ruídos durante a aquisição (Aitchison et al., 2021; Driscoll et al., 2022; Kappel et al., 2015). Em nível de redes neurais, margens de erro mais amplas atribuídas às sinapses implicam em maior taxa de aprendizagem e de deriva, o que complementa a hipótese de *tagging* sináptico, segundo a qual as conexões sinápticas entre diferentes regiões cerebrais podem se fortalecer ao longo do tempo (Kappel et al., 2015; Redondo & Morris, 2011;

Rogerson et al., 2014). Dessa forma, é possível que diferenças sexuais nesses mecanismos computacionais resultem em dinâmicas distintas do engrama, de modo que fêmeas possivelmente adquiram o aprendizado dependente do hipocampo com maior margem de erro ou maior presença de ruído.

A taxa de deriva representacional pode ser modulada por interações contínuas com um estímulo ou contexto e pela atenção sustentada, resultando na estabilização de representações enquanto estas se mantêm relevantes no ambiente (Kinsky et al., 2020; Muzzio et al., 2009). Esse fenômeno pode ter implicações diretas para a precisão da memória em protocolos que envolvem múltiplas exposições aos estímulos condicionados. Outra implicação interessante, embora fora do escopo deste trabalho, são as reativações durante o sono na taxa de deriva e sua relação com a consolidação sistêmica da memória.

Em um trabalho do grupo citado anteriormente, de Oliveira Alvares e colaboradores avaliaram o efeito de reativações repetidas, intercaladas entre o treino e o teste, sobre a consolidação sistêmica da memória contextual de medo (de Oliveira Alvares et al., 2012). Ratos submetidos a sessões de reativação no contexto de condicionamento foram capazes de discriminar entre o contexto de condicionamento e um neutro por mais tempo, sugerindo que reativações sequenciais fortalecem a representação contextual e prolongam a dependência hipocampal. De modo semelhante, Schoonover et al. (2021) demonstraram que a frequência de apresentação de um estímulo olfativo — mas não sua valência — influenciou a velocidade da deriva representacional no córtex piriforme de roedores. Já a inibição farmacológica do córtex entorrinal lateral (LEC) estabilizou o engrama no córtex pré-límbico ao suprimir a deriva (Pilkiw et al., 2022), o que pode ter implicações relevantes para a evocação generalizada da memória de medo. Em nosso trabalho (Capítulo III), a inativação temporária do LEC em ratos adultos machos prejudicou a expressão da memória generalizada aos 28 dias, porém apenas no contexto novo que compartilhava características táteis e dimensionais com o contexto de condicionamento (Capítulo III, Figura 5B). Embora não tenhamos realizado esse experimento específico em fêmeas para investigar possíveis diferencias sexuais, esses achados reforçam que

certos tipos de variáveis contextuais — embora não todas — são fundamentais para a generalização da memória (Capítulo I).

7.2 Caminhos múltiplos para a generalização da memória

Diversas teorias têm sido propostas para explicar os mecanismos subjacentes à generalização da memória contextual de medo. Uma delas postula que a perda de precisão contextual decorre de um processo de esquecimento de atributos específicas de estímulos (Riccio et al., 1992), outras a associam a processos de neofobia ou medo induzido pela novidade (Greggor et al., 2015; Kumaran & Maguire, 2006; Maren, 2014), ou ainda a processos não associativos, como a sensibilização (Nishimura et al., 2022; Pamplona et al., 2011; Poulos et al., 2016).

Com relação à dinâmica temporal, a generalização da memória pode ocorrer por, pelo menos, dois caminhos distintos: um dependente do tempo, compreendido como parte do próprio processo de consolidação sistêmica, e outro independente do tempo, que pode ser induzido rapidamente.

7.2.1 Generalização dependente do tempo

Uma das abordagens experimentais para investigar a participação de estruturas encefálicas específicas em processos mnemônicos é o uso de manipulações farmacológicas de ativação ou inibição neuronal. O muscimol, por exemplo, é um alcaloide psicoativo e agonista seletivo dos receptores $GABA_A$, além de agonista parcial dos receptores $GABA_C$, com efeitos hipnóticos e dissociativos (DeFeudis, 1982; Gussin et al., 2006). Quando administrado localmente, o muscimol promove uma supressão temporária da atividade neuronal, constituindo, assim, uma ferramenta robusta para estudos de perda de função reversível (Majchrzak & Di, 2000) (Figura 6).

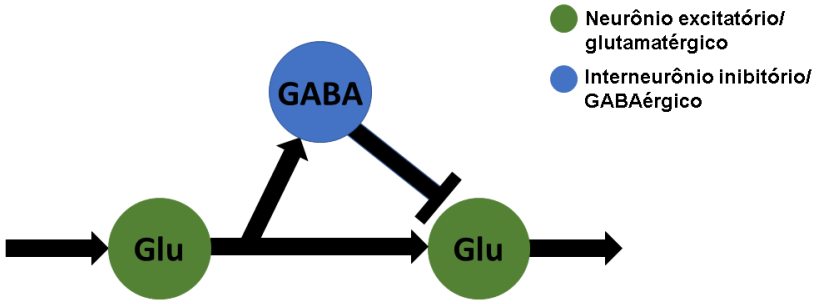


Figura 6. Esquema representativo dos circuitos locais no hipocampo e no córtex cingulado anterior. O agonista GABAérgico muscimol está associado à supressão da atividade neuronal quando administrado localmente. Fonte: autora.

Em alguns dos primeiros estudos sobre o papel de diferentes estruturas na consolidação sistêmica, o antagonista de receptores AMPA e de cainato (CNQX) foi infundido na amígdala, no HPC, no LEC ou no córtex parietal posterior antes do teste de esquiva inibitória, realizado em intervalos recentes e remotos após o treino. Esses trabalhos revelaram dinâmicas distintas de recrutamento entre pallidum medial (hipocampo), córtex lateral (entorrinal) e pallidum dorsal (neocórtex), seguindo uma hierarquia temporal (Figura 7).

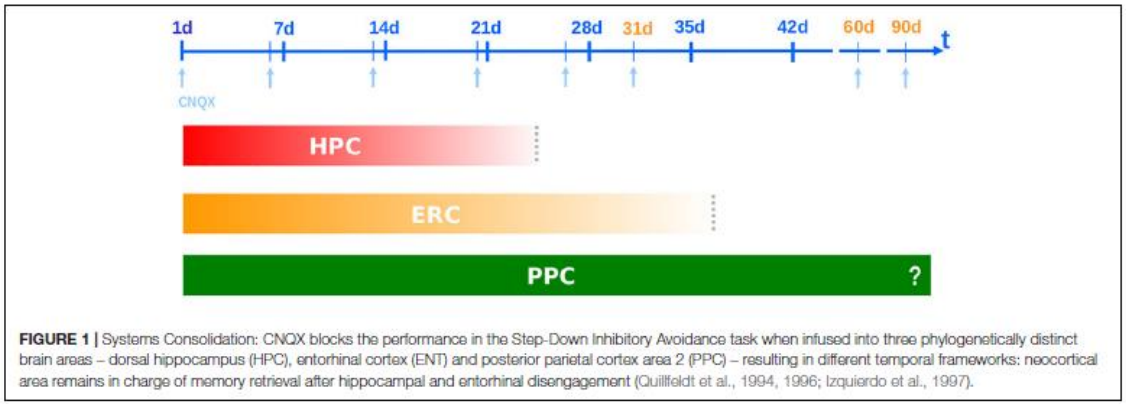


Figura 7. Exemplo da dinâmica temporal da consolidação sistêmica envolvendo áreas distintas. Retirado de Quillfeldt (2019).

Em um estudo anterior do laboratório (de Oliveira Alvares et al., 2012), ratos machos adultos foram submetidos ao Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) e receberam infusões de muscimol ou veículo no campo CA1 do hipocampo dorsal antes da sessão de teste, realizada 2 ou 28 dias após o treino.

Aos 2 dias, o muscimol produziu um efeito amnéstico, indicando que a evocação da memória ainda dependia do hipocampo dorsal. Nesse intervalo, os animais foram capazes de discriminar entre o contexto condicionado e um contexto neutro. Já aos 28 dias, a infusão de muscimol no CA1 não produziu efeito, sugerindo que a memória havia se tornado independente do hipocampo para sua evocação. Nesse mesmo intervalo, observou-se também a perda de precisão contextual — os animais não mais discriminavam entre o contexto condicionado e um contexto novo, indicando a ocorrência de generalização dependente do tempo.

Em outro mais recente, embora os animais não tenham sido testados em um contexto novo, a consolidação sistêmica foi observada de forma mais tardia: o hipocampo deixou de participar aos 45 dias, enquanto o ACC passou a ser essencial para a evocação da memória, ilustrando de maneira elegante a transferência entre estruturas do pallidum medial (HPC) e dorsal (ACC) (Haubrich et al., 2016).

De modo semelhante, nossos resultados com inativação farmacológica indicam uma transferência do hipocampo para áreas corticais, consistente com os trabalhos mencionados acima (Capítulo III). Curiosamente, porém, em adolescentes esse efeito ocorreu apenas em fêmeas (Anexo I), enquanto em adultos foi observado somente em machos (Capítulo III, Figura 6). Em contrapartida, embora o dHPC deixasse de ser necessário para a evocação da memória aos 28 dias no contexto de condicionamento tanto em machos quanto em fêmeas adultas, nas fêmeas o ACC não foi requerido em nenhum dos intervalos avaliados (Apêndice III, Figura 1), sugerindo que a consolidação sistêmica pode demandar um período mais prolongado nas fêmeas. Essa interpretação é compatível com nossos dados de fêmeas controle (*sham*) testadas no mesmo contexto novo aos 28 dias, que mantiveram a discriminação contextual nesse intervalo (Capítulo II, Figura 1C). Em contraste, os machos, na maior parte dos experimentos utilizando esse contexto, apresentaram generalização da memória aos 28 dias (Capítulo III, Figuras 1, 2B e 3B).

Essas diferenças entre os sexos ressaltam os efeitos moduladores dos hormônios sexuais sobre essa dinâmica temporal.

7.2.2 Generalização independente do tempo

A expressão de medo generalizado pode ser também induzida de forma rápida e independente do tempo. Em fêmeas, esse efeito pode ser atribuído, em parte, à ação do estradiol mediada pelo receptor citosólico de estrogênio beta (ERβ) (Lynch et al., 2013, 2014). Nesses estudos, observou-se que a administração sistêmica aguda (15μg, s.c.) de 17β-estradiol (E2) — em dose equivalente aos níveis circulantes durante a fase de proestro (Kato et al., 2013) — não interferia na aquisição ou na consolidação, mas sim na evocação da memória de medo contextual de longo prazo (Jasnow et al., 2017; Lynch et al., 2014). Além disso, o efeito de generalização induzido por essa reposição aguda de estradiol mostrou-se transitório, com duração aproximada de 48 horas. Dessa forma, os efeitos do estradiol na generalização da memória contextual de medo sugerem que níveis elevados desse hormônio favorecem a generalização. Em experimentos complementares, o mesmo grupo avaliou machos orquiectomizados com reposição aguda de propionato de testosterona (TP) (2 mg, s.c.) administrada no dia anterior ao teste. Verificou-se que a aromatização da testosterona em estradiol atenuou a generalização do medo comparado ao grupo que recebeu apenas veículo, por meio da ativação dos receptores ERα e ERβ, mas não do receptor androgênico (AR) (Lynch et al., 2016).

Na presente tese, fêmeas OVX testadas aos 28 dias e submetidas à reposição de estradiol (15μg, s.c.) apresentaram generalização da memória de medo em comparação aos grupos controle (*sham*) e OVX + veículo, evidenciando uma influência direta desse hormônio no processo de generalização (Capítulo II, Figura 3A). Embora múltiplos fatores possam estar envolvidos, resultados preliminares da análise de expressão de genes de expressão imediata e moduladores da manutenção da memória em amostras de dHPC desses animais sugerem que EGR-1 e PKMζ possam desempenhar um papel nesse fenômeno.

Assim, a presença e a modulação hormonal no tecido neural exercem efeitos significativos sobre os processos de memória de longo prazo. A redução dos níveis circulantes de hormônios gonadais — ou o bloqueio farmacológico de seus receptores — pode resultar em alterações cognitivas, incluindo transformações

qualitativas da memória como a generalização independente do tempo (Lynch et al., 2013, 2016).

7.3 Diferenças sexuais na dinâmica temporal da consolidação sistêmica: da adolescência tardia à idade adulta

A adolescência constitui uma fase evolutiva altamente conservada entre os mamíferos, tanto em termos comportamentais quanto fisiológicos. Nesse período do desenvolvimento, os indivíduos enfrentam pressões evolutivas associadas à maturação sexual e à transição de um estado de dependência parental para a independência. Assim, animais adolescentes e inexperientes se beneficiam de uma rápida aquisição de repertórios comportamentais que favorecem a sobrevivência. A generalização precoce de memórias de medo durante a adolescência pode, portanto, facilitar a transferência de aprendizados anteriores para novas situações — um mecanismo adaptativo em uma fase caracterizada por maior busca por recompensas e menor avaliação de risco.

Durante a adolescência, o cérebro passa por um processo dinâmico de maturação, especialmente nas regiões mesocorticolímbicas (Spear, 2004). Por exemplo, ocorrem mudanças volumétricas específicas de sexo em estruturas fundamentais para a modulação da memória e de funções executivas, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (Giedd et al., 2006; Koshibu et al., 2004). Além disso, a remodelação do córtex pré-frontal difere entre machos e fêmeas, sendo que estas últimas apresentam maturação mais precoce.

Essas diferenças na maturação estrutural entre os sexos podem ter implicações relevantes para a consolidação sistêmica da memória contextual de medo. Em um estudo anterior do laboratório (Anexo I) (Crestani et al., 2022), observamos diferenças sexuais na dinâmica temporal da generalização da memória entre ratos fêmeas e machos adolescentes tardios (treinados com idades entre PND 42–47). Enquanto as fêmeas exibiram um perfil temporal de generalização dependente do tempo semelhante ao observado em animais adultos — embora mais precoce em comparação às fêmeas adultas (Apêndice III) —, os machos não foram capazes de discriminar contextos em nenhum dos intervalos testados.

Além disso, quando muscimol foi infundido no dHPC 14 dias após o treino — intervalo em que apenas as fêmeas discriminavam entre os contextos —, verificou-se que essa área era necessária para a evocação apenas nelas. Esses resultados indicam que, nos parâmetros experimentais utilizados, a consolidação sistêmica de fato ocorreu apenas nas fêmeas adolescentes.

Um grupo adicional de fêmeas foi submetido à ovariectomia (PND 30–33), treinadas durante a adolescência tardia (PND 42–47) e testadas 14 dias após o treino, no contexto de condicionamento ou em um novo. Interessantemente, essas fêmeas ovariectomizadas não foram capazes de discriminar entre contextos nesse intervalo pós-treino — um perfil semelhante ao dos machos —, sugerindo que a remoção dos ovários nesse período crítico de organização cerebral foi determinante nessa diferença. Curiosamente, embora não tenhamos testado juvenis OVX na memória recente (2 dias), fêmeas OVX adultas que não receberam reposição hormonal não discriminaram entre contextos nesse intervalo pós-treino (Capítulo II).

Como mencionado anteriormente, em adultos, observamos também diferenças marcantes na dinâmica temporal da consolidação sistêmica. Contrastando com os resultados obtidos em adolescentes, os machos adultos generalizam a memória por volta dos 28 dias, intervalo em que ocorre a transferência da dependência do dHPC para o ACC (Capítulos I, II e III). As fêmeas, por outro lado, apresentam generalização mais tardia em relação aos machos (Capítulos I e II), indicando um perfil distinto de consolidação sistêmica. Conquanto o padrão de ativação do dHPC aos 2 e 28 dias seja bastante similar ao observado nos machos, o ACC não se mostrou necessário em nenhum desses intervalos (Capítulo III e Apêndice III).

7.4 Hormônios sexuais e ansiedade

A presença de hormônios sexuais pode influenciar os níveis de ansiedade em fêmeas (Marcondes et al., 2001). Embora diversos estudos relatem redução do medo e da ansiedade em ratas tratadas com estrogênio (Bowman et al., 2002; Frye et al., 2000; Luine et al., 1998; Walf et al., 2009), outros observaram o efeito

oposto, com aumento dos comportamentos do tipo ansioso em diferentes tarefas após reposição estrogênica (Jasnow et al., 2006; Morgan et al., 2004; Nofrey et al., 2008; Toufexis, 2007). Essa divergência pode ser explicada, em parte, por diferenças na dose utilizada, na duração da reposição hormonal (aguda ou crônica) e na via de administração (Byrnes et al., 2012; Jacome et al., 2010).

Além desses fatores, os distintos efeitos do estrogênio sobre a ansiedade podem decorrer da ativação diferencial de subtipos de receptores estrogênicos. Por exemplo, a ativação do receptor de estrogênio beta (ERβ) tem sido associada a efeitos ansiolíticos (Bodo & Rissman, 2006; Lund et al., 2005) e sua expressão pode ser aumentada após tratamento crônico com estradiol, enquanto o mesmo não ocorre com o ERα (Jin et al., 2005).

Em nossos experimentos no labirinto em cruz elevado, não observamos efeito da manipulação pelas experimentadoras sobre o comportamento do tipo ansioso em fêmeas não-gonadectomizadas (Capítulo I, Figura 4), sugerindo que o protocolo empregado afeta de maneira distinta as estruturas subjacentes ao comportamento ansioso, como a amígdala e o núcleo do leito da estria terminal (BNST).

A amígdala, estrutura central do sistema límbico, é composta por diversos núcleos envolvidos na expressão de estados de medo, ansiedade e comportamentos maternos e reprodutivos — como a lordose em fêmeas e a ejaculação em machos. Nas fêmeas, há grande variação na densidade e morfologia de espinhos dendríticos nos núcleos amigdalares ao longo do ciclo estral (Rasia-Filho et al., 2004). Enquanto a amígdala está mais associada ao processamento de ansiedade aguda e de respostas imediatas de medo, o BNST atua predominantemente no processamento de ameaças difusas e estados de ansiedade prolongada, exercendo efeitos mais duradouros sobre o comportamento (Walker et al., 2003). O núcleo central da amígdala (CeA) é preferencialmente recrutado em respostas emocionais de curto prazo a estímulos discretos no condicionamento pavloviano, enquanto o BNST é mais engajado em respostas emocionais de longo prazo associadas ao contexto (Toufexis, 2007).

Conhecido como “amígdala estendida”, o BNST é uma estrutura sexualmente dimórfica, sendo aproximadamente duas vezes maior e contendo maior número de células em machos do que em fêmeas (Kanaya et al., 2014; Murray et al., 2009). Ele funciona como centro integrador de estruturas envolvidas na expressão de comportamentos potencialmente dimórficos, como a regulação do estresse, ansiedade, funções de recompensa e comportamentos sociais, incluindo agressividade. Além disso, o BNST pode participar da generalização da memória. No nível sistêmico, o BNST recebe projeções do hipocampo ventral (Dong et al., 2001), estrutura fundamental na generalização dependente do tempo (Cullen et al., 2015; Casagrande et al., 2023).

Diferenças sexuais também são observadas em nível molecular. A enzima aromatase é expressa em várias regiões cerebrais sensíveis à ação estrogênica, como a amígdala, o BNST, a área pré-óptica medial e o hipocampo dorsal. Em machos intactos, há maior expressão de aromatase no BNST em comparação a machos orquiectomizados, que apresentam níveis equivalentes aos de fêmeas, independentemente da ovariectomia (Tabatadze et al., 2014; Wagner & Morrell, 1997). Essa redução pode ser revertida pela reposição com testosterona (Spool et al., 2022), evidenciando que os hormônios gonadais circulantes modulam a produção de aromatase principalmente em machos. Consequentemente, há maior expressão de ERβ nessas regiões (Zhang et al., 2002). De forma semelhante, a amígdala de machos apresenta níveis mais elevados de mRNA de aromatase do que a de fêmeas (Tabatadze et al., 2014). Assim, os hormônios sexuais exercem efeitos relevantes sobre estados emocionais em ambos os sexos.

Níveis elevados de ansiedade durante o condicionamento poderiam resultar em menor comportamento exploratório ou em alterações de atenção e foco, culminando em representações contextuais mais frágeis e, portanto, mais suscetíveis à generalização. Contudo, embora não testemos fêmeas manipuladas e não manipuladas em contexto novo, as diferenças observadas no contexto de treino não parecem ser atribuíveis à ansiedade (Capítulo I, Figura 4).

A generalização do medo contextual tem sido associada à ativação do ERβ citosólico em fêmeas (Lynch et al., 2016) — receptor possivelmente relacionado

à diminuição do comportamento do tipo ansioso —, e dado que todos os grupos (OVX + Veh, OVX + E2 e *sham*) apresentaram níveis equivalentes de *freezing* no contexto de condicionamento (Capítulo II, Figura 1), é improvável que o aumento da resposta de medo no contexto novo se deva a diferenças em níveis de ansiedade.

A gonadectomia sem reposição hormonal pode exercer efeitos opostos sobre a síntese de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) em machos e fêmeas. Em fêmeas, a ovariectomia reduz a síntese de CRH no hipotálamo, efeito não revertido pela reposição de estradiol; já em machos, a redução de andrógenos aumenta a produção de CRH e corticosterona após uma experiência estressante, efeitos que podem ser revertidos pela reposição com testosterona ou DHT (Bingaman et al., 2008; Haas & George, 1989). Esses achados são consistentes com nossos resultados em machos OCX testados em contexto novo (C) (Capítulo II, Figura 4), que apresentaram altos níveis de *freezing* aos 2 dias (Capítulo I, Contexto P1', Figura 1; Capítulo III, Contexto C, Figura 1). A reposição aguda com testosterona no dia anterior ao teste atenuou o medo nesse contexto, possivelmente por reduzir a ansiedade basal ou por modular negativamente a atividade da amígdala (Chen et al., 2014).

7.5 Estrogênio, estresse e espinhos

A interação entre hormônios gonadais e o sistema de estresse pode ajudar a elucidar os mecanismos subjacentes aos processos de memórias aversivas.

Diversos estudos demonstram o efeito do estrogênio sobre a densidade e morfologia de espinhos dendríticos (Koss & Frick, 2017). Fêmeas em proestro apresentam maior densidade de espinhos em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo, quando comparadas a machos e a fêmeas em fases estrais de baixo estrogênio, e esse aumento pode ser atenuado por estressores ou fatores ambientais (Shors et al., 2001). Em nossos experimentos, observamos que fêmeas manipuladas (*handled*) diariamente por sete dias consecutivos exibiram uma atenuação da resposta condicionada de medo quando testadas dois dias após o treino, porém essa manipulação não afetou nos níveis de

ansiedade (Capítulo I, Figura 4). Embora a fase estral não tenha sido verificada nesse momento, um estudo piloto anterior sugere que ela não influencia significativamente o comportamento de *freezing* durante o condicionamento (Apêndice I, Figura 1).

Ao comparar fêmeas ovariectomizadas com e sem reposição aguda de estrogênio, treinadas e testadas no mesmo contexto e intervalo, verificamos que fêmeas operadas gonadalmente intactas (grupo *sham*) apresentaram menor coeficiente de variação (20%) em comparação aos grupos OVX + Veículo (27%) e OVX + E2 (28%) (Capítulo II, Figura 1B). O grupo *nonhandled* apresentou variação similar (32%), enquanto o grupo *handled* mostrou maior variabilidade (49%), sugerindo a influência de fatores adicionais que, em conjunto ou independentemente da fase estral, podem ter contribuído para o aumento da variabilidade comportamental.

O eixo HPA é particularmente sensível aos efeitos do estrogênio e, portanto, conhecer os mecanismos de interação com os hormônios gonadais pode lançar luz sobre essas diferenças. As fêmeas podem apresentar maior sensibilidade a estressores em comparação aos machos, e esse efeito pode variar de acordo com a fase estral, sendo que fêmeas em proestro são mais vulneráveis aos efeitos do estresse (Daviu et al., 2014; Viau & Meaney, 1991). Em resposta a estressores, fêmeas exibem um aumento mais rápido nos níveis de corticosterona em comparação aos machos e chegam a apresentar níveis mais elevados desse hormônio (Babb et al., 2013; Hodes et al., 2024), embora dependa do tipo de estressor (Babb et al., 2013). O glicocorticoide corticosterona é um hormônio essencial nas respostas de estresse, medo e ansiedade. Sua liberação é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que, por sua vez, é estimulado pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), principalmente pelo hipotálamo. O CRH contém *estrogen response elements* (EREs) e, dessa forma, o tratamento com estrogênio aumenta a expressão de CRH no núcleo central da amígdala, possivelmente atuando como mediador entre estrogênios e a expressão de medo.

Em machos, as respostas do eixo HPA a estressores sofrem modificações ao longo da puberdade. Embora machos pré-púberes e adultos apresentem respostas iniciais semelhantes ao estresse, animais mais jovens exibem um

retorno mais lento aos níveis basais quando comparados aos adultos, sugerindo um papel organizador dos hormônios sexuais na programação e maturação funcional do eixo HPA (Oyola & Handa, 2017; Romeo et al., 2006).

A desregulação da via do estresse contribui para o desenvolvimento de transtornos como o TEPT, que apresenta prevalência mais alta em mulheres, sugerindo uma interação entre o eixo hipotálamo–pituitária–adrenal (HPA) e hormônios sexuais no desenvolvimento desse transtorno (Lawrence & Scofield, 2024). Estruturas relacionadas ao estresse e à ansiedade, como o BNST, têm seu funcionamento alterado tanto por experiências aversivas quanto pela interação com hormônios e outros sinalizadores (Ressler et al., 2011). Por exemplo, no BNST a sinalização do peptídeo ativador de adenilil ciclase da pituitária (PACAP) e corticosterona interagem para produzir respostas ao estresse (Lezak et al., 2014; Roman et al., 2014). O PACAP está associado a sintomas mais graves de TEPT e a aumento de medo em tarefas de discriminação entre dicas sinalizando segurança e outras sinalizando ameaça. O estrogênio tem um papel importante na regulação desse sistema, e apenas ratos fêmeas que receberam reposição crônica de estrogênio desenvolveram sintomas fisiológicos de TEPT devido a um polimorfismo no receptor PAC1 (que contém um ERE) (Ressler et al., 2011).

Apesar de ainda não estar claro até que ponto o estado de ansiedade durante a consolidação ou evocação afeta a especificidade da memória de medo contextual (Capítulo I), as interações entre o sistema límbico e o eixo HPA podem levar ao aumento de níveis circulantes de corticosterona em roedores, o que sabidamente altera o curso temporal da consolidação sináptica (Casagrande et al., 2018) e sistêmica (Dos Santos Corrêa et al., 2019; Pedraza et al., 2016). Portanto, esse pode ser um mecanismo relevante no dimorfismo observado na generalização do medo.

As interações entre hormônios gonadais e o eixo HPA podem acarretar efeitos sobre a plasticidade neural, especialmente no hipocampo, que é particularmente sensível aos efeitos fisiológicos do estresse, como a atrofia dendrítica (Pawlak et al., 2005). Por exemplo, Frick et al. (2004) observaram aumento na densidade de espinhos no CA1 de fêmeas ovariectomizadas que receberam estradiol, efeito revertido em ratos OVX submetidas ao treino no labirinto aquático,

possivelmente devido ao estresse inerente ao protocolo. Dessa forma, é possível que nosso grupo de fêmeas manipuladas extensivamente (3 min por dia, por 7 dias consecutivos) tenha apresentado atenuação na densidade de espinhos, resultando em um traço mnemônico enfraquecido e, consequentemente, menor expressão de medo no contexto aversivo. Embora Frick et al. (2004) tenham sugerido que a redução na densidade de espinhos se deve ao estresse, como não foram mensurados níveis de corticosterona ou outros marcadores, é possível, também, que o aprendizado espacial dependente de hipocampo (labirinto aquático) tenha influenciado a realocação de uso sináptico (Haubrich et al., 2016; Quillfeldt, 2019; Wartman & Holahan, 2014).

A formação de espinhos dendríticos tem sido associada a características funcionais do sistema nervoso central (De Roo et al., 2008), incluindo processos mnemônicos (Restivo et al., 2009). Entretanto, certa cautela é necessária ao relacionar o desenvolvimento e maturação de espinhos dendríticos à expressão de comportamentos, como respostas de medo aumentadas na evocação de memórias aversivas. Enquanto a arborização dendrítica e axonal e a organização espacial dos neurônios permanecem relativamente estáveis por longos períodos, a remodelação de espinhos dendríticos e botões sinápticos pode ser muito mais rápida e suas mudanças menos duradouras. Essa dinâmica varia de acordo com a morfologia: espinhos imaturos (filopodia) podem ser altamente transitórios quando não há estímulo contínuo, enquanto espinhos maduros (do tipo cogumelo) podem persistir por longos períodos. Além disso, apenas espinhos mais maduros apresentam ampla inserção de receptores AMPA e, posteriormente, NMDAR em suas membranas, fazendo a transição de sinapses silenciosas para funcionais (Isaac et al., 1995).

Esse fato levanta questões importantes sobre os efeitos da reposição hormonal na morfologia dos espinhos, além de sua densidade. Por exemplo, um estudo avaliou o efeito de injeções sistêmicas de 17β-estradiol por cinco dias consecutivos em camundongos fêmeas ovariectomizadas antes da eutanásia no sétimo dia para a contagem de espinhos. Observou-se que esse regime de reposição aumentou a densidade de espinhos do tipo filopódio em relação aos do tipo cogumelo, sem alterar a densidade total de espinhos (Li et al., 2004). Embora vários estudos *in vivo* demonstrem efeito da injeção sistêmica ou infusão

intra-hipocampal de E2 no aumento da densidade de espinhos dendríticos em ratos e camundongos (Jacome et al., 2016; Koss & Frick, 2017; Luine et al., 2018; Tuscher et al., 2016), esse efeito costuma ser rápido, o que pode explicar a divergência entre os resultados de Li et al. (2004) e outros trabalhos, visto que a última reposição ocorreu dois dias antes da eutanásia, sugerindo um efeito transitório nesse caso.

É importante ressaltar que há diferenças entre ratos e camundongos que podem dificultar comparações entre estudos com espécies distintas. No caso do tratamento com E2, embora existam efeitos paralelos na memória dependente de hipocampo entre espécies, as bases estruturais desses efeitos podem diferir. Em ratos, a reposição com E2 pode favorecer o surgimento de novos espinhos, enquanto em camundongos pode influenciar a maturação de espinhos já existentes (Frick et al., 2018; Koss & Frick, 2017; Spencer et al., 2008).

7.6 E os androgênios?

Embora o foco da literatura esteja nos efeitos dos estrogênios, os androgênios também exercem papéis relevantes na plasticidade neural. No tecido neural, a testosterona é aromatizada em estrogênio e pode produzir efeitos similares ou diferenciados entre os sexos.

Por exemplo, em machos a gonadectomia reduz a densidade de espinhos no CA1, efeito revertido por reposição por dois dias de propionato de testosterona ou DHT, mas não por E2 (Leranth et al., 2003). Usando o mesmo protocolo, resultados semelhantes foram observados em fêmeas ovariectomizadas (Leranth et al., 2004). Após reposição aguda, tanto testosterona quanto E2 aumentaram a densidade de espinhos no CA1 apical após 30 minutos, mas com efeitos distintos após 2 horas, indicando temporalidades diferentes entre os hormônios (Jacome et al., 2016).

Dessa forma, esses dados sugerem que os efeitos do E2 sobre os espinhos são mais transitórios do que os dos androgênios, mas diferenças metodológicas — espécie, dose, protocolo e tarefa — precisam ser consideradas (Jacome et al., 2010; Spencer et al., 2008). No caso de nossos experimentos, é possível que a

administração de testosterona mais próxima ao teste tivesse produzido efeitos mais evidentes (Capítulo II).

7.7 Tratamento agudo versus crônico

É relevante traçar paralelos com estudos envolvendo ratos fêmeas mais velhas, nas quais as diferenças entre sexos podem ser atribuídas à senescência reprodutiva e, consequentemente, a alterações importantes no ciclo estral, como a disfunção ou diminuição da produção e da flutuação de hormônios ovarianos, incluindo estrogênio e progesterona (Markowska, 1999). Assim como ocorre em mulheres, os níveis de hormônios ovarianos em ratos variam ao longo do ciclo, embora, em roedores, a duração das fases estrais seja tipicamente de poucos dias ou até horas (Figura 8), sendo suscetível à influência de fatores biológicos, como idade, e ambientais, como condições de biotério.

Em ratos fêmeas, o ciclo estral infradiano, que se completa em aproximadamente 4 a 5 dias, é marcado por variações expressivas nos níveis de hormônios gonadais, particularmente estrogênios e progesterona. Em contraste, em machos os níveis de testosterona aumentam significativamente ao longo da puberdade e se mantêm relativamente estáveis durante a vida adulta, apresentando apenas pequenas flutuações como o pico circadiano de produção de andrógenos geralmente observado pela manhã, o qual favorece a espermatogênese (Oyola & Handa, 2017).

Em nosso biotério, machos e fêmeas não são alojados separadamente, o que pode levar à influência de feromônios na regulação do ciclo. Embora não tenhamos monitorado o ciclo por vários dias neste protocolo, verificações realizadas em outros experimentos mostram que há variação entre fêmeas (Apêndice I, Figura 1). Apesar dessa variabilidade, testes comportamentais com fêmeas não revelam maior variância nos níveis de *freezing* em tarefas aversivas quando comparadas aos machos, sendo a variação mais evidente entre fêmeas em tarefas específicas (Becker et al., 2016; Beery, 2018; Frick et al., 2015). Essa variação entre fases estrais pode ser melhor controlada, submetendo as fêmeas à ovariectomia com posterior reposição hormonal, utilizando regimes de

tratamento crônico ou agudo. Embora tratamentos crônicos possam se aproximar mais à flutuação natural de hormônios gonadais em fêmeas intactas, em situações nas quais se pretende simular o pico de estradiol do proestro, tratamentos agudos tendem a refletir com maior precisão o aumento expressivo de E2 circulante e, portanto, os efeitos observados em estudos com fêmeas intactas (Figura 8) (Lynch et al., 2013, 2014).

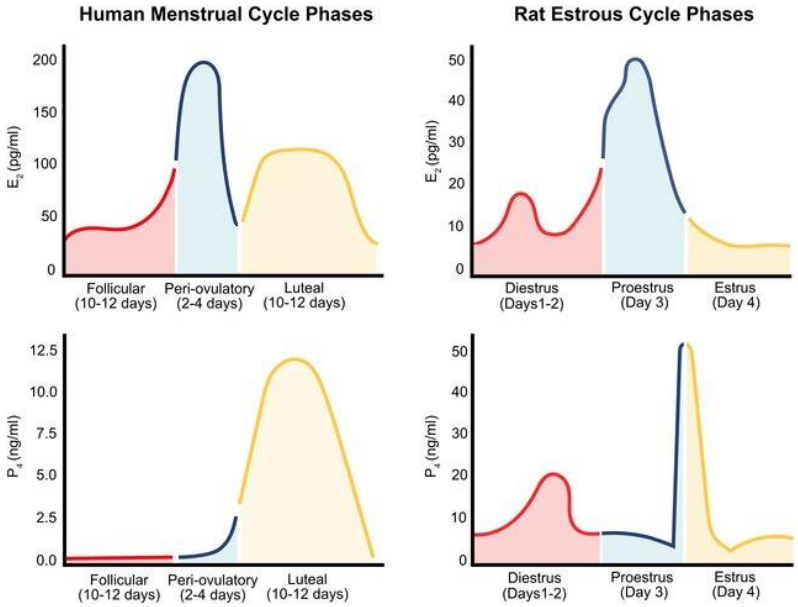


Figura 8. Comparação entre o ciclo menstrual humano e o ciclo estral do rato em termos de duração e flutuações nos níveis circulantes de estrogênio e progesterona. Tirado de Kokane & Perotti (2020).

Alguns estudos mostram diferenças entre os efeitos de estradiol crônico e agudo administrado sistemicamente sobre comportamento de medo e do tipo ansioso (Luine et al., 1998; Toufexis, 2007; Walf & Frye, 2006). Por exemplo, o tratamento crônico com estradiol pode apresentar efeito ansiolítico em fêmeas, e a duração da exposição ao hormônio pode influenciar esses efeitos, de modo que, quanto maior o tempo de tratamento, maior o efeito ansiolítico observado (Bowman et al., 2002; Luine et al., 1998). Embora não tenhamos avaliado níveis de ansiedade em nossas fêmeas OVX e *sham*, é possível que um nível basal aumentado de ansiedade tenha influenciado o comportamento no dia do condicionamento, resultando na formação de uma representação contextual mais fraca, ou, ainda,

tenha prejudicado a precisão das informações evocadas no teste de discriminação contextual (Capítulo II).

Há diversas evidências apontando para o papel de hormônios sexuais na generalização da memória de medo (Lynch et al., 2013, 2014, 2016; Keiser et al., 2017; Adkins et al, 2019; Asok et al., 2019). Com base nos estudos de Lynch e colaboradores, utilizamos as mesmas doses de tratamento agudo antes do teste (15μg de E2) e observamos um aumento da generalização no grupo OVX + E2 aos 28 dias, comparado tanto ao grupo controle (*sham*) quanto ao grupo OVX tratado apenas com veículo (Capítulo II, Figura 1). Em contraste, nossos machos OCX + TP (2 mg) não apresentaram redução de medo no contexto novo (Capítulo II, Figura 2). As razões para a ausência de efeito nos machos podem ser diversas, incluindo características da tarefa comportamental, dose utilizada e tempo entre a injeção e o teste. Ademais, o horário da reposição pode ter influenciado esses resultados. Conquanto a variação hormonal em machos seja menor do que em fêmeas, ainda assim há flutuações nos níveis de hormônios gonadais. No entanto, não observamos diferenças entre os grupos *sham* e OCX em nenhum intervalo, seja no contexto A ou no B, o que sugere que, ao contrário das fêmeas, a flutuação natural de hormônios gonadais em machos intactos não afeta o comportamento avaliado nessa tarefa.

A gonadectomia sem reposição crônica de hormônios sexuais pode levar a alterações persistentes na plasticidade cerebral. Por exemplo, níveis de BDNF foram reduzidos em regiões associadas à memória, como lobo temporal e frontal após 28 semanas de ovariectomia (Singh et al., 1995). Nesse caso, a reposição com estradiol somente reverteu essa alteração em todas as subregiões do hipocampo, menos o CA1, indicando que um período prolongado de deprivação gonadal produz efeitos persistentes na neurofisiologia do hipocampo.

8. Conclusões

8.1 Capítulo I

1. Diferentes variáveis e parâmetros contextuais exibem graus distintos de saliência para a evocação da memória generalizada em machos e fêmeas, tanto na memória recente quanto na remota, evidenciando diferenças sexuais na forma como a generalização da memória evolui ao longo do tempo.
2. Machos e fêmeas exibem níveis comparáveis de expressão de medo no contexto de condicionamento durante a evocação da memória remota, sugerindo ausência de evidências de diferenças sexuais no condicionamento.
3. A manipulação extensiva de fêmeas antes do condicionamento atenua a expressão de medo no teste, sem, contudo, alterar os níveis de ansiedade quando comparadas ao grupo não manipulado.

8.2 Capítulo II

1. A injeção aguda de propionato de testosterona (2mg, s.c.) no dia anterior ao teste, seja no contexto de condicionamento (A) ou no contexto novo (B), não reduziu a generalização do medo em machos OCX. Em contraste, uma única administração de benzoato de estradiol em alta dose (15μg, s.c.) no dia anterior ao teste aumentou a expressão de medo generalizado aos 28 dias em fêmeas OVX, em comparação aos controles. Esses resultados indicam que a administração aguda pré-teste modulou a generalização de forma independente do tempo apenas em fêmeas. Nos machos, esse tratamento foi insuficiente para produzir efeito, tanto com a testosterona quanto com seu metabólito aromatizado, o estradiol.
2. Fêmeas controle (*sham*) apresentaram generalização dependente do tempo ao longo dos intervalos avaliados (2, 28 e 45 dias). Em contraste,

esse aumento progressivo não foi observado em machos controle (*sham*), sugerindo que a cirurgia possa ter exercido algum efeito disruptivo nesse processo especificamente nos machos.

3. A infusão de muscimol no dHPC de ratos machos e fêmeas gonadectomizados, com ou sem reposição hormonal, não afetou o teste de memória recente (2 dias) realizado no mesmo contexto de condicionamento (A). Esse resultado contrasta com achados anteriores do nosso grupo e de outros autores, que demonstram a necessidade do dHPC para a evocação da memória contextual recente. Assim, é provável que a combinação das duas cirurgias — gonadectomia e estereotáxica — tenha sido excessivamente prejudicial para os animais.

8.3 Capítulo III

1. O dHPC é necessário para a evocação da memória no contexto de condicionamento aos 2, mas não aos 28 dias, tanto em ratos machos quanto em fêmeas. Contudo, essa estrutura não participa de forma significativa na evocação da memória generalizada.
2. O LEC é necessário para a evocação da memória no contexto de condicionamento aos 2 e 28 dias, mas não aos 45 dias, em ratos machos. Essa estrutura apresenta dinâmicas distintas na memória generalizada, dependendo do contexto: no contexto com similaridades dimensionais, geométricas e táteis (B), a infusão de muscimol prejudicou a expressão de medo generalizado aos 28 dias. No entanto, em um contexto diferente, mas com as mesmas dicas visuais nas paredes (C), o LEC não foi necessário para a evocação, indicando que sua participação depende das características contextuais específicas.
3. O vHPC não é necessário para a evocação da memória no contexto de condicionamento aos 2 e 28 dias em ratos machos.
4. O ACC é necessário para a evocação da memória no contexto de condicionamento aos 28, mas não aos 2 dias, em ratos machos,

evidenciando a transição funcional do dHPC para uma área neocortical, consistente com a consolidação sistêmica. Em fêmeas, entretanto, essa estrutura não participa de forma significativa na evocação da memória em nenhum dos intervalos testados, indicando uma importante diferença sexual na dinâmica temporal dessas memórias.

8.4 Conclusão geral

De modo geral, as fêmeas apresentam menor *freezing* nos testes de memória contextual recente, mas atingem níveis semelhantes aos dos machos em intervalos mais longos, indicando retenção equivalente da memória entre os sexos. No entanto, quando testadas em um novo contexto, as fêmeas demonstram maiores prejuízos na capacidade discriminatória com base em determinados parâmetros e variáveis contextuais, em comparação aos machos, à medida que o tempo passa.

Essas diferenças de saliência contextual entre machos e fêmeas devem ser cuidadosamente consideradas no desenho experimental de estudos sobre diferenças sexuais na generalização contextual, visto que a literatura ainda carece de consenso quanto ao papel do sexo na dinâmica temporal da generalização do medo. É possível que alguns efeitos atribuídos ao sexo em alguns estudos derivem, em parte, das variáveis contextuais empregadas, mais do que de diferenças hormonais entre machos e fêmeas no momento do teste.

Curiosamente, embora a dinâmica temporal de dependência do dHPC seja semelhante entre machos e fêmeas não gonadectomizados, a participação do ACC, uma região neocortical associada à expressão de memórias remotas e generalizadas, torna-se necessária mais precocemente nos machos, coincidindo com o período de consolidação sistêmica (independência do dHPC). Em contraste, nas fêmeas, essa região não é recrutada para a evocação de uma memória já sistemicamente consolidada, reforçando a existência de estratégias neurais diferenciadas entre os sexos durante a consolidação e a expressão de memórias de medo.

9. Limitações e perspectivas

Nesta tese, foram avaliados ratos gonadectomizados submetidos à injeção aguda de hormônio sexual no dia anterior ao teste. No caso dos machos OCX, o intervalo entre a injeção e o teste pode não ter sido ideal para produzir os efeitos esperados; portanto, seria relevante investigar machos OCX com reposição hormonal administrada em um período mais próximo ao momento do teste. No entanto, é importante ressaltar que a testosterona pode influenciar outros processos relacionados ao medo, como observado nos machos testados no contexto novo P1'/C aos 2 dias (Capítulos I e II). Dessa forma, pode ser difícil distinguir o que corresponde a uma atenuação na expressão do medo e o que corresponde a uma atenuação do medo generalizado, já que ambos os processos podem ser modulados pela testosterona e se manifestar de forma semelhante no comportamento (resposta de *freezing*).

A utilização de protocolos de reposição crônica de hormônios sexuais poderia fornecer informações adicionais sobre os efeitos a longo prazo, embora o estresse, associado à manipulação e injeções repetidas, possa mascarar esses efeitos, dificultando a comparação direta com os grupos que receberam apenas injeção aguda.

Apesar de alguns comportamentos de fuga, como saltos e *darting*, terem sido quantificados como indicadores secundários, as análises comportamentais focaram predominantemente no *freezing* como índice de retenção. As diferenças observadas entre machos e fêmeas poderiam ser melhor exploradas mediante a inclusão de outros indicadores comportamentais, como a vocalização ultrassônica, uma vez que ratos emitem esse tipo de vocalização em situações de medo.

Foi observado um possível efeito disruptivo da realização de duas cirurgias em um curto intervalo de tempo (cerca de 14 dias entre a gonadectomia e a cirurgia estereotáxica) (Apêndice II, Figura 1), o que pode ter desencadeado processos inflamatórios prejudiciais. Assim, seria recomendável repetir esses experimentos com um intervalo maior entre as cirurgias para confirmar os resultados obtidos. Alternativamente, para melhor elucidar o efeito de hormônios sexuais sobre

essas estruturas, esses experimentos poderão ser repetidos em animais não-gonadectomizados e que recebessem infusão intracerebral de antagonistas de receptores de estrogênio ou androgênio antes do teste. Ainda, seria interessante avaliar marcadores de inflamação e estresse oxidativo em animais submetidos a esse protocolo cirúrgico, para melhor avaliar a contribuição desses procedimentos invasivos aos resultados comportamentais obtidos.

Alguns grupos experimentais (Capítulo II, Figura 2D; Capítulo III, Figura 5B, Contexto B aos 45 dias) apresentaram níveis muito baixos de *freezing* quando testados em novo contexto aos 45 dias, o que dificulta a interpretação dos dados. Dessa forma, torna-se necessário repetir esses experimentos para verificar se o procedimento cirúrgico — de castração ou estereotáxico — influenciou esses resultados, garantindo maior robustez e replicabilidade às conclusões apresentadas.

Por fim, para complementar os resultados apresentados no Capítulo II, foram coletadas amostras do hipocampo e do córtex frontal (dHPC, vHPC, ACC, PLC e ILC) para a quantificação da expressão dos genes de resposta imediata *c-Fos*, *Arc* e *Egr-1/Zif-268*, bem como dos níveis da proteína PKMc (isoforma PMKζ) por Western Blotting. As análises provenientes desse conjunto de dados resultarão na elaboração de uma quarta publicação.

10. Referências bibliográficas

Adkins, J. M., Lynch, J. F., Hagerdorn, P., Esterhuizen, M., & Jasnow, A. M. (2019). Anterior cingulate cortex and dorsal hippocampal glutamate receptors mediate generalized fear in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, *107*, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.05.009

Aguirre, C. C., & Baudry, M. (2009). PROGESTERONE REVERSES 17ß-ESTRADIOL-MEDIATED NEUROPROTECTION AND BDNF INDUCTION IN CULTURED HIPPOCAMPAL SLICES. *The European Journal of Neuroscience*, *29*(3), 447–454. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06591.x

Aguirre, C., Jayaraman, A., Pike, C., & Baudry, M. (2010). Progesterone inhibits estrogen-mediated neuroprotection against excitotoxicity by down-regulating estrogen receptor-β. *Journal of Neurochemistry*, *115*(5), 1277–1287. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07038.x

Aitchison, L., Jegminat, J., Menendez, J. A., Pfister, J.-P., Pouget, A., & Latham, P. E. (2021). Synaptic plasticity as Bayesian inference. *Nature Neuroscience*, *24*(4), 565–571. https://doi.org/10.1038/s41593-021-00809-5

Anagnostaras, S. G., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1999). Temporarily graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: Within-subjects examination. *The Journal of Neuroscience*, *19*(3), 1106–1114.

Asok, A., Hijazi, J., Harvey, L. R., Kosmidis, S., Kandel, E. R., & Rayman, J. B. (2019). Sex Differences in Remote Contextual Fear Generalization in Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*, 56. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00056

Atucha, E., Ku, S.-P., Lippert, M. T., & Sauvage, M. M. (2023). Recalling gist memory depends on CA1 hippocampal neurons for lifetime retention and CA3 neurons for memory precision. *Cell Reports*, *42*(11), 113317. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113317

Babb, J. A., Masini, C. V., Day, H. E. W., & Campeau, S. (2013). Sex differences in activated corticotropin-releasing factor neurons within stress-related neurocircuitry and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones following restraint in rats. *Neuroscience*, *234*, 40–52. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.051

Babb, Jessica A., Masini, C. V., Day, H. E. W., & Campeau, S. (2013). Stressor-specific effects of sex on HPA axis hormones and activation of stress-related neurocircuitry. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, *16*(6), 664–677. https://doi.org/10.3109/10253890.2013.840282

Barker, G. R. I., & Warburton, E. C. (2020). Putting objects in context: A prefrontal–hippocampal–perirhinal cortex network. *Brain and Neuroscience Advances*, *4*, 2398212820937621. https://doi.org/10.1177/2398212820937621

Becker, J. B., Prendergast, B. J., & Liang, J. W. (2016). Female rats are not more variable than male rats: A meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences*, *7*, 34. https://doi.org/10.1186/s13293-016-0087-5

Beery, A. K. (2018). Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *23*, 143–149. https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.06.016

Bergstrom, H. C. (2016). The neurocircuitry of remote cued fear memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *71*, 409–417. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.028

Biedenkapp, J. C., & Rudy, J. W. (2009). Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: Role of ventral subiculum and amygdala. *Learning & Memory*, *16*(1), 38–45. https://doi.org/10.1101/lm.1099109

Bingaman, E. W., Magnuson, D. J., Gray, T. S., & Handa, R. J. (2008). Androgen Inhibits the Increases in Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and CRH-Immunoreactivity following Gonadectomy. *Neuroendocrinology*, *59*(3), 228–234. https://doi.org/10.1159/000126663

Blurton-Jones, M., & Tuszynski, M. H. (2006). Estradiol-induced modulation of estrogen receptor-β and GABA within the adult neocortex: A potential transsynaptic mechanism for estrogen modulation of BDNF. *Journal of Comparative Neurology*, *499*(4), 603–612. https://doi.org/10.1002/cne.21122

Bodo, C., & Rissman, E. F. (2006). New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *27*(2), 217–232. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.004

Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., & Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*, *400*(6745), 671–675. https://doi.org/10.1038/23270

Bowman, R. E., Ferguson, D., & Luine, V. N. (2002). Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience*, *113*(2), 401–410. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00156-2

Bucci, D. J., Chiba, A. A., & Gallagher, M. (1995). Spatial learning in male and female Long-Evans rats. *Behavioral Neuroscience*, *109*(1), 180–183. https://doi.org/10.1037/0735-7044.109.1.180

Byrnes, E. M., Casey, K., & Bridges, R. S. (2012). Reproductive experience modifies the effects of estrogen receptor alpha activity on anxiety-like behavior and corticotropin releasing hormone mRNA expression. *Hormones and Behavior*, *61*(1), 44–49. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.10.001

Casagrande, M. A., Haubrich, J., Pedraza, L. K., Popik, B., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2018). Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiology of Learning and Memory*, *150*, 42–47. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.03.002

Casagrande, M. A., Porto, R. R., Haubrich, J., Kautzmann, A., & de Oliveira Álvares, L. (2023). Emotional Value of Fear Memory and the Role of the Ventral Hippocampus in Systems Consolidation. *Neuroscience*, *535*, 184–193. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.11.005

Chen, L.-S., Tzeng, W.-Y., Chuang, J.-Y., Cherng, C. G., Gean, P.-W., & Yu, L. (2014). Roles of testosterone and amygdaloid LTP induction in determining sex differences in fear memory magnitude. *Hormones and Behavior*, *66*(3), 498–508. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.07.008

Cho, Y. H., Beracochea, D., & Jaffard, R. (1993). Extended temporal gradient for the retrograde and anterograde amnesia produced by ibotenate entorhinal cortex lesions in mice. *Journal of Neuroscience*, *13*(4), 1759–1766. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-04-01759.1993

Colon, L., Odynocki, N., Santarelli, A., & Poulos, A. M. (2018). Sexual differentiation of contextual fear responses. *Learning & Memory*, *25*(5), 230–240. https://doi.org/10.1101/lm.047159.117

Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (1998). Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(8), 4678–4683. https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4678

Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *112*(4), 885–891. https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.4.885

Cossio, R., Carreira, M. B., Vásquez, C. E., & Britton, G. B. (2016). Sex differences and estrous cycle effects on foreground contextual fear conditioning. *Physiology & Behavior*, *163*, 305–311. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.026

Crestani, A. P., Lotz, F. N., Casagrande, M. A., Popik, B., Guerra, K. T. K., De Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2022). Adolescent female rats undergo full systems consolidation of an aversive memory, while males of the same age fail to discriminate contexts. *Behavioral Neuroscience*, *136*(2), 172–181. https://doi.org/10.1037/bne0000501

Crestani, A. P., Sierra, R. O., Machado, A., Haubrich, J., Scienza, K. M., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2018). Hippocampal plasticity mechanisms mediating experience-dependent learning change over time. *Neurobiology of Learning and Memory*, *150*, 56–63. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.02.020

Cullen, P. K., Gilman, T. L., Winiecki, P., Riccio, D. C., & Jasnow, A. M. (2015). Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiology of Learning and Memory*, *124*, 19–27. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.07.001

Cumberland, A. L., Hirst, J. J., Badoer, E., Wudy, S. A., Greaves, R. F., Zacharin, M., & Walker, D. W. (2021). The Enigma of the Adrenarche: Identifying the Early Life Mechanisms and Possible Role in Postnatal Brain Development. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4296. https://doi.org/10.3390/ijms22094296

Cutler, G. B., Glenn, M., Bush, M., Hodgen, G. D., Graham, C. E., & Loriaux, D. L. (1978). Adrenarche: A survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*, *103*(6), 2112–2118. https://doi.org/10.1210/endo-103-6-2112

Daviu, N., Rabasa, C., Nadal, R., & Armario, A. (2014). Comparison of the effects of single and daily repeated immobilization stress on resting activity and heterotypic sensitization of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Stress*, *17*(2), 176–185. https://doi.org/10.3109/10253890.2014.880834

De Oliveira Alvares, L., Einarsson, E. Ö., Santana, F., Crestani, A. P., Haubrich, J., Cassini, L. F., Nader, K., & Quillfeldt, J. A. (2012). Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*, *22*(5), 1092–1095. https://doi.org/10.1002/hipo.20983

De Roo, M., Klauser, P., Garcia, P. M., Poglia, L., & Muller, D. (2008). Chapter 11 Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. In W. S. Sossin, J.-C. Lacaille, V. F. Castellucci, & S. Belleville (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 169, pp. 199–207). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00011-8

DeFeudis, F. V. (1982). Muscimol and GABA-receptors: Basic studies and therapeutic implications. *Reviews in Pure & Applied Pharmacological Sciences*, *3*(3), 319–379.

Ding, H. K., Teixeira, C. M., & Frankland, P. W. (2008). Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory*, *15*(5), 290–293. https://doi.org/10.1101/lm.905008

Dong, H. W., Petrovich, G. D., & Swanson, L. W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *38*(1–2), 192–246. https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00079-0

Dos Santos Corrêa, M., Vaz, B. D. S., Grisanti, G. D. V., De Paiva, J. P. Q., Tiba, P. A., & Fornari, R. V. (2019). Relationship between footshock intensity, post-training corticosterone release and contextual fear memory specificity over time. *Psychoneuroendocrinology*, *110*, 104447. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104447

Dragoi, G., & Tonegawa, S. (2011). Preplay of future place cell sequences by hippocampal cellular assemblies. *Nature*, *469*(7330), 397–401. https://doi.org/10.1038/nature09633

Dragoi, G., & Tonegawa, S. (2013). Distinct preplay of multiple novel spatial experiences in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(22), 9100–9105. https://doi.org/10.1073/pnas.1306031110

Driscoll, L. N., Duncker, L., & Harvey, C. D. (2022). Representational drift: Emerging theories for continual learning and experimental future directions. *Current Opinion in Neurobiology*, *76*, 102609. https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102609

Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, *55*(1), 51–86. https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050

Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, *88*(1), 20–32. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004

Einarsson, E. Ö., Pors, J., & Nader, K. (2015). Systems Reconsolidation Reveals a Selective Role for the Anterior Cingulate Cortex in Generalized Contextual Fear Memory Expression. *Neuropsychopharmacology*, *40*(2), 480–487. https://doi.org/10.1038/npp.2014.197

Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, *110*(1–2), 73–81. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00186-2

Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, *65*(1), 7–19. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031

Finnie, P. S. B., Gamache, K., Protopoulos, M., Sinclair, E., Baker, A. G., Wang, S.-H., & Nader, K. (2018). Cortico-hippocampal Schemas Enable NMDAR-Independent Fear Conditioning in Rats. *Current Biology*, *28*(18), 2900-2909.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.037

Foy, M. R., Baudry, M., Foy, J. G., & Thompson, R. F. (2008). 17beta-estradiol modifies stress-induced and age-related changes in hippocampal synaptic plasticity. *Behavioral Neuroscience*, *122*(2), 301–309. https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.301

Frankfurt, M., & Luine, V. (2015). The evolving role of dendritic spines and memory: Interaction(s) with estradiol. *Hormones and Behavior*, *74*, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.004

Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(2), 119–130. https://doi.org/10.1038/nrn1607

Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., & Silva, A. J. (2004). The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science*, *304*(5672), 881–883. https://doi.org/10.1126/science.1094804

Frick, K. M., Fernandez, S. M., Bennett, J. C., Prange-Kiel, J., MacLusky, N. J., & Leranth, C. (2004). Behavioral training interferes with the ability of gonadal hormones to increase CA1 spine synapse density in ovariectomized female rats. *European Journal of Neuroscience*, *19*(11), 3026–3032. https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03427.x

Frick, K. M., Kim, J., & Koss, W. A. (2018). Estradiol and hippocampal memory in female and male rodents. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *23*, 65–74. https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.03.011

Frick, K. M., Kim, J., Tuscher, J. J., & Fortress, A. M. (2015). Sex steroid hormones matter for learning and memory: Estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning & Memory*, *22*(9), 472–493. https://doi.org/10.1101/lm.037267.114

Frye, C. A., Petralia, S. M., & Rhodes, M. E. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3α,5α-THP. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *67*(3), 587–596. https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00392-0

Giedd, J. N., Clasen, L. S., Lenroot, R., Greenstein, D., Wallace, G. L., Ordaz, S., Molloy, E. A., Blumenthal, J. D., Tossell, J. W., Stayer, C., Samango-Sprouse, C. A., Shen, D., Davatzikos, C., Merke, D., & Chrousos, G. P. (2006). Puberty-related influences on brain development. *Molecular and Cellular Endocrinology, Puberty: A Sensor of Genetic and Environmental Interactions throughout Development*, *254–255*, 154–162. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.04.016

Gorski, R. A., Gordon, J. H., Shryne, J. E., & Southam, A. M. (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Research*, *148*(2), 333–346. https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90723-0

Greggor, A. L., Thornton, A., & Clayton, N. S. (2015). Neophobia is not only avoidance: Improving neophobia tests by combining cognition and ecology. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *6*, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.10.007

Gresack, J. E., & Frick, K. M. (2006). Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *84*(1), 112–119. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.04.013

Grissom, E. M., Hawley, W. R., Hodges, K. S., Fawcett-Patel, J. M., & Dohanich, G. P. (2013). Biological sex influences learning strategy preference and muscarinic receptor binding in specific brain regions of prepubertal rats. *Hippocampus*, *23*(4), 313–322. https://doi.org/10.1002/hipo.22085

Gussin, H. A., Tomlinson, I. D., Little, D. M., Warnement, M. R., Qian, H., Rosenthal, S. J., & Pepperberg, D. R. (2006). Binding of muscimol-conjugated quantum dots to GABAC receptors. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(49), 15701–15713. https://doi.org/10.1021/ja064324k

Haas, D. A., & George, S. R. (1989). Estradiol or ovariectomy decreases crf synthesis in hypothalamus. *Brain Research Bulletin*, *23*(3), 215–218. https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90150-0

Hainmueller, T., & Bartos, M. (2020). Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nature Reviews. Neuroscience*, *21*(3), 153–168. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0260-z

Hamson, D. K., Wainwright, S. R., Taylor, J. R., Jones, B. A., Watson, N. V., & Galea, L. a. M. (2013). Androgens increase survival of adult-born neurons in the dentate gyrus by an androgen receptor-dependent mechanism in male rats. *Endocrinology*, *154*(9), 3294–3304. https://doi.org/10.1210/en.2013-1129

Hara, Y., Waters, E. M., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2015). Estrogen Effects on Cognitive and Synaptic Health Over the Lifecourse. *Physiological Reviews*, *95*(3), 785–807. https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2014

Haubrich, J., Cassini, L. F., Diehl, F., Santana, F., Fürstenau De Oliveira, L., De Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2016). Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory: Accelerating systems consolidation of a fear memory. *Hippocampus*, *26*(7), 924–932. https://doi.org/10.1002/hipo.22575

Hodes, G. E., Bangasser, D., Sotiropoulos, I., Kokras, N., & Dalla, C. (2024). Sex Differences in Stress Response: Classical Mechanisms and Beyond. *Current Neuropharmacology*, *22*(3), 475–494. https://doi.org/10.2174/1570159X22666231005090134

Homan, P., Levy, I., Feltham, E., Gordon, C., Hu, J., Li, J., Pietrzak, R. H., Southwick, S., Krystal, J. H., Harpaz-Rotem, I., & Schiller, D. (2019). Neural computations of threat in the aftermath of combat trauma. *Nature Neuroscience*, *22*(3), 470–476. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0315-x

Huang, W., Zhu, P. J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., Krnjević, K., Roman, G., & Costa-Mattioli, M. (2013). mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature Neuroscience*, *16*(4), 441–448. https://doi.org/10.1038/nn.3351

Isaac, J. T., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. *Neuron*, *15*(2), 427–434. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90046-2

Izquierdo, Ivan. (2021). *Memória*. Artmed.

Jacome, L. F., Barateli, K., Buitrago, D., Lema, F., Frankfurt, M., & Luine, V. N. (2016). Gonadal Hormones Rapidly Enhance Spatial Memory and Increase Hippocampal Spine Density in Male Rats. *Endocrinology*, *157*(4), 1357–1362. https://doi.org/10.1210/en.2015-1959

Jacome, L. F., Gautreaux, C., Inagaki, T., Mohan, G., Alves, S., Lubbers, L. S., & Luine, V. (2010). Estradiol and ERβ agonists enhance recognition memory, and DPN, an ERβ agonist, alters brain monoamines. *Neurobiology of Learning and Memory*, *94*(4), 488–498. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.08.016

Jasnow, A. M., Lynch, J. F., Gilman, T. L., & Riccio, D. C. (2017). Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(3), 821–835. https://doi.org/10.1002/jnr.23837

Jasnow, A. M., Schulkin, J., & Pfaff, D. W. (2006). Estrogen facilitates fear conditioning and increases corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the central amygdala in female mice. *Hormones and Behavior*, *49*(2), 197–205. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.06.005

Jin, M., Jin, F., Zhang, L., Chen, Z., & Huang, H. (2005). Two estrogen replacement therapies differentially regulate expression of estrogen receptors alpha and beta in the hippocampus and cortex of ovariectomized rat. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *142*(2), 107–114. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.09.013

Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, *147*(3), 509–524. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009

Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, *367*(6473), eaaw4325. https://doi.org/10.1126/science.aaw4325

Kanaya, M., Tsuda, M. C., Sagoshi, S., Nagata, K., Morimoto, C., Thu, C. K. T., Toda, K., Kato, S., Ogawa, S., & Tsukahara, S. (2014). Regional difference in sex steroid action on formation of morphological sex differences in the anteroventral periventricular nucleus and principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *PloS One*, *9*(11), e112616. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112616

Kandel, E. R. (Ed.). (2013). *Principles of neural science* (5. ed). McGraw-Hill Medical.

Kappel, D., Habenschuss, S., Legenstein, R., & Maass, W. (2015). Network Plasticity as Bayesian Inference. *PLOS Computational Biology*, *11*(11), e1004485. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004485

Kardong, K. (2012). *Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution*. McGraw-Hill.

Kato, A., Hojo, Y., Higo, S., Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Yoshino, H., Uebayashi, M., & Kawato, S. (2013). Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*. https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00149

Keeley, R. J., Bye, C., Trow, J., & McDonald, R. J. (2015). Strain and sex differences in brain and behaviour of adult rats: Learning and memory, anxiety and volumetric estimates. *Behavioural Brain Research*, *288*, 118–131. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.039

Keiser, A. A., Turnbull, L. M., Darian, M. A., Feldman, D. E., Song, I., & Tronson, N. C. (2017). Sex Differences in Context Fear Generalization and Recruitment of Hippocampus and Amygdala during Retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *42*(2), 397–407. https://doi.org/10.1038/npp.2016.174

Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-Specific Retrograde Amnesia of Fear. *Science*, *256*(5057), 675–677. https://doi.org/10.1126/science.1585183

Kinnavane, L., Amin, E., Olarte-Sánchez, C. M., & Aggleton, J. P. (2016). Detecting and discriminating novel objects: The impact of perirhinal cortex disconnection on hippocampal activity patterns. *Hippocampus*, *26*(11), 1393–1413. https://doi.org/10.1002/hipo.22615

Kinsky, N. R., Mau, W., Sullivan, D. W., Levy, S. J., Ruesch, E. A., & Hasselmo, M. E. (2020). Trajectory-modulated hippocampal neurons persist throughout memory-guided navigation. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-16226-4

Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., Redondo, R. L., & Tonegawa, S. (2017). Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, *356*(6333), 73–78. https://doi.org/10.1126/science.aam6808

Kokane, S. S., & Perrotti, L. I. (2020). Sex Differences and the Role of Estradiol in Mesolimbic Reward Circuits and Vulnerability to Cocaine and Opiate Addiction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00074

Korol, D. L., Malin, E. L., Borden, K. A., Busby, R. A., & Couper-Leo, J. (2004). Shifts in preferred learning strategy across the estrous cycle in female rats. *Hormones and Behavior*, *45*(5), 330–338. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.01.005

Koshibu, K., Levitt, P., & Ahrens, E. T. (2004). Sex-specific, postpuberty changes in mouse brain structures revealed by three-dimensional magnetic resonance microscopy. *NeuroImage*, *22*(4), 1636–1645. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.03.051

Koss, W. A., & Frick, K. M. (2017). Sex differences in hippocampal function. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 539–562. https://doi.org/10.1002/jnr.23864

Koss, W. A., Lloyd, M. M., Sadowski, R. N., Wise, L. M., & Juraska, J. M. (2015). Gonadectomy before puberty increases the number of neurons and glia in the medial prefrontal cortex of female, but not male, rats. *Developmental Psychobiology*, *57*(3), 305–312. https://doi.org/10.1002/dev.21290

Kumaran, D., & Maguire, E. A. (2006). An Unexpected Sequence of Events: Mismatch Detection in the Human Hippocampus. *PLoS Biology*, *4*(12), e424. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040424

Kurata, K., Takebayashi, M., Morinobu, S., & Yamawaki, S. (2004). β-Estradiol, Dehydroepiandrosterone, and Dehydroepiandrosterone Sulfate Protect against N-Methyl-d-aspartate-Induced Neurotoxicity in Rat Hippocampal Neurons by Different Mechanisms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *311*(1), 237–245. https://doi.org/10.1124/jpet.104.067629

Lavenex, P., & Amaral, D. G. (2000). Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity. *Hippocampus*, *10*(4), 420–430. https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4%253C420::AID-HIPO8%253E3.0.CO;2-5

Lawrence, S., & Scofield, R. H. (2024). Post traumatic stress disorder associated hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and physical illness. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, *41*, 100849. https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100849

Le, A. A., Palmer, L. C., Chavez, J., Gall, C. M., & Lynch, G. (2024). Sex differences in the context dependency of episodic memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *18*, 1349053. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2024.1349053

Lehmann, H., Sparks, F. T., Spanswick, S. C., Hadikin, C., McDonald, R. J., & Sutherland, R. J. (2009). Making context memories independent of the hippocampus. *Learning & Memory*, *16*(7), 417–420. https://doi.org/10.1101/lm.1385409

Lenz, K. M., Nugent, B. M., & McCarthy, M. M. (2012). Sexual differentiation of the rodent brain: Dogma and beyond. *Frontiers in Neuroscience*, *6*, 26. https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00026

Leranth, C., Hajszan, T., & MacLusky, N. J. (2004). Androgens Increase Spine Synapse Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Ovariectomized Female Rats. *Journal of Neuroscience*, *24*(2), 495–499. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4516-03.2004

Leranth, C., Petnehazy, O., & MacLusky, N. J. (2003). Gonadal Hormones Affect Spine Synaptic Density in the CA1 Hippocampal Subfield of Male Rats. *Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1588–1592. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-05-01588.2003

Lesburguères, E., Gobbo, O. L., Alaux-Cantin, S., Hambucken, A., Trifilieff, P., & Bontempi, B. (2011). Early Tagging of Cortical Networks Is Required for the Formation of Enduring Associative Memory. *Science*, *331*(6019), 924–928. https://doi.org/10.1126/science.1196164

Lezak, K. R., Roelke, E., Harris, O. M., Choi, I., Edwards, S., Gick, N., Cocchiaro, G., Missig, G., Roman, C. W., Braas, K. M., Toufexis, D. J., May, V., & Hammack, S. E. (2014). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) increases corticosterone in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, *45*, 11–20. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.007

Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews. Neuroscience*, *13*(3), 169–182. https://doi.org/10.1038/nrn3192

Lotz, F. N., Guerra, K. T. K., Crestani, A. P., & Quillfeldt, J. A. (2025). Multiple context discrimination in adult rats: Sex variability and dynamics of time-dependent generalization of an aversive memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *32*(5–6), a054081. https://doi.org/10.1101/lm.054081.124

Luine, V., & Frankfurt, M. (2013). Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience*, *239*, 34–45. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.019

Luine, V. N., Richards, S. T., Wu, V. Y., & Beck, K. D. (1998). Estradiol Enhances Learning and Memory in a Spatial Memory Task and Effects Levels of Monoaminergic Neurotransmitters. *Hormones and Behavior*, *34*(2), 149–162. https://doi.org/10.1006/hbeh.1998.1473

Luine, V., Serrano, P., & Frankfurt, M. (2018). Rapid effects on memory consolidation and spine morphology by estradiol in female and male rodents. *Hormones and Behavior*, *104*, 111–118. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.007

Lund, T. D., Rovis, T., Chung, W. C. J., & Handa, R. J. (2005). Novel Actions of Estrogen Receptor-β on Anxiety-Related Behaviors. *Endocrinology*, *146*(2), 797–807. https://doi.org/10.1210/en.2004-1158

Lynch, J., Cullen, P. K., Jasnow, A. M., & Riccio, D. C. (2013). Sex differences in the generalization of fear as a function of retention intervals. *Learning & Memory*, *20*(11), 628–632. https://doi.org/10.1101/lm.032011.113

Lynch, J. F., Dejanovic, D., Winiecki, P., Mulvany, J., Ortiz, S., Riccio, D. C., & Jasnow, A. M. (2014). Activation of ERβ modulates fear generalization through an effect on memory retrieval. *Hormones and Behavior*, *66*(2), 421–429. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.017

Lynch, J. F., Vanderhoof, T., Winiecki, P., Latsko, M. S., Riccio, D. C., & Jasnow, A. M. (2016). Aromatized testosterone attenuates contextual generalization of fear in male rats. *Hormones and Behavior*, *84*, 127–135. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.06.007

Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, *44*(1), 5–21. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012

Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, *74*(4), 435–440. https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00593-5

Marder, E., & Goaillard, J.-M. (2006). Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(7), 563–574. https://doi.org/10.1038/nrn1949

Maren, S. (2014). Fear of the unexpected: Hippocampus mediates novelty-induced return of extinguished fear in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *108*, 88–95. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.004

Maren, S., De Oca, B., & Fanselow, M. S. (1994). Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: Positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Research*, *661*(1), 25–34. https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91176-2

Marin, F. N., Franzen, J. M., Troyner, F., Molina, V. A., Giachero, M., & Bertoglio, L. J. (2020). Taking advantage of fear generalization-associated destabilization to attenuate the underlying memory via reconsolidation intervention. *Neuropharmacology*, *181*, 108338. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108338

Markham, J. A., Morris, J. R., & Juraska, J. M. (2007). Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. *Neuroscience*, *144*(3), 961–968. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.015

Markowska, A. L. (1999). Sex dimorphisms in the rate of age-related decline in spatial memory: Relevance to alterations in the estrous cycle. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(18), 8122–8133. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-08122.1999

Marr, D. (1997a). A theory for cerebral neocortex. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *176*(1043), 161–234. https://doi.org/10.1098/rspb.1970.0040

Marr, D. (1997b). Simple memory: A theory for archicortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *262*(841), 23–81. https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0078

Maviel, T., Durkin, T. P., Menzaghi, F., & Bontempi, B. (2004). Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science*, *305*(5680), 96–99. https://doi.org/10.1126/science.1098180

McCarthy, M. M., Pickett, L. A., VanRyzin, J. W., & Kight, K. E. (2015). Surprising origins of sex differences in the brain. *Hormones and Behavior, Annual Conference SBN 2014*, *76*, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.013

McClelland, J. L. (2013). Incorporating rapid neocortical learning of new schema-consistent information into complementary learning systems theory. *Journal of Experimental Psychology: General*, *142*(4), 1190–1210. https://doi.org/10.1037/a0033812

McClelland, J. L., McNaughton, B. L., & O'Reilly, R. C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: Insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological Review*, *102*(3), 419–457. https://doi.org/10.1037/0033-295x.102.3.419

McEwen, B. S., & Milner, T. A. (2017). Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 24–39. https://doi.org/10.1002/jnr.23809

McGaugh, J. L. (2000). Memory—A Century of Consolidation. *Science*, *287*(5451), 248–251. https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248

McIntyre, C. K., Pal, S. N., Marriott, L. K., & Gold, P. E. (2002). Competition between Memory Systems: Acetylcholine Release in the Hippocampus Correlates Negatively with Good Performance on an Amygdala-Dependent Task. *Journal of Neuroscience*, *22*(3), 1171–1176. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-01171.2002

Monfils, M.-H., Cowansage, K. K., Klann, E., & LeDoux, J. E. (2009). Extinction-reconsolidation boundaries: Key to persistent attenuation of fear memories. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5929), 951–955. https://doi.org/10.1126/science.1167975

Morgan, M. A., Schulkin, J., & Pfaff, D. W. (2004). Estrogens and non-reproductive behaviors related to activity and fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *28*(1), 55–63. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.017

Moscovitch, M., Rosenbaum, R. S., Gilboa, A., Addis, D. R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M. P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., & Nadel, L. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: A unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy*, *207*(1), 35–66. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00421.x

Murphy, D. D., & Segal, M. (2000). Progesterone prevents estradiol-induced dendritic spine formation in cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology*, *72*(3), 133–143. https://doi.org/10.1159/000054580

Murray, E. K., Hien, A., de Vries, G. J., & Forger, N. G. (2009). Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology*, *150*(9), 4241–4247. https://doi.org/10.1210/en.2009-0458

Muzzio, I. A., Levita, L., Kulkarni, J., Monaco, J., Kentros, C., Stead, M., Abbott, L. F., & Kandel, E. R. (2009). Attention Enhances the Retrieval and Stability of Visuospatial and Olfactory Representations in the Dorsal Hippocampus. *PLOS Biology*, *7*(6), e1000140. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000140

Nadel, L., & Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, *7*(2), 217–227. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(97)80010-4

Nader, K., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(3), 216–219. https://doi.org/10.1038/35044580

Nishimura, K. J., Poulos, A. M., Drew, M. R., & Rajbhandari, A. K. (2022). Know thy SEFL: Fear sensitization and its relevance to stressor-related disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *142*, 104884. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104884

Nofrey, B. S., Ben-Shahar, O. M., & Brake, W. G. (2008). Estrogen abolishes latent inhibition in ovariectomized female rats. *Brain and Cognition*, *66*(2), 156–160. https://doi.org/10.1016/j.bandc.2007.06.003

Nugent, B. M., Wright, C. L., Shetty, A. C., Hodes, G. E., Lenz, K. M., Mahurkar, A., Russo, S. J., Devine, S. E., & McCarthy, M. M. (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nature Neuroscience*, *18*(5), 690–697. https://doi.org/10.1038/nn.3988

Ocampo, A. C., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2017). Hippocampal area CA1 and remote memory in rats. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *24*(11), 563–568. https://doi.org/10.1101/lm.045781.117

Öğmen, H., & Herzog, M. H. (2016). A New Conceptualization of Human Visual Sensory-Memory. *Frontiers in Psychology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00830

Oyola, M. G., & Handa, R. J. (2017). Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: Sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, *20*(5), 476–494. https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369523

Pamplona, F. A., Henes, K., Micale, V., Mauch, C. P., Takahashi, R. N., & Wotjak, C. T. (2011). Prolonged fear incubation leads to generalized avoidance behavior in mice. *Journal of Psychiatric Research*, *45*(3), 354–360. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.06.015

Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Boos, F. Z., Haubrich, J., Quillfeldt, J. A., & De Oliveira Alvares, L. (2016). The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*, *26*(3), 362–371. https://doi.org/10.1002/hipo.22527

Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Crestani, A. P., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2017). Sequential learning during contextual fear conditioning guides the rate of systems consolidation: Implications for consolidation of multiple memory traces. *Hippocampus*, *27*(5), 518–528. https://doi.org/10.1002/hipo.22708

Pilkiw, M., Jarovi, J., & Takehara-Nishiuchi, K. (2022). Lateral Entorhinal Cortex Suppresses Drift in Cortical Memory Representations. *The Journal of Neuroscience*, *42*(6), 1104–1118. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1439-21.2021

Polti, I., Martin, B., & van Wassenhove, V. (2018). The effect of attention and working memory on the estimation of elapsed time. *Scientific Reports*, *8*(1), 6690. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25119-y

Poulos, A. M., Mehta, N., Lu, B., Amir, D., Livingston, B., Santarelli, A., Zhuravka, I., & Fanselow, M. S. (2016). Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. *Learning & Memory*, *23*(7), 379–385. https://doi.org/10.1101/lm.041400.115

Purves, D. (Ed.). (2012). *Neuroscience* (5th ed). Sinauer Associates.

Quillfeldt, J. A. (2019). Temporal Flexibility of Systems Consolidation and the Synaptic Occupancy/Reset Theory (SORT): Cues About the Nature of the Engram. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *11*, 1. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2019.00001

Quillfeldt, Jorge A., Zanatta, M. S., Schmitz, P. K., Quevedo, J., Schaeffer, E., Lima, J. B. D., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1996). Different Brain Areas Are Involved in Memory Expression at Different Times from Training. *Neurobiology of Learning and Memory*, *66*(2), 97–101. https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0050

Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Schmitz, P. K., Quevedo, J., Schaeffer, E., Lima, J. B., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1996). Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiology of Learning and Memory*, *66*(2), 97–101. https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0050

Quinn, J. J., Skipper, R. A., & Claflin, D. I. (2014). Infant stress exposure produces persistent enhancement of fear learning across development. *Developmental Psychobiology*, *56*(5), 1008–1016. https://doi.org/10.1002/dev.21181

Ramanathan, K. R., Ressler, R. L., Jin, J., & Maren, S. (2018). Nucleus Reuniens Is Required for Encoding and Retrieving Precise, Hippocampal-Dependent Contextual Fear Memories in Rats. *Journal of Neuroscience*, *38*(46), 9925–9933. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1429-18.2018

Rasia-Filho, A. A., Fabian, C., Rigoti, K. M., & Achaval, M. (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience*, *126*(4), 839–847. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.009

Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: The synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(1), 17–30. https://doi.org/10.1038/nrn2963

Rege, J., Garber, S., Conley, A. J., Elsey, R. M., Turcu, A. F., Auchus, R. J., & Rainey, W. E. (2019). Circulating 11-oxygenated androgens across species. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *190*, 242–249. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.005

Rempel-Clower, N. L., Zola, S. M., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(16), 5233–5255. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-16-05233.1996

Ressler, K. J., Mercer, K. B., Bradley, B., Jovanovic, T., Mahan, A., Kerley, K., Norrholm, S. D., Kilaru, V., Smith, A. K., Myers, A. J., Ramirez, M., Engel, A., Hammack, S. E., Toufexis, D., Braas, K. M., Binder, E. B., & May, V. (2011). Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*, *470*(7335), 492–497. https://doi.org/10.1038/nature09856

Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., & Ammassari-Teule, M. (2009). The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. *Journal of Neuroscience*, *29*(25), 8206–8214. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0966-09.2009

Riccio, D. C., Ackil, J. K., & Burch-Vernon, A. (1992). Forgetting of stimulus attributes: Methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychological Bulletin*, *112*(3), 433–445. https://doi.org/10.1037/0033-2909.112.3.433

Rogerson, T., Cai, D. J., Frank, A., Sano, Y., Shobe, J., Lopez-Aranda, M. F., & Silva, A. J. (2014). Synaptic tagging during memory allocation. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(3), 157–169. https://doi.org/10.1038/nrn3667

Rolls, E. T. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *7*, 74. https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00074

Roman, C. W., Lezak, K. R., Hartsock, M. J., Falls, W. A., Braas, K. M., Howard, A. B., Hammack, S. E., & May, V. (2014). PAC1 receptor antagonism in the bed nucleus of the stria terminalis

(BNST) attenuates the endocrine and behavioral consequences of chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*, *47*, 151–165. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.05.014
Romeo, R. D., Bellani, R., Karatsoreos, I. N., Chhua, N., Vernov, M., Conrad, C. D., & McEwen, B. S. (2006). Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology*, *147*(4), 1664–1674. https://doi.org/10.1210/en.2005-1432
Ross, M. C., Lenow, J. K., Kilts, C. D., & Cisler, J. M. (2018). Altered neural encoding of prediction errors in assault-related posttraumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, *103*, 83–90. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.05.008
Rubinow, M. J., & Juraska, J. M. (2009). Neuron and glia numbers in the basolateral nucleus of the amygdala from preweaning through old age in male and female rats: A stereological study. *Journal of Comparative Neurology*, *512*(6), 717–725. https://doi.org/10.1002/cne.21924
Rudy, J. W. (2009). Context representations, context functions, and the parahippocampal–hippocampal system. *Learning & Memory*, *16*(10), 573–585. https://doi.org/10.1101/lm.1494409
Rule, M. E., O'Leary, T., & Harvey, C. D. (2019). Causes and consequences of representational drift. *Current Opinion in Neurobiology, Computational Neuroscience*, *58*, 141–147. https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.08.005
Sadek, J. R., Johnson, S. A., White, D. A., Salmon, D. P., Taylor, K. I., Delapena, J. H., Paulsen, J. S., Heaton, R. K., & Grant, I. (2004). Retrograde amnesia in dementia: Comparison of HIV-associated dementia, Alzheimer's disease, and Huntington's disease. *Neuropsychology*, *18*(4), 692–699. https://doi.org/10.1037/0894-4105.18.4.692
Schoonover, C. E., Ohashi, S. N., Axel, R., & Fink, A. J. P. (2021). Representational drift in primary olfactory cortex. *Nature*, *594*(7864), 541–546. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03628-7
Schulz, K. M., Molenda-Figueira, H. A., & Sisk, C. L. (2009). Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Hormones and Behavior*, *55*(5), 597–604. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.010
Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *20*(1), 11–21. https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11
Shors, T. J., Chua, C., & Falduto, J. (2001). Sex Differences and Opposite Effects of Stress on Dendritic Spine Density in the Male Versus Female Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *21*(16), 6292–6297. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06292.2001
Sigmundi, R. A., Bouton, M. E., & Bolles, R. C. (1980). Conditioned freezing in the rat as a function of shock intensity and CS modality. *Bulletin of the Psychonomic Society*, *15*(4), 254–256. https://doi.org/10.3758/BF03334524
Singh, M., Meyer, E. M., & Simpkins, J. W. (1995). The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*, *136*(5), 2320–2324. https://doi.org/10.1210/endo.136.5.7720680
Singh, M., & Su, C. (2013). Progesterone, BDNF and Neuroprotection. *Neuroscience*, *239*, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.056
Smith, D. M., & Bulkin, D. A. (2014). The form and function of hippocampal context representations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *40*, 52–61. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.005
Solum, D. T., & Handa, R. J. (2002). Estrogen Regulates the Development of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA and Protein in the Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *22*(7), 2650–2659. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02650.2002
Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *24*(4), 417–463. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00014-2
Spear, L. P. (2004). Adolescent brain development and animal models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1021*, 23–26. https://doi.org/10.1196/annals.1308.002
Spear, N. E. (1973). Retrieval of memory in animals. *Psychological Review*, *80*(3), 163–194. https://doi.org/10.1037/h0034326
Spencer, J. L., Waters, E. M., Romeo, R. D., Wood, G. E., Milner, T. A., & McEwen, B. S. (2008). Uncovering the Mechanisms of Estrogen Effects on Hippocampal Function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*(2), 219–237. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.08.006
Spool, J. A., Bergan, J. F., & Remage-Healey, L. (2022). A neural circuit perspective on brain aromatase. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *65*, 100973. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100973

Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 171–177. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005

Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: A neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, *5*(2), 169–177. https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80023-9

Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1991). The Medial Temporal Lobe Memory System. *Science*, *253*(5026), 1380–1386. https://doi.org/10.1126/science.1896849

Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(20), 4787–4795. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004

Sweis, B. M., Mau, W., Rabinowitz, S., & Cai, D. J. (2021). Dynamic and heterogeneous neural ensembles contribute to a memory engram. *Current Opinion in Neurobiology, Neurobiology of Learning and Plasticity*, *67*, 199–206. https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.11.017

Tabatadze, N., Sato, S. M., & Woolley, C. S. (2014). Quantitative analysis of long-form aromatase mRNA in the male and female rat brain. *PloS One*, *9*(7), e100628. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100628

Takehara-Nishiuchi, K. (2014). Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neuroscience Research*, *84*, 27–33. https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.02.012

Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J., & Gould, E. (1999). Estrogen Stimulates a Transient Increase in the Number of New Neurons in the Dentate Gyrus of the Adult Female Rat. *Journal of Neuroscience*, *19*(14), 5792–5801. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05792.1999

Taxier, L. R., Gross, K. S., & Frick, K. M. (2020). Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(10), 535–550. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0362-7

Teyler, T. J., & DiScenna, P. (1986). The hippocampal memory indexing theory. *Behavioral Neuroscience*, *100*(2), 147–154. https://doi.org/10.1037/0735-7044.100.2.147

Teyler, T. J., & Rudy, J. W. (2007). The hippocampal indexing theory and episodic memory: Updating the index. *Hippocampus*, *17*(12), 1158–1169. https://doi.org/10.1002/hipo.20350

Thaut, M. H., & Hömberg, V. (2025). *Handbook of Neurologic Music Therapy* (Second Edition, New to this Edition:, Second Edition, New to this Edition:). Oxford University Press.

Toufexis, D. (2007). Region- and Sex-Specific Modulation of Anxiety Behaviours in the Rat. *Journal of Neuroendocrinology*, *19*(6), 461–473. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01552.x

Tse, D., Langston, R. F., Kakeyama, M., Bethus, I., Spooner, P. A., Wood, E. R., Witter, M. P., & Morris, R. G. M. (2007). Schemas and memory consolidation. *Science*, *316*(5821), 76–82. https://doi.org/10.1126/science.1135935

Tse, D., Takeuchi, T., Kakeyama, M., Kajii, Y., Okuno, H., Tohyama, C., Bito, H., & Morris, R. G. M. (2011). Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex. *Science*, *333*(6044), 891–895. https://doi.org/10.1126/science.1205274

Tuscher, J. J., Luine, V., Frankfurt, M., & Frick, K. M. (2016). Estradiol-Mediated Spine Changes in the Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex of Ovariectomized Female Mice Depend on ERK and mTOR Activation in the Dorsal Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *36*(5), 1483–1489. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3135-15.2016

Varela, C., Kumar, S., Yang, J. Y., & Wilson, M. A. (2014). Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Structure and Function*, *219*(3), 911–929. https://doi.org/10.1007/s00429-013-0543-5

Vetere, G., Tran, L. M., Moberg, S., Steadman, P. E., Restivo, L., Morrison, F. G., Ressler, K. J., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2019). Memory formation in the absence of experience. *Nature Neuroscience*, *22*(6), 933–940. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0389-0

VIAU, V., & MEANEY, M. J. (1991). Variations in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress during the Estrous Cycle in the Rat. *Endocrinology*, *129*(5), 2503–2511. https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2503

Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*, *24*(3), 329–342. https://doi.org/10.11613/BM.2014.035

Wagner, C. K., & Morrell, J. I. (1997). Neuroanatomical distribution of aromatase MRNA in the rat brain: Indications of regional regulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *61*(3–6), 307–314.

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2006). A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *31*(6), 1097–1111. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301067

Walf, A. A., Paris, J. J., & Frye, C. A. (2009). Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(6), 909–916. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.004

Walker, D. L., Toufexis, D. J., & Davis, M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1–3), 199–216. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01282-2

Wartman, B. C., & Holahan, M. R. (2014). The impact of multiple memory formation on dendritic complexity in the hippocampus and anterior cingulate cortex assessed at recent and remote time points. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00128

Willing, J., & Juraska, J. M. (2015). The timing of neuronal loss across adolescence in the medial prefrontal cortex of male and female rats. *Neuroscience*, *301*, 268–275. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.073

Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Behne, N. S., & Fanselow, M. S. (2001). Sex differences, context preexposure, and the immediate shock deficit in Pavlovian context conditioning with mice. *Behavioral Neuroscience*, *115*(1), 26–32. https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.1.26

Wiltgen, B. J., & Tanaka, K. Z. (2013). Systems consolidation and the content of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *106*, 365–371. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.001

Wiltgen, B. J., Zhou, M., Cai, Y., Balaji, J., Karlsson, M. G., Parivash, S. N., Li, W., & Silva, A. J. (2010). The Hippocampus Plays a Selective Role in the Retrieval of Detailed Contextual Memories. *Current Biology*, *20*(15), 1336–1344. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.068

Winocur, G., Moscovitch, M., & Bontempi, B. (2010). Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia*, *48*(8), 2339–2356. https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.04.016

Witelson, S. F., Glezer, I. I., & Kigar, D. L. (1995). Women have greater density of neurons in posterior temporal cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(5 Pt 1), 3418–3428. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03418.1995

Wood, G. E., & Shors, T. J. (1998). Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(7), 4066–4071. https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.4066

Xu, W., & Südhof, T. C. (2013). A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6125), 1290–1295. https://doi.org/10.1126/science.1229534

Yagi, S., Mohammad, A., Wen, Y., Batallán Burrowes, A. A., Blankers, S. A., & Galea, L. A. M. (2024). Estrogens dynamically regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult female rats. *Hippocampus*, *34*(11), 583–597. https://doi.org/10.1002/hipo.23633

Zarrindast, M.-R., & Khakpai, F. (2020). State-dependent memory and its modulation by different brain areas and neurotransmitters. *EXCLI Journal*, *19*, 1081–1099. https://doi.org/10.17179/excli2020-2612

Zhang, J. Q., Cai, W. Q., Zhou, D. S., & Su, B. Y. (2002). Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Research*, *935*(1–2), 73–80. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02460-5

Ziv, Y., Burns, L. D., Cocker, E. D., Hamel, E. O., Ghosh, K. K., Kitch, L. J., Gamal, A. E., & Schnitzer, M. J. (2013). Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. *Nature Neuroscience*, *16*(3), 264–266. https://doi.org/10.1038/nn.3329

11. Apêndice I (Capítulo I)

11.1 Experimento Piloto: Generalização Contextual em Fêmeas Intactas

Realizou-se um experimento piloto com fêmeas intactas (não gonadectomizadas), cuja fase estral foi verificada imediatamente após o treino e teste para avaliar um possível efeito da fase estral nos resultados. Os animais foram treinados no contexto A e, dois dias depois, testados em um de três contextos neutros (B, C ou D) – distintos daqueles utilizados no Capítulo I – para avaliar diferentes graus de generalização da memória.

EMBARGO

11.2 Material Suplementar (Capítulo I)

Artigo científico publicado em 2025 na revista *Learning and Memory Vol. 32, Nos. 5–6*: “**Multiple context discrimination in adult rats: sex variability and dynamics of time-dependent generalization of an aversive memory**”.

Multiple context discrimination in adult rats: sex variability and dynamics of time-dependent generalization of an aversive memory

Fernanda Nogueira Lotz, Kétlyn Talise Knak Guerra, Ana Paula Crestani, Jorge Alberto Quillfeldt

Supplemental Material

INDEX

Figure S-1 – Context configurations

Comparing fear responses in each context

Figure S-2 - Comparing fear responses in each context

Table S-1 - Significances and effect sizes for groups compared in Figure S-2

Multivariate Analysis of behavioral data

Figure S-3 – Pearson's correlations - Heatmaps

Table S-2 - Pearson's r coefficients, p-values and Confidence Intervals of groups analyzed in Figure S-3

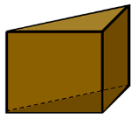
Figure S-4 - PCAs (A to F)

Table S-3 - PCA loading scores, Eigenvalues and Explained Variances for groups analyzed in Figure S-4

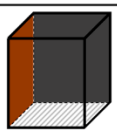
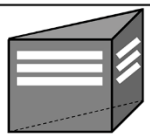
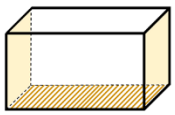
Context configurations

Our initial goal was to obtain a graded fear response in the novel contexts in male and female rats, “stair-case like” representation of decreasing freezing levels at 2 days after training. The three neutral contexts B, C and D were designed primarily on intuition, to differ from the aversive conditioning chamber A in a graded form. The multiple novel contexts were intuitively conceived based on multidimensional criteria, namely chamber shape and floor texture (Pilot Study) and chamber size and odor (Main Experiment). **Table S-1**, below, illustrates the two sets of contexts and describe some of their distinguishing characteristics.

A

Pilot Study				
				
Context	**A (conditioning)**	**P1 (neutral)**	**P2 (neutral)**	**P3 (neutral)**
Chamber shape	square cuboid	circular	triangular	square cuboid
Size	22 x 22 x 33 (LxWxH cm)	25 x 22 (D x H cm)	35; 14.5; 23 x 6.5 (S1;S2;S3 x H cm)	25 x 25 x 29 (LxWxH cm)
Floor texture	parellel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart	smooth black plywood with wood shavings	white tempered glass	parallel 0.1 cm caliber stainless copper bars spaced 1 cm apart
Wall texture and color	three black and one pastel brown	vertical black and white stipes	brown plywood	three opaque beige and one transparent
Illumination	webcam and chamber wall lights	ceiling lamp	ceiling lamp	desk lamp near the transparent wall
Odor (cleaning agent)	70% ethanol	70% isopropyl alcohol	quaternary ammonium disinfectant	70% isopropyl alcohol
Room used	conditioning room	novel room	novel room	conditioning room

B

Main Experiment				
				
Context	**A (conditioning)**	**B (modified conditioning)**	**C (neutral)**	**D (neutral)**
Chamber shape	square cuboid	semicircle	triangular	rectangular cuboid
Size	22 x 22 x 33 (LxWxH cm)	25 x 22 x 33 (LxWxH cm)	34; 28; 48 x 19 (S1;S2;S3 x H cm)	50 x 25 x 29 (LxWxH cm)
Floor texture	parellel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart	smooth brown vinyl	smooth black plywood	parallel 0.1 cm caliber stainless copper bars spaced 1 cm apart
Wall texture and color	three black and one pastel brown	same as context A with an added brown rubber forming a semicircle	smooth black plywood with white markings	three opaque beige and one transparent
Illumination	webcam and chamber wall lights	webcam light	ceiling lamp	desk lamp near the transparent wall
Odor (cleaning agent)	70% ethanol	70% ethanol	quaternary ammonium disinfectant	70% isopropyl alcohol
Room used	conditioning room	conditioning room	novel room	conditioning room

Supplemental Figure 1. schematic illustration depicting the specific contexts used in this study. (**A**) Pilot study (2 days only); (**B**) Main experiment (2, 28 and 45 day training-test intervals). In our pilot groups we also included P1', a modified version of context P1, without wood shavings in the floor.

Comparing fear responses in each context

We compared the performance of females and males separately across these time intervals – in contexts A, B, C and D. The results are presented in the Supplemental **Figure S-2.**, below.

Context A:

Independent two-way ANOVA of rats tested in context A in three different training-test intervals revealed only the effect of Sex ($F_{(1,55)} = 25.13$; $P < 0.0001$, $\omega 2 = 0.28$), with no significant effect either in the

interaction Sex x Time ($F_{(2,55)} = 2.389$; $P = 0.1012$), or in Time ($F_{(2,55)} = 2.403$; $P = 0.0999$). According to the ω2, the detected effect was large and robust.

In females, Tukey *post hoc* multiple comparisons revealed a negligible difference in freezing levels for context A between 2 and 28 days ($P = 0.0422$, $g = 1.557$), and no significant differences between 28 and 45 days ($P = 0.6499$). In males, there were no significant differences between 2 and 28 days ($P > 0.999$) and between 28 and 45 days ($P = 0.9983$). Comparing sexes, females differed from males only at 2 days ($P = 0.0004$, $g = 2.70$), while no significant differences were found at 28 ($P = 0.6029$), and 45 days ($P = 0.1418$). Number of subjects per sex at each time point: females (2, 28 and 45d) = 10, 11, 9, and males = 11, 11, 9.

Context B:

For animals tested in the modified conditioning context B, independent two-way ANOVA revealed an effect of Sex ($F_{(1,57)} = 45.58$; $P < 0.0001$, $\omega2 = 0.41$), Time ($F_{(2,57)} = 29.72$; $P < 0.0001$, $\omega2 = 0.48$) and a Sex x Time interaction ($F_{(2,57)} = 11.53$; $P < 0.001$, $\omega2 = 0.25$). According to the ω2, the detected effect was large and robust.

In females, Tukey *post hoc* multiple comparisons revealed a significant difference in freezing levels 2 and 28 days ($P < 0.0001$, $g = 4.229$), and no significant differences between 28 and 45 days ($P = 0.1045$). In males, there were no significant differences between 2 and 28 days ($P = 0.1823$) and between 28 and 45 days ($P = 0.2479$). Comparing sexes, females differed from males only at 2 days ($P < 0.0001$, $g = 5.320$), while no significant differences were found at 28 ($P = 0.5256$), and 45 days ($P = 0.2679$). Number of subjects per sex at each time point: females (2, 28 and 45d) = 10, 11, 9, and males = 11,

11, 11.

Context C:

For animals tested in the novel context C, independent two-way ANOVA revealed an effect of Sex ($F_{(1,58)} = 45.58$; $P < 0.0001$, $\omega 2 = 0.41$), but no effect of Time ($F_{(2,58)} = 2.165$; $P = 0.1239$), or Sex x Time interaction ($F_{(1,58)} = 1.815$; $P = 0.172$). According to the ω2, the detected effect was large and robust.

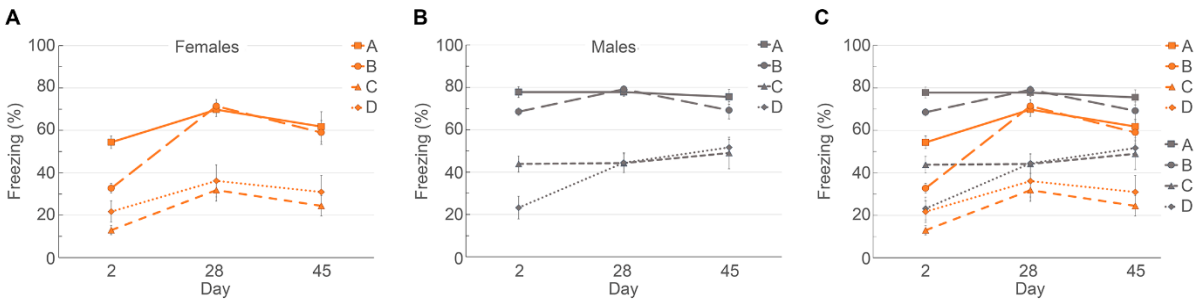
In females, Tukey *post hoc* multiple comparisons revealed there were no differences in freezing levels 2 and 28 days ($P = 0.0926$), or between 28 and 45 days ($P = 0.9064$). Likewise in males, no differences were found between groups tested at 2 and 28 days ($P > 0.9999$) and between 28 and 45 days ($P = 0.9834$). Comparing sexes, females differed from males at 2 days ($P = 0.0009$, $g = 2.909$), and 45 days ($P = 0.0175$, $g = 1.199$), but not at 28 days ($P = 0.4641$). Number of subjects per sex at each time point: females (2, 28 and 45d) = 10, 12, 9, and males = 11, 11, 11.

Context D:

For rats tested in the novel context D, independent two-way ANOVA revealed an effect of Sex ($F_{(1,58)} = 4.651$; $P = 0.2571$, $\omega 2 = 0.05$), and of Time ($F_{(2,58)} = 6.831$; $P = 0.0022$, $\omega 2 = 0.15$), but not a Sex x Time interaction ($F_{(2,58)} = 1.391$; $P = 0.2571$). According to the ω2, the detected effect for Time was large and robust.

In females, Tukey *post hoc* multiple comparisons revealed there were no differences in freezing levels 2 and 28 days ($P = 0.4755$), or between 28 and 45 days ($P = 0.9893$). In males, no differences were found between groups tested at 2 and 28 days ($P = 0.1024$) and

between 28 and 45 days (P = 0.9453), but there was a significant difference between males tested at 2 and 45 days (P = 0.0097, g = 1.895). Comparing sexes, females did not differ from males at any of the tested time intervals (P > 0.15 in all cases). Number of subjects per sex at each time point: females (2, 28 and 45d) = 11, 11, 9, and males = 11, 11, 11.



Supplemental Figure 2. comparisons of performances for each sex and timepoint in each context**.** (A) Line graphs representing freezing responses of females tested at 2, 28 and 45 days in contexts A, B, C and D. (B) *idem* for males tested at the same time points in the same contexts. (C) Comparison between males and females.

The comparisons shown above between male and female rats in each context tested in the Pilot Study and Main Experiment, were based on the adjusted p values (independent 2-way ANOVA with Tukey's posthoc test) presented in **Table S-1**, below, which includes Hedge's g calculated for cases in which P > 0.05.

Pilot Experiment		
Tukey's multiple comparisons test	**Effect size (g)**	**Adjusted P Value**
Females:Context A vs. Females:Context P1	1.896	<0.0001
Females:Context A vs. Females:Context P2	4.55	<0.0001
Females:Context A vs. Females:Context P3	3.848	<0.0001
Females:Context A vs. Females:Context P1'	2.069	0.0001
Females:Context A vs. Males:Context A	-	>0.9999
Females:Context A vs. Males:Context P1	-	>0.9999
Females:Context A vs. Males:Context P2	2.44	0.0083
Females:Context A vs. Males:Context P3	2.994	0.014
Females:Context A vs. Males:Context P1'	-	0.7236
Females:Context P1 vs. Females:Context P2	-	0.9753
Females:Context P1 vs. Females:Context P3	-	>0.9999
Females:Context P1 vs. Females:Context P1'	-	>0.9999
Females:Context P1 vs. Males:Context A	1.979	<0.0001
Females:Context P1 vs. Males:Context P1	1.656	<0.0001
Females:Context P1 vs. Males:Context P2	0.483	0.8786
Females:Context P1 vs. Males:Context P3	0.523	0.8648
Females:Context P1 vs. Males:Context P1'	1.133	0.0445
Females:Context P2 vs. Females:Context P3	-	>0.9999
Females:Context P2 vs. Females:Context P1'	-	0.9646
Females:Context P2 vs. Males:Context A	4.473	<0.0001
Females:Context P2 vs. Males:Context P1	3.128	<0.0001
Females:Context P2 vs. Males:Context P2	-	0.324
Females:Context P2 vs. Males:Context P3	-	0.3182
Females:Context P2 vs. Males:Context P1'	2.901	0.0056
Females:Context P3 vs. Females:Context P1'	-	0.9996
Females:Context P3 vs. Males:Context A	3.833	<0.0001
Females:Context P3 vs. Males:Context P1	2.725	<0.0001
Females:Context P3 vs. Males:Context P2	-	0.691
Females:Context P3 vs. Males:Context P3	-	0.675
Females:Context P3 vs. Males:Context P1'	2.353	0.0278
Females:Context P1' vs. Males:Context A	2.156	<0.0001
Females:Context P1' vs. Males:Context P1	1.737	0.0003
Females:Context P1' vs. Males:Context P2	-	0.9664
Females:Context P1' vs. Males:Context P3	-	0.9586

Females:Context P1' vs. Males:Context P1'	-	0.1204
Males:Context A vs. Males:Context P1	-	0.9996
Males:Context A vs. Males:Context P2	2.49	0.0029
Males:Context A vs. Males:Context P3	2.962	0.0054
Males:Context A vs. Males:Context P1'	-	0.578
Males:Context P1 vs. Males:Context P2	1.727	0.0189
Males:Context P1 vs. Males:Context P3	1.872	0.0313
Males:Context P1 vs. Males:Context P1'	-	0.904
Males:Context P2 vs. Males:Context P3	-	>0.9999
Males:Context P2 vs. Males:Context P1'	-	0.7376
Males:Context P3 vs. Males:Context P1'	-	0.8
Main Experiment		
Tukey's multiple comparisons test	**Effect size (g)**	**Adjusted P Value**
2 days		
Females:Context A vs. Females:Context B	2.256	0.002
Females:Context A vs. Females:Context C	4.966	<0.0001
Females:Context A vs. Females:Context D	2.379	<0.0001
Females:Context A vs. Males:Context A	2.641	0.0004
Females:Context A vs. Males:Context B	-	0.1147
Females:Context A vs. Males:Context C	-	0.4441
Females:Context A vs. Males:Context D	2.16	<0.0001
Females:Context B vs. Females:Context C	2.644	0.0068
Females:Context B vs. Females:Context D	-	0.3884
Females:Context B vs. Males:Context A	5.566	<0.0001
Females:Context B vs. Males:Context B	5.294	<0.0001
Females:Context B vs. Males:Context C	-	0.3677
Females:Context B vs. Males:Context D	-	0.5778
Females:Context C vs. Females:Context D	-	0.6724
Females:Context C vs. Males:Context A	8.247	<0.0001
Females:Context C vs. Males:Context B	8.583	<0.0001
Females:Context C vs. Males:Context C	2.933	<0.0001
Females:Context C vs. Males:Context D	-	0.4789
Females:Context D vs. Males:Context A	4.24	<0.0001
Females:Context D vs. Males:Context B	3.745	<0.0001
Females:Context D vs. Males:Context C	1.486	0.0007
Females:Context D vs. Males:Context D	-	>0.9999
Males:Context A vs. Males:Context B	-	0.5719
Males:Context A vs. Males:Context C	3.132	<0.0001
Males:Context A vs. Males:Context D	3.923	<0.0001
Males:Context B vs. Males:Context C	2.483	0.0001

Males:Context B vs. Males:Context D	3.426	<0.0001
Males:Context C vs. Males:Context D	1.331	0.002
28 days		
Females:Context A vs. Females:Context B	-	>0.9999
Females:Context A vs. Females:Context C	2.54	<0.0001
Females:Context A vs. Females:Context D	1.758	<0.0001
Females:Context A vs. Males:Context A	-	0.903
Females:Context A vs. Males:Context B	-	0.8021
Females:Context A vs. Males:Context C		0.0023
Females:Context A vs. Males:Context D		0.0026
Females:Context B vs. Females:Context C	2.647	<0.0001
Females:Context B vs. Females:Context D	1.854	<0.0001
Females:Context B vs. Males:Context A	-	0.9711
Females:Context B vs. Males:Context B	-	0.918
Females:Context B vs. Males:Context C	1.999	0.0009
Females:Context B vs. Males:Context D	1.905	0.001
Females:Context C vs. Females:Context D	-	0.9965
Females:Context C vs. Males:Context A	3.339	<0.0001
Females:Context C vs. Males:Context B	3.479	<0.0001
Females:Context C vs. Males:Context C	-	0.4628
Females:Context C vs. Males:Context D	-	0.4405
Females:Context D vs. Males:Context A	2.289	<0.0001
Females:Context D vs. Males:Context B	2.381	<0.0001
Females:Context D vs. Males:Context C	-	0.8957
Females:Context D vs. Males:Context D	-	0.8824
Males:Context A vs. Males:Context B	-	>0.9999
Males:Context A vs. Males:Context C	2.967	<0.0001
Males:Context A vs. Males:Context D	2.803	<0.0001
Males:Context B vs. Males:Context C	3.145	<0.0001
Males:Context B vs. Males:Context D	2.967	<0.0001
Males:Context C vs. Males:Context D	-	>0.9999
45 days		
Females:Context A vs. Females:Context B	-	>0.9999
Females:Context A vs. Females:Context C	2.063	0.0008
Females:Context A vs. Females:Context D	1.378	0.0105
Females:Context A vs. Males:Context A	-	0.725
Females:Context A vs. Males:Context B	-	0.9819
Females:Context A vs. Males:Context C	-	0.7521
Females:Context A vs. Males:Context D	-	0.9097
Females:Context B vs. Females:Context C	2.219	0.0025
Females:Context B vs. Females:Context D	1.377	0.0278

Females:Context B vs. Males:Context A	-	0.5093
Females:Context B vs. Males:Context B	-	0.904
Females:Context B vs. Males:Context C	-	0.9143
Females:Context B vs. Males:Context D	-	0.9836
Females:Context C vs. Females:Context D	-	0.9939
Females:Context C vs. Males:Context A	4.055	<0.0001
Females:Context C vs. Males:Context B	3.227	<0.0001
Females:Context C vs. Males:Context C	-	0.0578
Females:Context C vs. Males:Context D	2.046	0.0233
Females:Context D vs. Males:Context A	2.45	<0.0001
Females:Context D vs. Males:Context B	2.058	0.0002
Females:Context D vs. Males:Context C	-	0.3329
Females:Context D vs. Males:Context D	-	0.1779
Males:Context A vs. Males:Context B	-	0.9932
Males:Context A vs. Males:Context C	1.348	0.0299
Males:Context A vs. Males:Context D	-	0.0723
Males:Context B vs. Males:Context C	-	0.1519
Males:Context B vs. Males:Context D	-	0.3023
Males:Context C vs. Males:Context D	-	>0.9999

Supplemental Table 1. P values obtained in the Pilot Study and Main Experiment (independent two-way ANOVA with Tukey posthoc test). Hedge's g effect sizes were added where applicable.

Multivariate Analysis of behavioral data

Conceptualization and methodology

It remains unclear which *boundary conditions* mediate the selection between slightly different contexts. However, we adhere to the configural perspective (Pearce and Bouton, 2001), which posits that a whole set of sensory perceptions becomes associated simultaneously with an unconditioned stimulus, i.e., a 'context' is understood as a *space-confined multisensory cluster* composed of inseparable yet distinguishable parameters.

Similar to the three Pilot neutral contexts, neutral contexts B, C, and D were designed intuitively to differ from the aversive conditioning chamber A in a graded manner. Each incorporated multiple types of sensory information (tactile, visual, olfactory, or combinations thereof) in order to obtain measurable differences, despite the difficulty in determining which modality might dominate for each sex at different times after training. **Figure S-1** outlines the several parameters from which five were selected – FLOOR, WALLS, SIZE, ROOM and SCENT. For Multivariate Analysis, two or three variables were attributed to each of these five parameters: respectively, smooth vs. grid (FLOOR texture), planar vs. curved (WALL geometry), ethanol vs. isopropyl alcohol vs. quaternary ammonium (cleaning agent SCENT), larger vs. smaller (chamber SIZE) and conditioning vs. novel (test session ROOM).

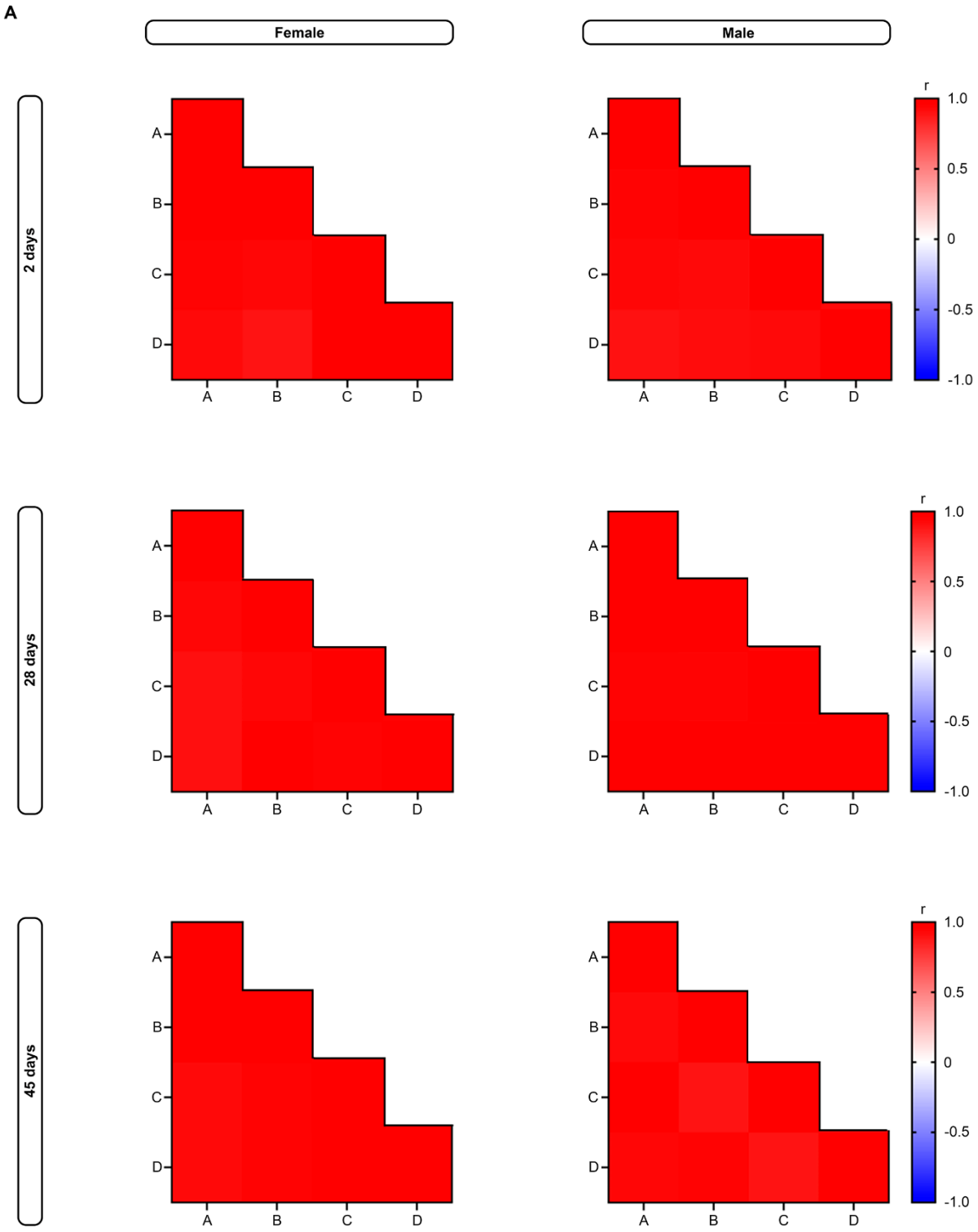
Each of the eleven groups described above was formed by *pooling* data from two or three context groups, selected based on the relevant parameter, for instance, data from contexts A + D for contexts with a grid floor, and from B + C for smooth floor. Groupings were as follows: A+D (grid) vs. B+C (smooth) for FLOOR, A+C+D (planar) vs. B (curved), for WALL, A+B (smaller) vs. C+D (larger) for SIZE, A+B+D (conditioning) vs. C (novel) for ROOM, and A+B (ethanol) vs. C (quaternary ammonium) vs. D (isopropyl alcohol). Note that with these five parameters, there were no redundant groupings - each pool was distinct. Because the pooled groups differed in sample size, missing values were replaced with the respective sample mean to perform analyses.

We then reassessed our reorganized data analyzing correlations (Heatmaps) and performing multidimensional data reduction with Principal Component Analysis. Results are shown in

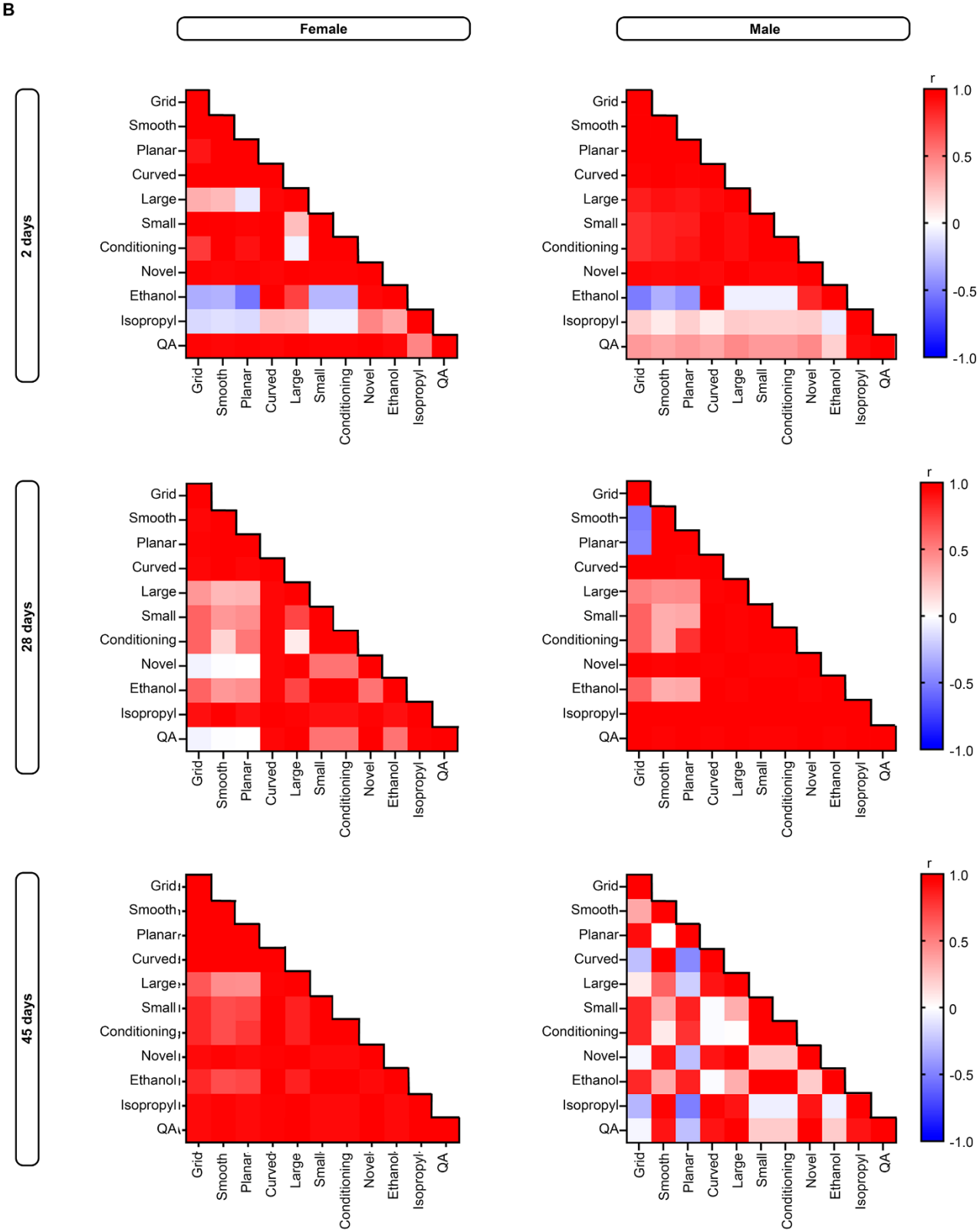
Figures S-3 and **S-4.**

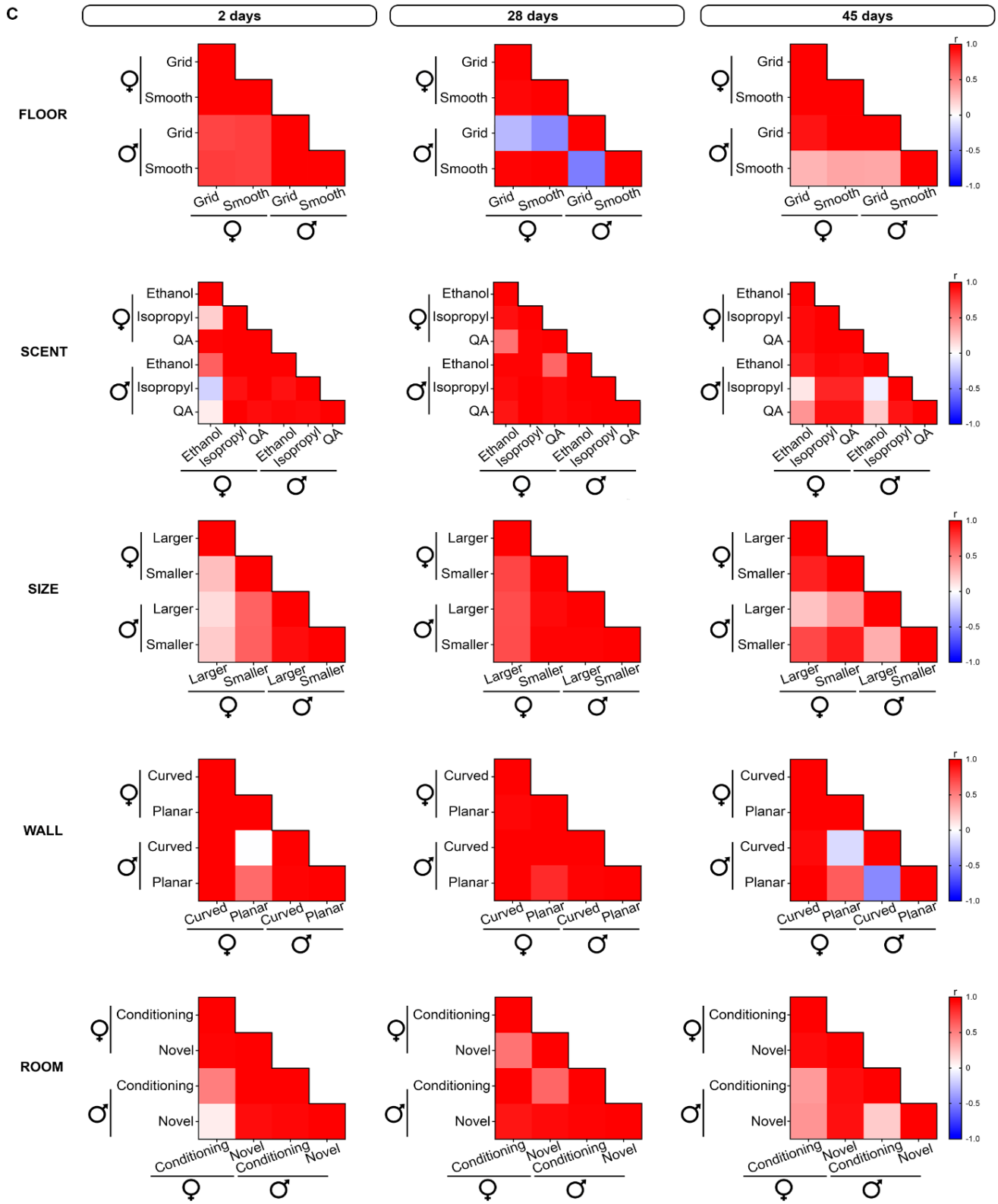
Pearson's Correlation Matrices

We performed Pearson's correlation analyses to identify positively and negatively correlated sensory modality variables between females and males tested at each post-training interval (2, 28 and 45 days). **Figure S-3** below shows the Heatmaps of (A) the four contexts A, B, C and D in the main experiment, organized per sex and training-test interval, (B) the 11 variables of the 5 selected parameters compared simultaneously - organized as in (A), and (C) the 5 parameters analyzed separately, comparing their respective variables per sex.


A
Female
Male
2 days
28 days
45 days
A
B
C
D
r
1.0
0.5
0
-0.5
-1.0

B


Female
Male
2 days
28 days
45 days
Grid
Smooth
Planar
Curved
Large
Small
Conditioning
Novel
Ethanol
Isopropyl
QA
r
1.0
0.5
0
-0.5
-1.0



Supplemental Figure 3. Pearson's correlation matrix heatmaps for different contexts and parameter groups (Main Experiment). **A:** Pearson's correlation

coefficients comparing mean percentage of freezing time in each test context (A, B, C and D) for females and males at 2, 28 and 45 days. **B:** Correlations for each of the eleven parameter variables (grid vs. smooth, curved vs. planar, larger vs. smaller, conditioning vs. novel, ethanol vs. isopropyl alcohol vs. quaternary ammonium) compared across sexes and different intervals. **C:** Heatmaps showing correlations between different sensory modality parameters (Cleaning agent scent, Wall geometry, Test session room, Floor texture and Test chamber size) for each interval. Square color shows the Pearson's r coefficient (r), with dark red indicating a strong positive correlation (r = +1) and dark blue, a strong negative correlation (r = -1). White squares indicate no correlation between comparisons (r = 0). Percentage of freezing times were pooled together for Smooth floor (contexts B and C), Grid floor (contexts A and D), Curved walls (context B) and Planar walls (contexts A, C and D), Large test chamber (contexts C and D) and Small test chamber (contexts A and B), Conditioning room (contexts A, B and D) and Novel room (context C), 70% ethanol (contexts A and B), 70% isopropyl (context D) and quaternary ammonium (context C). QA: quaternary ammonium.

Correlation Matrices

Pearson's r

2 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	1.000	0.260	0.144	0.208
Smaller chamber females	0.260	1.000	0.615	0.622
Larger chamber males	0.144	0.615	1.000	0.910
Smaller chamber males	0.208	0.622	0.910	1.000

28 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	1.000	0.719	0.687	0.691
Smaller chamber females	0.719	1.000	0.925	0.948
Larger chamber males	0.687	0.925	1.000	0.950
Smaller chamber males	0.691	0.948	0.950	1.000

45 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	1.000	0.849	0.245	0.710
Smaller chamber females	0.849	1.000	0.408	0.868
Larger chamber males	0.245	0.408	1.000	0.322
Smaller chamber males	0.710	0.868	0.322	1.000

P-values

2 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	0	0.267947561	0.534463436	0.364648606
Smaller chamber females	0.267947561	0	0.003919033	0.003384902
Larger chamber males	0.534463436	0.003919033	0	4.25778E-09
Smaller chamber	0.364648606	0.003384902	4.25778E-09	0

males				

28 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	0	0.000160709	0.000409887	0.000366955
Smaller chamber females	0.000160709	0	7.45724E-10	1.97506E-11
Larger chamber males	0.000409887	7.45724E-10	0	1.30209E-11
Smaller chamber males	0.000366955	1.97506E-11	1.30209E-11	0

45 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	0	8.34521E-06	0.326721358	0.00097313
Smaller chamber females	8.34521E-06	0	0.092568749	2.99982E-06
Larger chamber males	0.326721358	0.092568749	0	0.166113178
Smaller chamber males	0.00097313	2.99982E-06	0.166113178	0

Confidence Intervals of r

2 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	1.000 to 1.000	-0.2061 to 0.6301	-0.3071 to 0.5417	-0.2454 to 0.5873
Smaller chamber females	-0.2061 to 0.6301	1.000 to 1.000	0.2366 to 0.8312	0.2482 to 0.8349
Larger chamber males	-0.3071 to 0.5417	0.2366 to 0.8312	1.000 to 1.000	0.7927 to 0.9624
Smaller chamber males	-0.2454 to 0.5873	0.2482 to 0.8349	0.7927 to 0.9624	1.000 to 1.000

28 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	1.000 to 1.000	0.4275 to 0.8755	0.3740 to 0.8597	0.3806 to 0.8617
Smaller chamber females	0.4275 to 0.8755	1.000 to 1.000	0.8252 to 0.9688	0.8776 to 0.9787
Larger chamber males	0.3740 to 0.8597	0.8252 to 0.9688	1.000 to 1.000	0.8825 to 0.9796
Smaller chamber males	0.3806 to 0.8617	0.8776 to 0.9787	0.8825 to 0.9796	1.000 to 1.000

45 days

	Larger chamber females	Smaller chamber females	Larger chamber males	Smaller chamber males
Larger chamber females	1.000 to 1.000	0.6332 to 0.9424	-0.2503 to 0.6389	0.3629 to 0.8837
Smaller chamber females	0.6332 to 0.9424	1.000 to 1.000	-0.07240 to 0.7350	0.6749 to 0.9500
Larger chamber males	-0.2503 to 0.6389	-0.07240 to 0.7350	1.000 to 1.000	-0.1405 to 0.6692
Smaller chamber males	0.3629 to 0.8837	0.6749 to 0.9500	-0.1405 to 0.6692	1.000 to 1.000

Pearson's r

2 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning room females	1.00	0.95	0.51	0.07
Novel room females	0.95	1.00	0.97	0.92
Conditioning room males	0.51	0.97	1.00	0.93
Novel room males	0.07	0.92	0.93	1.00

28 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning	1.00	0.55	0.96	

room females				
Novel room females	0.55	1.00	0.60	0.92
Conditioning room males	0.96	0.60	1.00	0.95
Novel room males	0.89	0.92	0.95	1.00

45 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning room females	1.00	0.92	0.40	0.42
Novel room females	0.92	1.00	0.92	0.90
Conditioning room males	0.40	0.92	1.00	0.21
Novel room males	0.42	0.90	0.21	1.00

P-values

2 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning room females	0	1.88803E-05	0.003457138	0.835480603
Novel room females	1.88803E-05	0	6.0366E-06	0.000192999
Conditioning room males	0.003457138	6.0366E-06	0	2.76918E-05
Novel room males	0.835480603	0.000192999	2.76918E-05	0

28 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning room females	1.1365E-233	0.06428691	1.96876E-19	0.000245406
Novel room females	0.06428691	0	0.039170721	5.83842E-05
Conditioning room males	1.96876E-19	0.039170721	0	1.00953E-05
Novel room males	0.000245406	5.83842E-05	1.00953E-05	0

45 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning room females	0	0.00046589	0.040740727	0.19577853
Novel room females	0.00046589	0	0.00050415	0.000853511
Conditioning room males	0.040740727	0.00050415	0	0.539158623
Novel room males	0.19577853	0.000853511	0.539158623	0

Confidence Intervals

2 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning room females	1.000 to 1.000	0.8114 to 0.9893	0.1886 to 0.7314	-0.5523 to 0.6435
Novel room females	0.8114 to 0.9893	1.000 to 1.000	0.8561 to 0.9920	0.6779 to 0.9804
Conditioning room males	0.1886 to 0.7314	0.8561 to 0.9920	1.000 to 1.000	0.7566 to 0.9828
Novel room males	-0.5523 to 0.6435	0.6779 to 0.9804	0.7566 to 0.9828	1.000 to 1.000

28 days

	Conditioning room females	Novel room females	Conditioning room males	Novel room males
Conditioning room females	1.000 to 1.000	-0.03581 to 0.8540	0.9249 to 0.9815	0.6214 to 0.9712
Novel room females	-0.03581 to 0.8540	1.000 to 1.000	0.03978 to 0.8732	0.7163 to 0.9795
Conditioning room males	0.9249 to 0.9815	0.03978 to 0.8732	1.000 to 1.000	0.8027 to 0.9864
Novel room males	0.6214 to 0.9712	0.7163 to 0.9795	0.8027 to 0.9864	1.000 to 1.000

45 days				
	Conditioning room females	**Novel room females**	**Conditioning room males**	**Novel room males**
Conditioning room females	1.000 to 1.000	0.6529 to 0.9830	0.01911 to 0.6747	-0.2379 to 0.8155
Novel room females	0.6529 to 0.9830	1.000 to 1.000	0.6460 to 0.9826	0.5964 to 0.9796
Conditioning room males	0.01911 to 0.6747	0.6460 to 0.9826	1.000 to 1.000	-0.4476 to 0.7183
Novel room males	-0.2379 to 0.8155	0.5964 to 0.9796	-0.4476 to 0.7183	1.000 to 1.000

Pearson's r				
2 days				
	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	1.00	0.98	0.97	0.96
Planar female	0.98	1.00	-0.01	0.58
Curved male	0.97	-0.01	1.00	0.94
Planar male	0.96	0.58	0.94	1.00
28 days				
	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	1.00	0.94	0.97	0.98
Planar female	0.94	1.00	0.96	0.81
Curved male	0.97	0.96	1.00	0.94
	0.98	0.81	0.94	1.00
45 days				
	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	1.00	0.99	0.93	0.98
Planar female	0.99	1.00	-0.15	0.63
Curved male	0.93	-0.15	1.00	-0.47
Planar male	0.98	0.63	-0.47	1.00
P-values				
2 days				
	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	0	4.23657E-07	3.87645E-06	8.21009E-06
Planar female	4.23657E-07	0	0.976512126	0.000565155
Curved male	3.87645E-06	0.976512126	0	1.23321E-05
Planar male	8.21009E-06	0.000565155	1.23321E-05	0
28 days				
	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	0	1.87238E-05	6.94195E-07	2.73913E-07
Planar female	1.87238E-05	1.0518E-244	1.89304E-06	9.50654E-09
Curved male	6.94195E-07	1.89304E-06	0	1.23321E-05
Planar male	2.73913E-07	9.50654E-09	1.23321E-05	0
45 days				
	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	0	4.32258E-07	0.000301501	2.63318E-06
Planar female	4.32258E-07	0	0.657896694	0.000374776
Curved male	0.000301501	0.657896694	0	0.145555803
Planar male	2.63318E-06	0.000374776	0.145555803	4.1612E-220
Confidence Intervals				
2 days				
	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	1.000 to 1.000	0.9243 to 0.9959	0.8706 to 0.9929	0.8452 to 0.9914
Planar female	0.9243 to 0.9959	1.000 to 1.000	-0.6063 to 0.5934	0.2893 to 0.7773

Curved male	0.8706 to 0.9929	-0.6063 to 0.5934	1.000 to 1.000	0.7942 to 0.9858
Planar male	0.8452 to 0.9914	0.2893 to 0.7773	0.7942 to 0.9858	1.000 to 1.000

28 days

	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	1.000 to 1.000	0.7755 to 0.9843	0.8882 to 0.9926	0.9086 to 0.9940
Planar female	0.7755 to 0.9843	1.000 to 1.000	0.8615 to 0.9907	0.6503 to 0.9036
Curved male	0.8882 to 0.9926	0.8615 to 0.9907	1.000 to 1.000	0.7942 to 0.9858
Planar male	0.9086 to 0.9940	0.6503 to 0.9036	0.7942 to 0.9858	1.000 to 1.000

45 days

	Curved female	**Planar female**	**Curved male**	**Planar male**
Curved female	1.000 to 1.000	0.9474 to 0.9978	0.6892 to 0.9851	0.9129 to 0.9963
Planar female	0.9474 to 0.9978	1.000 to 1.000	-0.6884 to 0.4937	0.3359 to 0.8176
Curved male	0.6892 to 0.9851	-0.6884 to 0.4937	1.000 to 1.000	-0.8342 to 0.1820
Planar male	0.9129 to 0.9963	0.3359 to 0.8176	-0.8342 to 0.1820	1.000 to 1.000

Pearson's r

2 days

	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	1.00	0.98	0.72	0.75
Smooth female	0.98	1.00	0.74	0.74
Grid male	0.72	0.74	1.00	0.96
Smooth male	0.75	0.74	0.96	1.00

28 days

	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	1.00	0.94	-0.29	0.95
Smooth female	0.94	1.00	-0.47	0.98
Grid male	-0.29	-0.47	1.00	-0.52
Smooth male	0.95	0.98	-0.52	1.00

45 days

	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	1.00	0.96	0.89	0.30
Smooth female	0.96	1.00	0.96	0.36
Grid male	0.89	0.96	1.00	0.35
Smooth male	0.30	0.36	0.35	1.00

P-values

2 days

	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	0	4.50394E-14	0.000201288	9.0058E-05
Smooth female	4.50394E-14	0	0.000199732	0.000207776
Grid male	0.000201288	0.000199732	0	1.69531E-12
Smooth male	9.0058E-05	0.000207776	1.69531E-12	0

28 days

	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	1.5156E-153	7.1847E-11	0.195225002	9.15513E-12
Smooth female	7.1847E-11	0	0.027631135	1.1363E-14
Grid male	0.195225002	0.027631135	0	0.013754196
Smooth male	9.15513E-12	1.1363E-14	0.013754196	1.5156E-153

45 days

	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	0	4.16566E-10	7.07757E-07	0.225130444
Smooth female	4.16566E-10	2.2665E-121	1.24325E-10	0.141679385
Grid male	7.07757E-07	1.24325E-10	0	0.128855033
Smooth male	0.225130444	0.141679385	0.128855033	0

Confidence Intervals of r				
2 days				
	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	1.0 to 1.0	0.95 to 0.99	0.43 to 0.88	0.47 to 0.89
Smooth female	0.95 to 0.99	1.0 to 1.0	0.44 to 0.89	0.44 to 0.89
Grid male	0.43 to 0.88	0.44 to 0.89	1.0 to 1.0	0.90 to 0.98
Smooth male	0.47 to 0.89	0.44 to 0.89	0.90 to 0.98	1.0 to 1.0
28 days				
	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	1.000 to 1.000	0.8610 to 0.9756	-0.6322 to 0.1531	0.8866 to 0.9803
Smooth female	0.8610 to 0.9756	1.000 to 1.000	-0.7436 to -0.05922	0.9415 to 0.9901
Grid male	-0.6322 to 0.1531	-0.7436 to -0.05922	1.000 to 1.000	-0.7706 to -0.1219
Smooth male	0.8866 to 0.9803	0.9415 to 0.9901	-0.7706 to -0.1219	1.000 to 1.000
45 days				
	Grid female	**Smooth female**	**Grid male**	**Smooth male**
Grid female	1.000 to 1.000	0.8889 to 0.9846	0.7262 to 0.9590	-0.1932 to 0.6732
Smooth female	0.8889 to 0.9846	1.000 to 1.000	0.9042 to 0.9868	-0.1279 to 0.7082
Grid male	0.7262 to 0.9590	0.9042 to 0.9868	1.000 to 1.000	-0.1081 to 0.6870
Smooth male	-0.1932 to 0.6732	-0.1279 to 0.7082	-0.1081 to 0.6870	1.000 to 1.000

Correlation Matrices

Pearson's r						
2 days						
	Ethanol female	**Isopropyl female**	**QA female**	**Ethanol male**	**Isopropyl male**	**QA male**
Ethanol female	1.00	0.20	0.95	0.62	-0.19	0.07
Isopropyl female	0.20	1.00	0.98	0.96	0.90	0.96
QA female	0.95	0.98	1.00	0.97	0.99	0.92
Ethanol male	0.62	0.96	0.97	1.00	0.90	0.93
Isopropyl male	-0.19	0.90	0.99	0.90	1.00	0.92
QA male	0.07	0.96	0.92	0.93	0.92	1.00
28 days						
	Ethanol female	**Isopropyl female**	**QA female**	**Ethanol male**	**Isopropyl male**	**QA male**
Ethanol female	1.00	0.91	0.55	0.95	0.92	0.89
Isopropyl female	0.91	1.00	0.95	0.95	0.98	0.99
QA female	0.55	0.95	1.00	0.60	0.93	0.92
Ethanol male	0.95	0.95	0.60	1.00	0.97	0.95
Isopropyl male	0.92	0.98	0.93	0.97	1.00	0.96
QA male	0.89	0.99	0.92	0.95	0.96	1.00
45 days						
	Ethanol female	**Isopropyl female**	**QA female**	**Ethanol male**	**Isopropyl male**	**QA male**
Ethanol female	1.00	0.92	0.92	0.87	0.10	0.42
Isopropyl female	0.92	1.00	0.97	0.94	0.83	0.91
QA female	0.92	0.97	1.00	0.92	0.83	0.90
Ethanol male	0.87	0.94	0.92	1.00	-0.07	0.21
Isopropyl male	0.10	0.83	0.83	-0.07	1.00	0.89
QA male	0.42	0.91	0.90	0.21	0.89	1.00

P-values
2 days

	Ethanol female	Isopropyl female	QA female	Ethanol male	Isopropyl male	QA male
Ethanol female	0	0.563206614	1.888E-05	0.003384902	0.579874559	0.8354806
Isopropyl female	0.563206614	0	8.259E-07	1.62308E-06	0.000148501	3.3779E-06
QA female	1.88803E-05	8.25903E-07	0	6.0366E-06	8.92579E-08	0.000193
Ethanol male	0.003384902	1.62308E-06	6.0366E-06	0	0.000180086	2.7692E-05
Isopropyl male	0.579874559	0.000148501	8.9258E-08	0.000180086	0	5.4895E-05
QA male	0.835480603	3.37791E-06	0.000193	2.76918E-05	5.48952E-05	0

28 days

	Ethanol female	Isopropyl female	QA female	Ethanol male	Isopropyl male	QA male
Ethanol female	0	0.000127028	0.06428691	1.97506E-11	5.84085E-05	0.00024541
Isopropyl female	0.000127028	0	7.151E-06	6.47485E-06	3.00337E-07	3.507E-08
QA female	0.06428691	7.151E-06	0	0.039170721	3.74194E-05	5.8384E-05
Ethanol male	1.97506E-11	6.47485E-06	0.03917072	0	5.63649E-07	1.0095E-05
Isopropyl male	5.84085E-05	3.00337E-07	3.7419E-05	5.63649E-07	0	2.9081E-06
QA male	0.000245406	3.50697E-08	5.8384E-05	1.00953E-05	2.90808E-06	0

45 days

	Ethanol female	Isopropyl female	QA female	Ethanol male	Isopropyl male	QA male
Ethanol female	0	0.000424545	0.00046589	2.99982E-06	0.771367907	0.19577853
Isopropyl female	0.000424545	0	1.282E-05	0.000194989	0.005194189	0.00066432
QA female	0.00046589	1.28202E-05	0	0.00050415	0.005196754	0.00085351
Ethanol male	2.99982E-06	0.000194989	0.00050415	0	0.844925787	0.53915862
Isopropyl male	0.771367907	0.005194189	0.00519675	0.844925787	0	0.00023498
QA male	0.19577853	0.000664325	0.00085351	0.539158623	0.000234976	0

Confidence Intervals of r

2 days

	Ethanol female	Isopropyl female	QA female	Ethanol male	Isopropyl male	QA male
Ethanol female	1.000 to 1.000	-0.4576 to 0.7122	0.8114 to 0.9893	0.2482 to 0.8349	-0.7080 to 0.4642	-0.5523 to 0.6435
Isopropyl female	-0.4576 to 0.7122	1.000 to 1.000	0.9109 to 0.9952	0.8659 to 0.9911	0.6574 to 0.9745	0.8433 to 0.9894
QA female	0.8114 to 0.9893	0.9109 to 0.9952	1.000 to 1.000	0.8561 to 0.9920	0.9483 to 0.9973	0.6779 to 0.9804
Ethanol male	0.2482 to 0.8349	0.8659 to 0.9911	0.8561 to 0.9920	1.000 to 1.000	0.6440 to 0.9733	0.7566 to 0.9828
Isopropyl male	-0.7080 to 0.4642	0.6574 to 0.9745	0.9483 to 0.9973	0.6440 to 0.9733	1.000 to 1.000	0.7199 to 0.9798
QA male	-0.5523 to 0.6435	0.8433 to 0.9894	0.6779 to 0.9804	0.7566 to 0.9828	0.7199 to 0.9798	1.000 to 1.000

28 days

	Ethanol female	Isopropyl female	QA female	Ethanol male	Isopropyl male	QA male
Ethanol female	1.000 to 1.000	0.6680 to 0.9754	-0.03581 to 0.8540	0.8776 to 0.9787	0.7163 to 0.9795	0.6214 to 0.9712
Isopropyl female	0.6680 to 0.9754	1.000 to 1.000	0.8164 to 0.9874	0.8202 to 0.9877	0.9067 to 0.9939	0.9415 to 0.9962
QA female	-0.03581 to 0.8540	0.8164 to 0.9874	1.000 to 1.000	0.03978 to 0.8732	0.7410 to 0.9816	0.7163 to 0.9795
Ethanol male	0.8776 to 0.9787	0.8202 to 0.9877	0.03978 to 0.8732	1.000 to 1.000	0.8931 to 0.9930	0.8027 to 0.9864
Isopropyl male	0.7163 to 0.9795	0.9067 to 0.9939	0.7410 to 0.9816	0.8931 to 0.9930	1.000 to 1.000	0.8482 to 0.9898
QA male	0.6214 to 0.9712	0.9415 to 0.9962	0.7163 to 0.9795	0.8027 to 0.9864	0.8482 to 0.9898	1.000 to 1.000

45 days

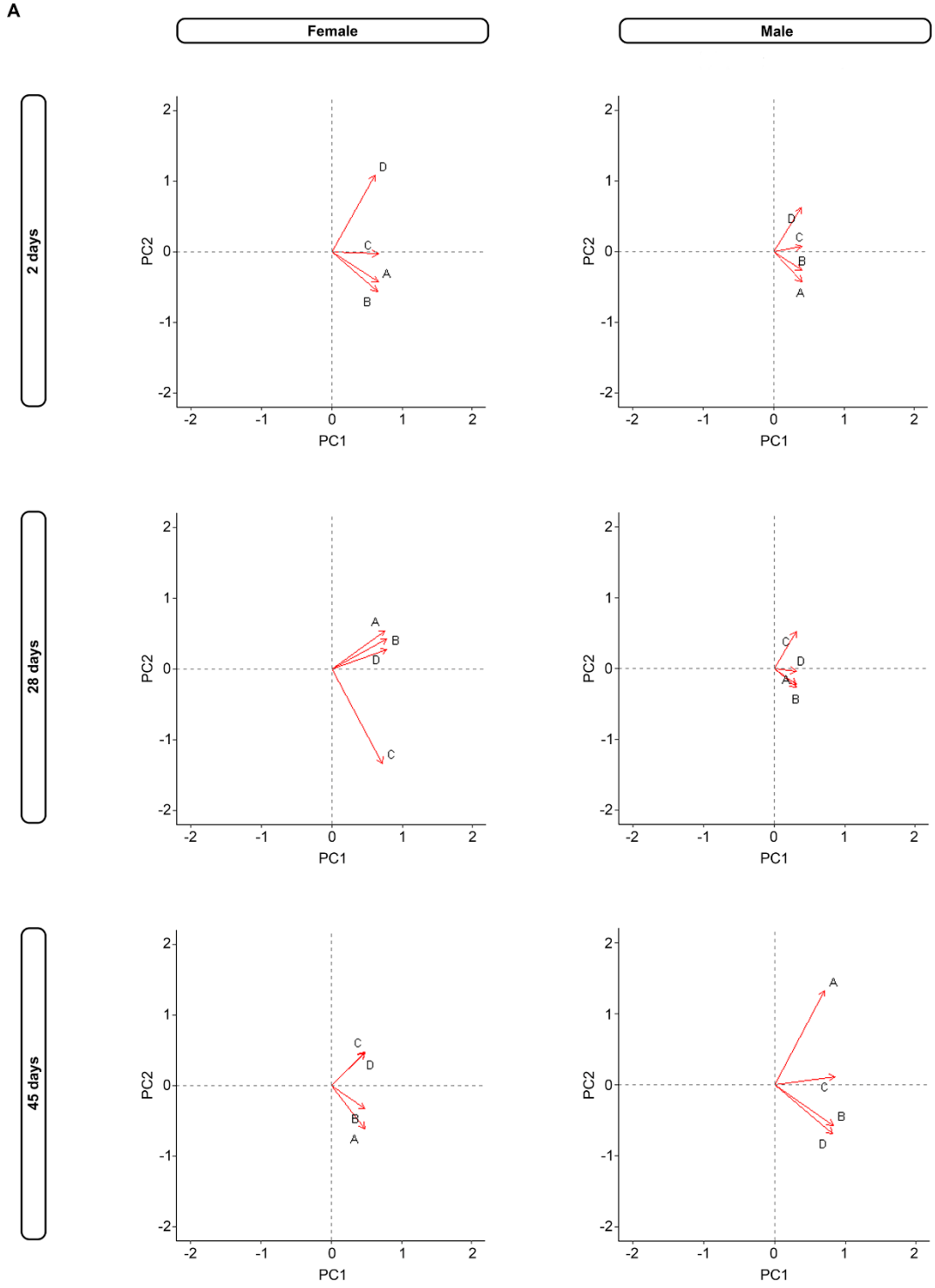
	Ethanol female	Isopropyl female	QA female	Ethanol male	Isopropyl male	QA male
Ethanol female	1.000 to 1.000	0.6610 to 0.9835	0.6529 to 0.9830	0.6749 to 0.9500	-0.5323 to 0.6599	-0.2379 to 0.8155
Isopropyl female	0.6610 to 0.9835	1.000 to 1.000	0.8654 to 0.9941	0.7222 to 0.9869	0.3808 to 0.9641	0.6207 to 0.9811
QA female	0.6529 to 0.9830	0.8654 to 0.9941	1.000 to 1.000	0.6460 to 0.9826	0.3808 to 0.9641	0.5964 to 0.9796
Ethanol male	0.6749 to 0.9500	0.7222 to 0.9869	0.6460 to 0.9826	1.000 to 1.000	-0.6411 to 0.5552	-0.4476 to 0.7183
Isopropyl male	-0.5323 to 0.6599	0.3808 to 0.9641	0.3808 to 0.9641	-0.6411 to 0.5552	1.000 to 1.000	0.6246 to 0.9715
QA male	-0.2379 to 0.8155	0.6207 to 0.9811	0.5964 to 0.9796	-0.4476 to 0.7183	0.6246 to 0.9715	1.000 to 1.000

Supplemental Table 2. Pearson's correlation coefficients and their respective p-values and confidence intervals for each interval (parameter variables vs. sex). "QA": quaternary ammonium.

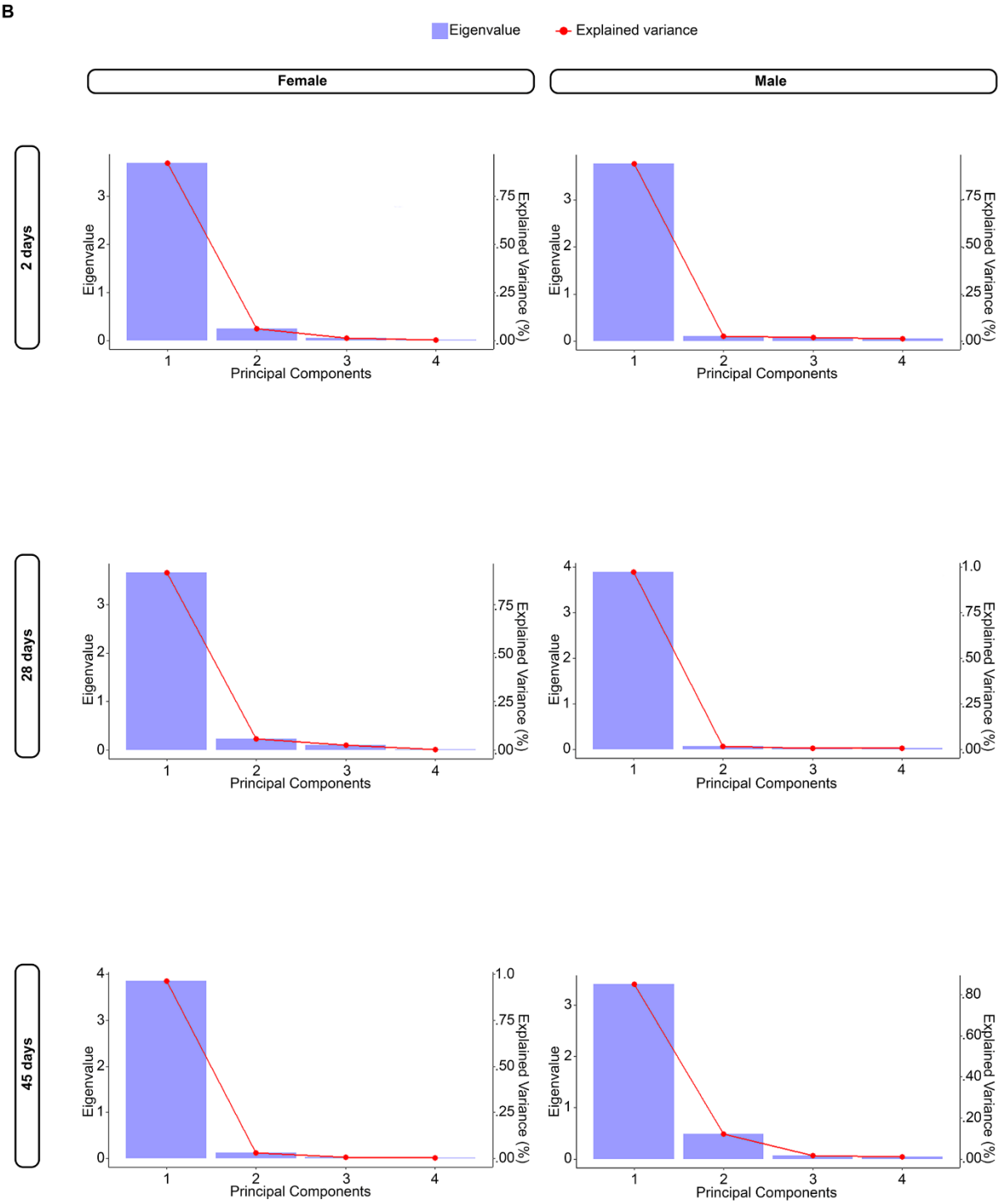
PCAs - Multivariate Analysis of context parameters and some of their variants

In order to reduce dimensionality of our data with minimal information loss and thus increase the interpretability of our results, we performed Principal Component Analysis (PCA) of our heatmap datasets. **Figure S-4** below shows the results for PCAs and Scree Plots: (A, B) for the four contexts A, B, C and D in the main experiment organized per sex and training-test interval time point, (C, D) for the 11 variables of the 5 selected parameters compared simultaneously, and (E.F) for the 5 parameters analyzed separately in terms of their variables and sex.

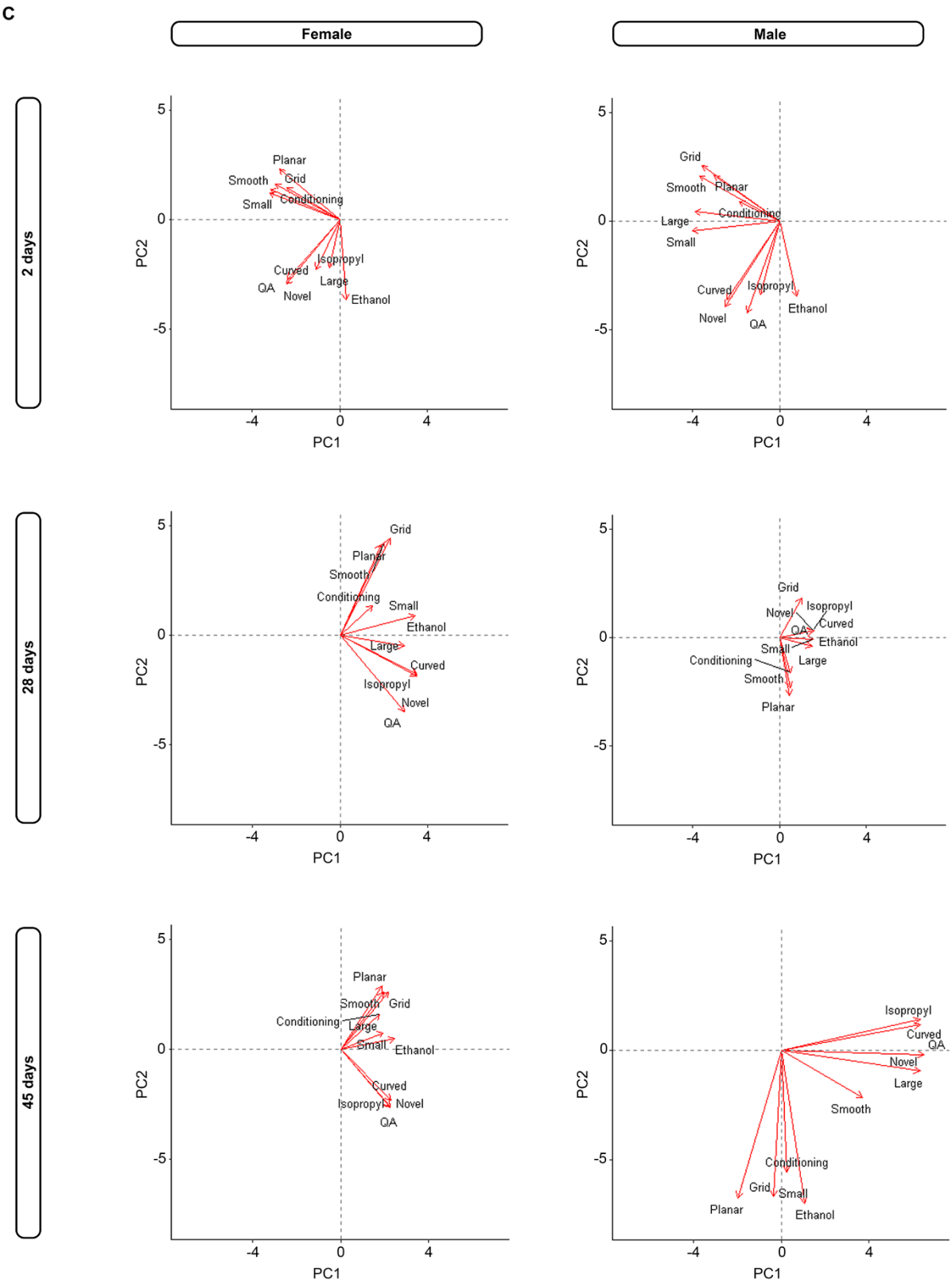
A



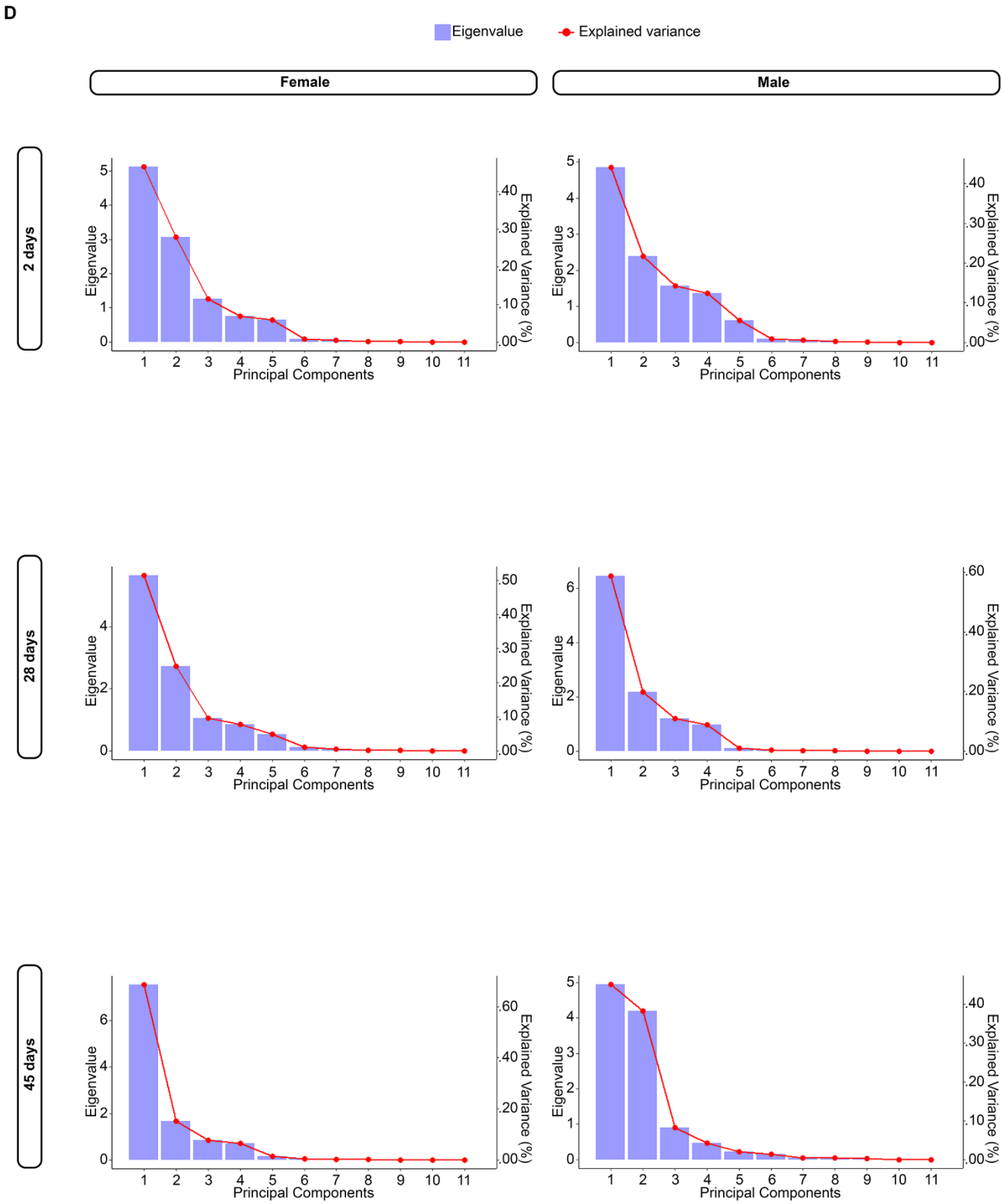
B


Eigenvalue
Explained variance
Female
Male
2 days
28 days
45 days
Eigenvalue
Explained Variance (%)
Principal Components

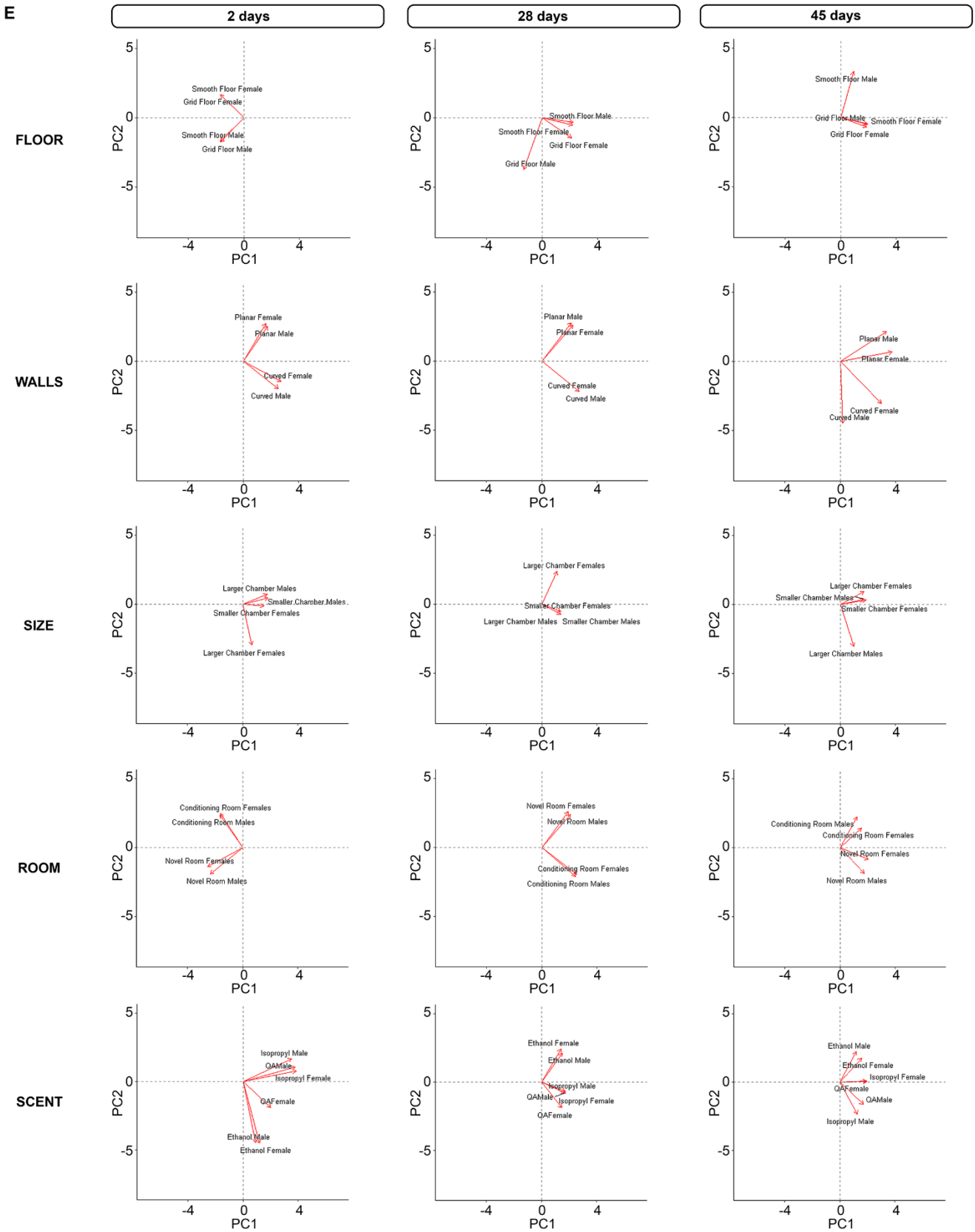
c

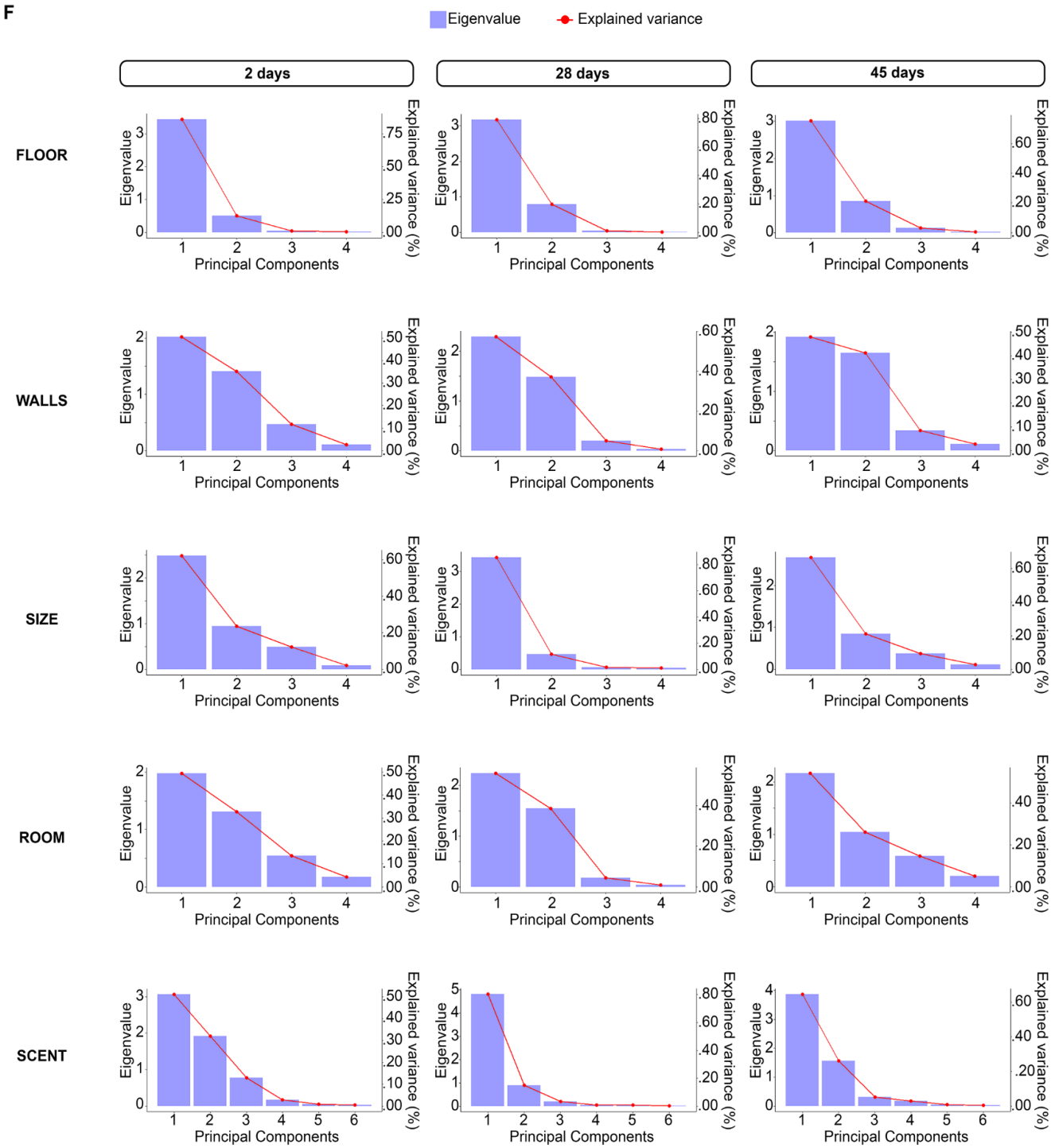

Female
Male
2 days
28 days
45 days
PC1
PC2
Planar
Grid
Smooth
Conditioning
Small
Ethanol
Large
Curved
Isopropyl
Novel
QA

D


Eigenvalue
Explained variance
Female
Male
2 days
28 days
45 days
Eigenvalue
Explained Variance (%)
Principal Components

E


2 days
28 days
45 days
FLOOR
WALLS
SIZE
ROOM
SCENT
PC1
PC2
Smooth Floor Female
Grid Floor Female
Smooth Floor Male
Grid Floor Male
Planar Female
Planar Male
Curved Female
Curved Male
Larger Chamber Males
Smaller Chamber Males
Smaller Chamber Females
Larger Chamber Females
Conditioning Room Females
Conditioning Room Males
Novel Room Females
Novel Room Males
Isopropyl Male
QAMale
Isopropyl Female
QAFemale
Ethanol Male
Ethanol Female



Supplemental Figure 4. Bidimensional Principal Component Analysis (PCA) loading and scree plots comparing different Main Experiment variables for different sexes and training-test intervals. **A:** Loading plots for the four contexts organized by sex and training-test interval. **B:** Scree plots showing explained variance (lines) and eigenvalues (bars) for the four contexts. **C:** Loading plots with parameter variables

(grid vs. smooth, curved vs. planar, larger vs. smaller, conditioning vs. novel, ethanol vs. isopropyl alcohol vs. quaternary ammonium) compared across sexes and different intervals. **D:** Scree plots showing explained variance (lines) and eigenvalues (bars) for the different variable groupings. **E:** Loading plots grouped by sex, comparing the different sensory modality parameters (Cleaning agent scent, Wall geometry, Test session room, Floor texture and Test chamber size) for each interval. **F:** Scree plots showing explained variance (lines) and eigenvalues (bars) for the different parameters grouped by sex. In all PCA plots the length of eigenvectors (arrows) indicates the magnitude of the loading for each modality. Inclination < 90° (positive loadings) indicates correlated variables, > 90° (negative loadings) indicates inversely correlated variables and = 90°, independent variables. Pooled contexts for each sensory modality are the same as in the heatmaps: Smooth floor (contexts B and C), Grid floor (contexts A and D), Curved walls (context B) and Planar walls (contexts A, C and D), Larger test chamber (contexts C and D) and Smaller test chamber (contexts A and B), Conditioning room (contexts A, B and D) and Novel room (context C), 70% ethanol (contexts A and B), 70% isopropyl (context D) and quaternary ammonium (context C). QA: quaternary ammonium.

PCA loading scores

2 days

Chamber Size				Wall Geometry				Cleaning Agent Scent						Floor Texture				Test Session Room			
PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
-1.018	0.792	0.364	-0.278	-3.124	3.032	-0.349	0.129	3.026	4.151	-1.968	-0.100	0.306	0.126	-0.303	-0.387	0.079	-0.355	2.522	2.217	0.142	-0.065
-0.703	0.797	0.197	-0.446	-2.616	2.749	-0.343	0.128	-3.714	1.610	-0.073	-0.009	-0.040	-0.285	-0.440	-0.366	0.086	-0.260	1.760	1.712	0.285	-0.434
-0.446	0.769	0.516	-0.411	-0.990	1.933	-0.157	0.284	-3.000	1.189	-0.351	0.106	-0.371	0.078	-0.926	-0.173	-0.016	-0.078	1.577	1.879	0.088	-0.464
-0.034	0.710	0.722	-0.220	-0.166	1.701	-0.007	0.249	-2.812	0.870	-0.207	0.118	-0.302	0.080	-1.254	-0.036	-0.030	-0.083	1.187	1.972	-0.102	-0.329
0.662	0.352	0.503	0.265	1.011	1.296	0.160	-0.357	-2.131	0.312	0.876	-0.068	0.177	0.356	-1.676	0.085	0.167	0.099	-0.137	1.524	-0.417	0.734
1.000	0.286	0.858	0.256	1.720	1.133	0.403	-0.369	-1.174	0.337	0.811	-0.120	0.468	-0.018	-1.980	0.282	0.098	0.049	-0.527	1.605	-0.662	0.712
1.874	0.573	0.353	0.238	2.188	1.019	0.268	-0.427	-0.656	0.383	0.721	-0.162	0.452	-0.374	-2.163	0.208	0.215	0.079	-1.744	0.823	-0.034	-0.543
2.080	0.254	0.336	0.235	2.392	0.955	0.267	-0.331	0.973	0.482	1.309	0.006	-0.061	0.445	-2.242	0.223	0.192	0.063	-2.614	0.418	-0.352	0.166
2.427	0.130	0.348	0.032	3.116	0.573	0.242	0.034	1.942	0.378	1.714	0.084	-0.071	-0.251	-2.451	0.255	0.089	0.102	-3.555	-0.073	-0.436	0.078
2.668	0.050	0.498	0.075	3.646	0.368	0.220	0.375	2.721	0.412	1.755	0.167	-0.159	0.032	-2.638	0.285	-0.002	0.066	-3.911	-0.095	-0.599	0.199
0.929	1.812	-2.522	0.325	1.720	-1.096	-2.455	1.078	2.220	1.008	-0.255	0.016	-0.551	-0.243	0.353	-2.899	-0.089	0.104	-1.758	-1.176	2.085	-1.375
-2.987	0.425	-0.144	0.023	-0.751	-1.177	-0.169	-0.195	-0.071	0.312	0.128	-0.061	-0.010	-0.001	3.201	0.135	0.244	-0.031	0.277	-0.430	0.570	0.268
-2.628	0.411	0.085	0.040	-0.644	-1.024	-0.333	-0.243	0.038	-0.149	-0.042	-0.139	-0.010	0.002	2.929	-0.072	0.016	0.080	0.147	-0.231	0.425	0.189
-2.205	0.459	0.093	0.387	-0.621	-0.984	-0.293	-0.223	0.134	-0.545	-0.184	-0.253	-0.014	0.005	2.859	-0.014	0.054	0.137	0.024	-0.047	0.443	0.173
-1.610	-0.130	0.184	0.324	-0.497	-0.778	-0.101	-0.125	0.191	-0.793	-0.286	-0.202	-0.006	0.005	2.287	0.406	0.172	0.182	-0.118	0.171	0.295	0.090
-1.066	-0.497	0.039	0.107	-0.459	-0.719	-0.106	-0.120	0.272	-1.104	-0.368	-0.548	-0.031	0.010	1.914	0.433	0.209	-0.022	-0.190	0.279	0.246	0.059
-0.766	-0.759	-0.032	0.099	-0.444	-0.698	-0.132	-0.128	0.282	-1.154	-0.394	-0.494	-0.026	0.010	1.736	0.461	0.160	-0.161	-0.239	0.353	0.233	0.045
-0.297	-1.593	-0.324	-0.076	-0.144	-0.251	-0.367	-0.172	0.393	-1.671	-0.641	-0.088	0.016	0.009	0.693	0.426	-0.361	-0.071	-0.261	0.386	0.247	0.046
-0.082	-1.749	-0.343	-0.121	-0.081	-0.150	-0.312	-0.140	0.438	-1.852	-0.701	-0.180	0.010	0.010	0.448	0.532	-0.320	-0.014	-0.300	0.446	0.217	0.027
0.283	-1.670	-0.493	-0.071	0.028	0.012	-0.420	-0.165	0.486	-2.040	-0.757	-0.335	0.000	0.012	0.130	0.346	-0.422	0.113	-0.354	0.525	0.262	0.035
0.646	-1.888	-0.458	0.013	-0.330	-0.591	-1.061	-0.484	0.200	-0.967	-0.492	1.024	0.101	-0.004	0.016	0.364	-0.483	-0.028	0.461	-0.731	1.672	0.721
1.275	0.467	-0.781	-0.797	-0.205	-0.408	-1.195	-0.518	0.242	-1.168	-0.594	1.237	0.122	-0.005	-0.493	-0.495	-0.056	0.029	0.402	-0.643	1.677	0.712
				-1.111	-1.691	0.413	-0.020											1.459	-2.184	-0.248	0.173
				-1.074	-1.638	0.371	-0.032											1.422	-2.130	-0.208	0.182
				-0.909	-1.362	0.633	0.102											1.218	-1.816	-0.521	0.025
				-0.730	-1.077	0.730	0.172											1.011	-1.502	-0.656	-0.064
				-0.532	-0.776	0.651	0.173											0.798	-1.184	-0.604	-0.083
				-0.266	-0.340	0.963	0.344											0.478	-0.694	-0.988	-0.288
				-0.133	-0.138	0.894	0.339											0.336	-0.482	-0.936	-0.295
				-0.091	-0.078	0.844	0.325											0.294	-0.420	-0.887	-0.284
				0.044	0.131	0.832	0.344											0.144	-0.196	-0.897	-0.315
				-0.196	-0.278	0.339	0.104											0.310	-0.452	-0.549	-0.152
				0.248	0.351	-0.429	-0.131											-0.119	0.174	0.211	0.059

28 days

Chamber Size				Wall Geometry				Cleaning Agent Scent						Floor Texture				Test Session Room			
PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
-3.485	0.306	-0.584	0.020	-2.964	3.099	0.301	0.011	-5.127	-0.288	0.033	0.321	-0.308	-0.192	0.870	2.021	0.084	0.009	-2.392	-2.429	-0.364	-0.265
-2.594	0.084	0.203	-0.557	-1.987	2.817	-0.003	-0.335	-4.025	0.201	0.104	-0.515	-0.103	-0.090	1.204	1.545	0.207	-0.204	-1.774	-2.318	-0.242	0.103
-1.657	-0.245	0.358	0.101	-0.920	2.126	-0.085	0.335	-2.963	0.765	0.133	0.037	0.163	0.111	1.402	1.133	0.227	0.001	-1.253	-2.246	-0.187	-0.022
-1.167	-0.333	0.285	-0.102	-0.140	1.700	-0.068	0.200	-2.135	0.649	-0.075	-0.123	0.080	0.247	1.494	0.869	0.146	-0.051	-0.717	-1.786	0.155	0.005
-0.710	-0.246	0.081	-0.082	0.412	1.514	0.108	0.252	-0.697	0.095	-0.464	-0.099	0.425	-0.118	1.430	0.338	0.042	0.083	-0.141	-1.182	0.185	-0.046
-0.182	-0.160	-0.077	0.111	0.994	1.093	0.132	0.129	0.228	-0.126	-0.402	0.140	0.544	-0.018	1.458	0.032	-0.077	0.137	0.434	-0.633	0.081	-0.124
0.518	-0.338	-0.623	-0.045	1.739	0.729	0.311	-0.233	1.239	-0.408	-0.782	0.194	-0.220	0.223	1.593	-0.035	-0.206	0.122	1.324	0.292	0.919	-0.254
0.770	-0.236	-0.438	-0.100	2.276	0.417	0.282	-0.548	1.662	-0.446	-0.594	0.029	-0.226	-0.028	1.766	-0.129	-0.251	0.103	1.559	0.451	0.655	-0.173
1.418	-0.476	-0.013	-0.381	3.118	0.039	0.079	-0.257	2.434	-0.071	-0.654	-0.418	-0.285	-0.054	1.969	-0.364	-0.145	-0.036	1.995	0.529	0.903	0.011
2.349	0.033	0.098	0.196	3.623	-0.248	0.045	0.062	3.649	-0.283	0.400	0.069	-0.074	-0.026	1.970	-0.633	-0.151	-0.040	2.942	1.388	-0.300	-0.038
2.525	0.080	0.208	0.098	4.117	-0.480	0.064	0.423	4.139	-0.396	0.353	-0.081	0.165	-0.134	2.021	-0.873	-0.137	0.041	3.121	1.519	-0.395	0.025
-2.186	2.299	0.058	0.135	-1.020	-1.246	0.465	0.016	-0.430	-2.795	1.100	-0.069	0.003	0.110	-3.214	0.800	-0.237	-0.030	1.013	1.470	-1.768	-0.129
-2.749	-0.426	0.279	-0.120	-0.861	-1.043	0.569	0.019	-0.926	-1.414	-0.381	-0.308	0.081	0.021	-2.934	0.669	-0.150	-0.049	0.104	-0.087	-0.012	-0.101
-1.663	-0.632	0.097	0.482	-0.818	-0.993	0.502	0.017	-0.426	-0.687	-0.219	0.338	-0.002	-0.038	-2.882	0.338	-0.214	0.058	0.341	-0.283	-0.035	-0.263
-1.239	-0.750	0.180	0.239	-0.764	-0.929	0.435	0.015	-0.261	-0.414	-0.126	0.119	0.006	-0.014	-2.535	0.182	-0.111	0.148	0.447	-0.365	-0.032	-0.152
-0.425	-0.818	-0.213	0.121	-0.632	-0.771	0.300	0.010	-0.058	-0.108	-0.048	0.240	-0.016	-0.024	-1.881	-0.200	0.177	-0.084	0.553	-0.450	-0.038	-0.164
0.469	-0.248	-0.298	0.018	-0.494	-0.607	0.138	0.005	0.149	0.216	0.048	0.190	-0.025	-0.017	-1.548	-0.431	0.106	-0.080	0.671	-0.543	-0.040	-0.111
0.939	-0.173	0.000	-0.043	-0.195	-0.222	0.430	0.015	0.382	0.591	0.168	0.011	-0.024	0.003	-0.979	-0.693	0.282	0.217	0.812	-0.654	-0.040	-0.004
1.484	0.032	0.216	0.036	-0.106	-0.115	0.343	0.012	0.623	0.968	0.277	-0.018	-0.036	0.008	-0.761	-0.819	0.303	0.052	0.949	-0.762	-0.043	0.047
1.879	0.181	0.261	-0.026	0.000	0.023	0.477	0.016	0.750	1.171	0.339	-0.086	-0.039	0.016	-0.536	-0.971	0.450	0.059	1.024	-0.821	-0.043	0.094
2.269	0.323	0.082	-0.161	0.347	0.429	-0.027	-0.001	0.808	1.262	0.367	-0.110	-0.040	0.019	-0.131	-1.322	-0.086	-0.136	1.058	-0.847	-0.043	0.113
2.735	0.247	-0.084	0.016	0.500	0.625	0.087	0.003	0.985	1.518	0.422	0.140	-0.071	-0.004	0.059	-1.418	-0.020	-0.247	1.140	-0.916	-0.052	0.048
0.702	1.496	-0.077	0.043	-0.500	-0.694	-1.562	-0.053							0.167	-0.038	-0.238	-0.076	-2.822	2.270	0.138	0.022
				-1.521	-1.883	0.135	0.004											-2.508	2.017	0.122	0.008
				-1.400	-1.740	-0.037	-0.001											-2.276	1.824	0.095	-0.208
				-1.309	-1.624	0.034	0.001											-1.999	1.603	0.085	-0.173

-1.061	-1.314	0.069	0.002
-0.669	-0.850	-0.400	-0.014
-0.478	-0.612	-0.399	-0.014
-0.281	-0.376	-0.583	-0.020
-0.087	-0.138	-0.637	-0.022
0.056	0.033	-0.772	-0.026
0.597	0.739	-0.065	-0.002
0.429	0.502	-0.669	-0.023

-1.226	0.987	0.060	0.006
-0.927	0.744	0.041	-0.051
-0.698	0.568	0.047	0.192
-0.526	0.434	0.051	0.361
-0.306	0.261	0.048	0.470
-0.092	0.086	0.031	0.379
0.169	-0.124	0.019	0.393

45 days

Chamber Size				Wall Geometry				Cleaning Agent Scent						Floor Texture				Test Session Room			
PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
-3.376	1.625	0.113	-0.281	-2.060	3.334	-0.460	0.313	-5.037	0.901	-0.811	0.500	-0.179	-0.004	-1.062	-0.101	0.262	-0.194	-3.965	1.604	-0.228	-0.501
-2.735	1.390	0.631	-0.427	-1.516	2.758	-0.151	0.711	-3.925	0.166	0.465	0.518	0.591	-0.048	-0.528	0.030	0.590	-0.061	-3.348	1.718	0.124	-0.175
-1.041	0.322	0.655	0.513	0.278	2.078	-0.411	-0.099	-2.297	0.433	0.860	-0.732	-0.153	-0.019	0.714	-0.328	0.103	0.023	-1.549	1.397	-0.249	1.139
-0.015	0.064	0.129	0.097	0.758	1.530	-0.376	-0.044	-0.205	0.454	-0.233	0.001	-0.355	0.276	1.078	-0.258	0.046	0.016	0.504	0.517	-0.026	0.006
0.741	0.112	0.361	0.303	1.893	0.768	-0.170	-0.551	0.515	0.843	-0.043	-0.124	-0.257	0.373	1.861	-0.365	0.041	-0.102	1.196	0.760	-0.039	-0.053
1.000	0.154	0.465	0.402	2.135	-0.088	-0.151	0.210	1.294	0.861	-0.194	0.112	-0.055	-0.321	2.154	-0.025	0.029	0.006	1.394	0.892	-0.059	-0.058
1.284	-0.206	0.502	0.274	2.379	-0.295	-0.018	0.079	1.811	0.673	-0.087	0.171	-0.278	-0.333	2.320	-0.034	0.105	-0.057	1.891	0.603	0.110	0.166
1.624	-0.231	0.366	0.101	2.576	-0.514	0.039	0.071	2.558	0.482	-0.208	0.410	-0.057	-0.152	2.467	-0.011	0.122	-0.077	2.556	0.360	0.213	-0.281
2.376	-0.015	0.089	0.220	3.432	-1.804	0.049	0.291	3.676	0.552	-0.488	0.437	0.469	0.267	3.099	0.229	-0.100	-0.151	3.634	0.272	0.068	-1.136
-2.468	-1.843	-0.438	-0.115	-2.380	-2.710	-0.599	0.087	-0.157	-3.029	-0.169	0.246	-0.168	0.013	-2.874	2.019	-0.323	-0.244	0.067	-1.786	0.244	0.696
-1.873	-2.355	-0.175	-0.184	-2.117	-3.320	-0.367	0.861	0.712	-3.631	0.749	0.046	0.008	0.008	-2.162	2.207	0.396	0.114	0.720	-1.962	0.479	1.321
-2.081	0.507	-0.142	0.710	-1.427	-0.541	0.306	-0.583	-0.594	-0.950	-0.810	-0.032	-0.009	-0.019	-3.106	-1.807	0.542	0.060	-0.198	-0.361	-0.342	-0.076
-0.811	0.143	-0.754	0.036	-0.613	-0.230	0.142	-0.248	-0.410	-0.678	-0.632	-0.116	0.017	-0.018	-2.041	-1.784	-0.134	-0.170	-0.023	-0.124	-0.341	-0.013
-0.195	0.223	-0.792	0.444	-0.457	-0.167	0.130	-0.181	-0.094	-0.284	-0.563	-0.563	0.141	-0.035	-1.523	-0.656	-0.209	-0.173	0.270	0.193	-0.640	0.088
0.708	0.577	-0.700	-0.208	-0.430	-0.157	0.120	-0.171	0.136	0.138	-0.076	-0.328	0.088	-0.015	-0.902	-0.271	-0.518	0.178	0.495	0.589	-0.304	0.173
0.978	0.600	-0.810	-0.204	-0.153	0.002	0.324	-0.010	0.219	0.243	-0.054	-0.441	0.119	-0.019	-0.683	-0.209	-0.550	0.224	0.572	0.673	-0.378	0.200
1.321	0.568	-0.929	-0.324	0.094	0.086	0.228	0.083	0.296	0.352	0.008	-0.491	0.134	-0.020	-0.268	-0.307	-0.542	0.179	0.644	0.767	-0.392	0.226
2.207	0.722	-0.577	-0.307	0.375	0.147	-0.054	0.158	0.697	0.964	0.457	-0.596	0.172	-0.014	0.367	-0.087	-0.528	0.016	1.026	1.306	-0.313	0.364
0.654	-0.115	0.851	-0.314	-0.679	0.038	1.581	-0.016	0.310	0.582	0.704	0.378	-0.087	0.031	0.149	0.146	0.128	0.070	-0.539	-0.064	2.465	-0.157
1.065	-0.251	1.349	-0.508	-0.308	0.266	1.929	0.213	0.494	0.927	1.122	0.603	-0.139	0.049	0.517	0.092	0.611	0.304	-0.339	0.281	2.737	-0.081
0.236	-0.740	-0.072	-0.085	-1.731	-0.705	0.133	-0.750							0.137	0.490	-0.023	0.013	-1.782	-2.406	0.040	-0.640
0.399	-1.250	-0.122	-0.143	-0.671	-0.297	-0.064	-0.312							0.288	1.030	-0.049	0.027	-0.943	-1.294	-0.059	-0.340
				-0.561	-0.259	-0.107	-0.270											-0.857	-1.187	-0.096	-0.309
				-0.145	-0.182	-0.587	-0.171											-0.543	-0.902	-0.610	-0.204
				-0.008	-0.139	-0.661	-0.124											-0.437	-0.777	-0.680	-0.167
				0.220	-0.058	-0.735	-0.035											-0.258	-0.550	-0.739	-0.104
				0.411	-0.001	-0.851	0.029											-0.110	-0.379	-0.852	-0.052
				-0.065	-0.042	-0.072	-0.042											-0.223	-0.405	-0.378	-0.086
				0.056	0.036	0.062	0.036											-0.121	-0.220	-0.206	-0.047
				0.214	0.139	0.236	0.138											0.012	0.021	0.020	0.004
				0.502	0.326	0.554	0.325											0.254	0.462	0.431	0.098

Explained Variance

2 days

Chamber Size				Wall Geometry				Cleaning Agent Scent						Floor Texture				Test Session Room			
PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
1.575	0.972	0.699	0.292	1.420	1.187	0.686	0.324	1.748	1.384	0.881	0.409	0.233	0.182	1.853	0.710	0.214	0.131	1.406	1.144	0.737	0.413
0.620	0.236	0.122	0.021	0.504	0.352	0.118	0.026	0.509	0.319	0.129	0.028	0.009	0.006	0.858	0.126	0.011	0.004	0.494	0.327	0.136	0.043
0.620	0.856	0.979	1.000	0.504	0.856	0.974	1.000	0.509	0.828	0.957	0.985	0.994	1.000	0.858	0.984	0.996	1.000	0.494	0.821	0.957	1.000

28 days

Chamber Size				Wall Geometry				Cleaning Agent Scent						Floor Texture				Test Session Room			
PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
1.847	0.687	0.272	0.205	1.513	1.219	0.445	0.170	2.194	0.947	0.439	0.218	0.201	0.102	1.778	0.886	0.204	0.113	1.495	1.243	0.427	0.189
0.853	0.118	0.019	0.011	0.572	0.371	0.049	0.007	0.802	0.149	0.032	0.008	0.007	0.002	0.790	0.196	0.010	0.003	0.559	0.387	0.046	0.009
0.853	0.971	0.990	1.000	0.572	0.943	0.993	1.000	0.802	0.952	0.984	0.992	0.998	1.000	0.790	0.986	0.997	1.000	0.559	0.946	0.991	1.000

45 days

Chamber Size				Wall Geometry				Cleaning Agent Scent						Floor Texture				Test Session Room			
PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
1.632	0.921	0.615	0.334	1.383	1.282	0.579	0.329	1.966	1.253	0.559	0.415	0.235	0.168	1.735	0.919	0.353	0.144	1.470	1.021	0.768	0.456
0.666	0.212	0.095	0.028	0.478	0.411	0.084	0.027	0.644	0.261	0.052	0.029	0.009	0.005	0.752	0.211	0.031	0.005	0.540	0.260	0.147	0.052
0.666	0.878	0.972	1.000	0.478	0.889	0.973	1.000	0.644	0.905	0.957	0.986	0.995	1.000	0.752	0.964	0.995	1.000	0.540	0.801	0.948	1.000

Eigenvalues

2 days					
PC	**Chamber Size**	**Wall Geometry**	**Cleaning Agent Scent**	**Floor Texture**	**Test Session Room**
PC1	2.481	2.016	3.055	3.433	1.977
PC2	0.944	1.409	1.914	0.504	1.309
PC3	0.489	0.470	0.775	0.046	0.544
PC4	0.085	0.105	0.168	0.017	0.170
PC5			0.054		
PC6			0.033		
28 days					
PC	**Chamber Size**	**Wall Geometry**	**Cleaning Agent Scent**	**Floor Texture**	**Test Session Room**
PC1	3.412	2.288	4.813	3.161	2.236
PC2	0.472	1.485	0.896	0.784	1.546
PC3	0.074	0.198	0.193	0.042	0.182
PC4	0.042	0.029	0.048	0.013	0.036
PC5			0.040		
PC6			0.010		
45 days					
PC	**Chamber Size**	**Wall Geometry**	**Cleaning Agent Scent**	**Floor Texture**	**Test Session Room**
PC1	2.663	1.913	3.864	3.009	2.162
PC2	0.848	1.643	1.569	0.845	1.041
PC3	0.378	0.336	0.312	0.125	0.589
PC4	0.111	0.109	0.172	0.021	0.208
PC5			0.055		
PC6			0.028		

Supplemental Table 3. Tables **describing** PCA loading scores, Explained Variances and Eigenvalues for each interval (parameter variables vs. sex). “QA”: quaternary ammonium.

Interpreting the multivariate analysis

- As shown in the **Heatmaps** in **Figure S-3 A**, strong positive correlations dominate when comparing the four selected contexts, providing no useful information to interpret the relative weights of the parameters. In **Figure S3-B**, however, varying all 11 variants of the 5 parameters at once, show a few differences between females and males at 2 and 28 days, but a noticeable change at 45 days in the correlation matrices, especially in males, compared to females. **Figure S-3 C shows** a few negative correlations on the reactions between grid vs. smooth FLOOR textures at 28 days, and WALL geometry at 45 days.

- **Figure 4-S A** shows the PCA (Loadings) plot for the four contexts, organized by sex (columns) and time (rows). PC2 appears to be more representative of these variations, while projections along PC1 are only on the positive side. At 2 days, contexts A, B, and C are clustered and orthogonal to D for both sexes, indicating a positive correlation among them and independence from the response to D. At 28 days, context C is independent, uncorrelated with the other three, for both sexes. A distinct pattern emerges only at 45 days, when females show a high correlation between contexts CD and AB, while males show high correlation only between B and D.

- In **Figure 4-S B**, 11 variables corresponding to five behavioral parameters were analyzed in blocks, revealing several sex-specific patterns: in females, at 2 days, four variables associated with the conditioning/training context A (excluding SCENT) clustered together (positively correlated) in the upper left quadrant and were orthogonal, i.e., statistically independent, from the novel context variables, which is to be expected. The exception was the non-training context variable “smooth” – wherein males do not discriminate between grid and smooth FLOORS at 2 days and females failed to discriminate at any timepoint. For females, the clustering of context A variables dispersed at 28 days and partially regrouped at 45 days, now in the upper right quadrant. In males, a similar clustering was observed at 2 days, although with evident confounding between FLOOR and SIZE variables. Unlike females, however, variables are dispersed for males at 28 days – with a negative correlation between grid and smooth FLOOR, and recluster at 45 days with the context A variables now predominantly distributed

within the negative PC2 quadrants. Initially, in these plots the three distinct SCENTs are clustered together, positively correlated, however in more remote memory ethanol became orthogonal to the other odors, an independency that suggests that both sexes continue to associate this odor with the original aversive experience up to 45 days later.

- In **Figure S-4 C**, we analyzed the variables separated by parameter to identify sex-specific and time-dependent patterns:
  - In relation to FLOOR, sexes responded independently (orthogonally) at 2 days, with neither group clearly distinguishing between textures. At later timepoints, males tend to cluster with females, although consistently maintaining independent behavior for one variable - grid FLOOR at 28 days, and smooth FLOOR at 45 days. Females, on the other hand, do not distinguish FLOOR textures well at any timepoint.;
  - both sexes respond similarly to planar or curved WALLs up to 28 days, although these two variables are orthogonal, i.e., vary independently. This pattern is disrupted at 45 days, when males tend to distinguish planar from curved WALLs (vectors forming obtuse angles), whereas females tend to cluster these variables, responding similarly to both geometries;
  - In relation to chamber SIZE, subjects responded to the larger ones independently at all times. Specifically, females exhibited independent responses at 2 and 28 days, and males at 45 days.
  - similarly to what was observed with WALLs, subjects responded the same way for each ROOM, independent of

sex, with the conditioning ROOM and novel ROOM orthogonal to each other at 2 and 28 days (the only difference being the quadrant of these vectors). At 45 days, however, this pattern is disrupted, with males distinguishing ROOMs well (vectors forming obtuse angles), whereas females tend to cluster these variables, possibly confounding them;

- The most notable aspect in the analysis of these three distinct SCENTs is that males and females clustered similarly to ethanol – odor associated with the training context - while maintaining independency (orthogonality) from the other typically clustered odors, at least at 2 and 28 days. At 45 days, there is a subtle tendency of females to respond distinctly to quaternary ammonium, and the influence of ethanol tends to diminish at 45 days.

12. Apêndice II (Capítulo II)

12.1 Avaliação da dependência hipocampal em ratos machos e fêmeas gonadectomizados com reposição hormonal

Ratos machos e fêmeas gonadectomizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas no CA1 do hipocampo dorsal (dHPC). Os animais foram treinados no contexto A e testados no mesmo contexto dois dias depois (memória recente). Na véspera do teste, receberam administração subcutânea de propionato de testosterona (machos), benzoato de estradiol (fêmeas) ou veículo. Quinze minutos antes do teste, receberam infusão intracerebral do agonista GABAérgico muscimol ou veículo (PBS). Três a quatro horas após, os animais foram novamente testados no mesmo contexto, sem a ação do fármaco.

EMBARGO

EMBARGO

12.2 Machos OCX: Curva Dose Resposta (2 dias)

Ratos machos orquiectomizados foram treinados no contexto A e testados no contexto A ou em um contexto novo (B) dois dias depois. Na véspera do teste, os animais receberam injeção subcutânea de veículo (óleo de girassol, 0,1 mL) ou diferentes doses de propionato de testosterona (0,5 mg, 2 mg ou 4 mg). Os ratos testados no contexto A receberam apenas veículo.

EMBARGO

EMBARGO

12.3 Machos OCX: Campo Aberto (2 dias)

Ratos machos orquiectomizados receberam uma injeção aguda de veículo (óleo de girassol, 0,1 mL; s.c.) ou de propionato de testosterona (0,5 mg ou 4 mg; s.c.) e, no dia seguinte, foram testados no Campo Aberto por 5 minutos.

EMBARGO

13. Apêndice III (Capítulo III)

13.1 Avaliação da dinâmica temporal da consolidação sistêmica em fêmeas não-gonadectomizadas

Ratas fêmeas não-gonadectomizadas foram submetidas à cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas no CA1 do dHPC ou no córtex cingulado anterior (ACC). Todos os animais foram treinados no contexto A e testados no mesmo contexto dois dias (memória recente) ou 28 dias (memória remota) depois. Quinze minutos antes do teste, receberam infusão intracerebral de muscimol ou veículo (PBS) na região de interesse. Três a quatro horas após, os animais foram novamente testados no mesmo contexto, sem a infusão do fármaco.

13.1.1 Hipocampo dorsal

EMBARGO

13.1.2 Córtex Cingulado Anterior

EMBARGO

14. Considerações finais

O Rei e os Elefantes

Um rei indiano ordenou que todos os cegos se reunissem e, quando chegaram, ordenou que todos os elefantes lhes fossem mostrados. Os cegos foram ao estábulo e começaram a apalpar os elefantes. Um apalpou uma pata, outro um rabo, um terceiro o toco de um rabo, um quarto a barriga, um quinto as costas, um sexto as orelhas, um sétimo as presas e um oitavo a tromba.

Então o rei chamou os cegos e perguntou-lhes: "Como são os meus elefantes?" Um cego disse: "Seus elefantes são como postes." Ele havia apalpado as pernas. Outro cego disse: "São como vassouras de banho." Ele havia apalpado a ponta do rabo. Um terceiro disse: "São como galhos." Ele havia apalpado o toco da cauda. Aquele que havia tocado na barriga disse: "Os elefantes são como um torrão de terra." Aquele que havia tocado nas laterais disse: "São como uma parede." Aquele que havia tocado nas costas disse: "São como um monte." Aquele que havia tocado nas orelhas disse: "Elas são como um pilão." Aquele que tocou nas presas disse: "São como chifres." Aquele que tocou no tronco disse que eles eram como uma corda resistente. E todos os cegos começaram a discutir e a brigar.

- Leo Tolstoy

Essa parábola indiana levanta questões profundamente relevantes ao nos lembrar de que, em uma ciência tão complexa, algum grau de reducionismo é inevitável. No entanto, esse olhar necessariamente restrito pode limitar a compreensão mais ampla dos fenômenos que buscamos entender. Vinda das ciências biológicas, onde pode-se dizer que a única regra é a variabilidade, eu já tinha uma boa noção de que a vida é bem complexa. Durante o mestrado e o doutorado em Neurociências, essa noção só foi se confirmando e, muitas vezes, me vi mergulhada nos detalhes, tentando entender os vários porquês dos fenômenos que observava.

Hoje compreendo melhor o que Sócrates quis dizer ao afirmar que a verdadeira sabedoria consiste em saber que nada se sabe. Costumo brincar que, a cada experimento realizado — bem-sucedido ou não — surgia um novo fio branco na minha cabeça, cada um representando uma pequena porção da sabedoria adquirida nesse processo longo e, por vezes, doloroso. Agora, chegando ao fim desta etapa, percebo que tenho muito mais perguntas do que respostas sobre o tema desta tese.

Se houvesse receita para terminar um doutorado, seria menos uma lista de passos e mais uma poção alquímica: uma boa dose de energia e de apoio das pessoas queridas; finais de semana, feriados e noites em claro dissolvidos na mistura; uma caneca de suor, outra de lágrimas, e uma colher de chá de sangue (a ciência demanda seus tributos). Uma pitada de desespero para lembrar que somos humanos, e outra de boas risadas para lembrar que somos resilientes. Um punhado de abas abertas no Chrome, com artigos “para ler quando der tempo”. Por fim, humor a gosto — porque sem isso nada cresce nem se sustenta.

O caminho desde o início da minha trajetória científica até aqui também foi longo. Tudo começou em 2014 quando recebi um e-mail do professor Jorge enviado à turma de ex-alunos da disciplina de Biofísica, perguntando se alguém teria interesse em realizar a iniciação científica no laboratório. Respondi, movida pela curiosidade, pensando que poderia ser algo interessante. Pouco mais de dois anos depois, o professor trouxe alguns artigos “vintage” dele para conversarmos sobre um possível projeto de mestrado. E, finalmente, já no doutorado, dei continuidade de certa forma ao trabalho iniciado ainda no TCC. Como diria minha mãe, muita água passou por debaixo dessa ponte...e fui vendo muitos fios brancos surgirem na minha cabeça.

Há quem diga que fazer um doutorado em ciências é fácil. Sempre penso que, para acreditar nisso, a pessoa deve ter contado com uma sorte rara — ou simplesmente não viveu essa experiência por completo. Entrar no doutorado é, na essência, abandonar a zona de conforto e encarar uma sucessão de testes à nossa persistência, enquanto prazos (especialmente o temido fim da bolsa) se aproximam sem piedade, e os atrasos inevitavelmente se acumulam.

O meu início como doutoranda coincidiu com o auge da pandemia de covid-19, o que tornou quase impossível acessar o laboratório e começar os experimentos-piloto, testando diferentes configurações contextuais. Na época, eu realmente acreditei que seria algo rápido, uns quatros meses, talvez. Depois de mais de um ano nessa etapa, finalmente pude iniciar os experimentos principais. Nesse meio tempo, ganhei uma coleção respeitável de fios brancos...quem dera os momentos de ingenuidade (como achar que seria fácil) produzissem o efeito contrário.

O doutorado-sanduíche em Houston foi, também, uma experiência de vida. Além da oportunidade de aprender participando das atividades de um laboratório de alta qualidade, aprendi muito sobre mim mesma. Descobri, por exemplo, que minha memória espacial não era tão boa quanto eu imaginava — navegar pelos corredores da UTHealth é quase um labirinto mitológico. E vivi fatos surpreendentes, como perceber que sim, eu consigo suportar o calor úmido e abafante de Houston e viver para contar a história.

Por fim, cheguei ao último requisito: escrever e defender a tese diante de uma banca de pesquisadores da área. E, mais uma vez, caí na velha armadilha do otimismo. Achava sinceramente que a escrita seria rápida — “duas semanas no máximo”, eu dizia, convicta, para mim mesma e para a minha mãe. Pois bem… várias semanas depois (e com a cabeça mais grisalha ainda para provar), finalmente entrego a tese ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência da UFRGS.

Talvez, no fim das contas, seja isso mesmo: para atravessar um doutorado, um pouco de ingenuidade não faz mal. Nos acompanha até o fim e, com sorte, nos ensina a sair mais sábios do que entramos.

15. Anexo I

Artigo científico publicado em 2022 na revista *Behavioral Neuroscience, 136(2), 172–181*: “**Adolescent female rats undergo full systems consolidation of an aversive memory, while males of the same age fail to discriminate contexts”.**

Behavioral Neuroscience

Adolescent Female Rats Undergo Full Systems Consolidation of an Aversive Memory, While Males of the Same Age Fail to Discriminate Contexts

Ana P. Crestani, Fernanda N. Lotz, Mirelle A. Casagrande, Bruno Popik, Kétlyn T. K. Guerra, Lucas de Oliveira Alvares, and Jorge A. Quillfeldt

Online First Publication, January 13, 2022. http://dx.doi.org/10.1037/bne0000501

CITATION

Crestani, A. P., Lotz, F. N., Casagrande, M. A., Popik, B., Guerra, K. T. K., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2022, January 13). Adolescent Female Rats Undergo Full Systems Consolidation of an Aversive Memory, While Males of the Same Age Fail to Discriminate Contexts. *Behavioral Neuroscience*. Advance online publication. http://dx.doi.org/10.1037/bne0000501