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

Giuliana Petiz Zugno

MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS RECENTES E REMOTAS MEDIADAS PELO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO: EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA OU SIMPLES INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO MEDO?

Porto Alegre
2026

Giuliana Petiz Zugno

MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS RECENTES E REMOTAS MEDIADAS PELO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO: EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA OU SIMPLES INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO MEDO?

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

Orientador(a): Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Porto Alegre

2026

CIP - Catalogação na Publicação

Zugno, Giuliana Petiz
Memórias aversivas contextuais recentes e remotas mediadas pelo córtex pré-límbico: evocação da memória ou simples inibição da expressão do medo? / Giuliana Petiz Zugno. -- 2026.
136 f.
Orientador: Jorge Alberto Quillfeldt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Córtex pré-límbico. 2. Memória. 3. Consolidação sistêmica. 4. Condicionamento aversivo ao contexto. I. Quillfeldt, Jorge Alberto, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Giuliana Petiz Zugno

MEMÓRIAS AVERSIVAS CONTEXTUAIS RECENTES E REMOTAS MEDIADAS PELO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO: EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA OU SIMPLES INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO MEDO?

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Aprovado em: 27 de julho de 2026

BANCA EXAMINADORA

Ana Paula Crestani – USP

Leandro José Bertoglio – UFSC

Denise Maria Zancan – UFRGS (relatora)

Jorge Alberto Quillfeldt – UFRGS (orientador)

Dedico este trabalho à minha dinda Neca, meu porto seguro e testemunha mais próxima de toda esta jornada.

Agradecimentos

Agradeço à minha família por todo apoio, em especial aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me incentivando nessa caminhada, e ao meu irmão pela parceria. Também devo muito a minha dinda, que me acompanhou de pertinho durante o mestrado. Desde o início ela me acolheu com o coração aberto em sua casa e ouviu, com interesse genuíno, cada relato das minhas aventuras no laboratório, histórias que ganhavam vida em sua escuta atenta.

Ao professor Jorge Quillfeldt, meu orientador, pela acolhida desde os primeiros dias e por sua profunda humanidade, que sempre guiou com saber e sensibilidade. Sou profundamente grata por ter integrado o Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC), onde não só aprendi, mas cultivei amizades que levo comigo. À Fernanda Lotz, pela paciência e ensinamentos que foram farol nas técnicas de laboratório. À Kétlyn Guerra, pelo incentivo a não temer tentar. Aos alunos de iniciação científica do LPBNC, que acreditaram em mim e tornaram o caminho uma troca.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia da Memória, nosso laboratório irmão, e ao Laboratório de Neurobiologia do Estresse pela parceria constante. Um agradecimento especial à professora Carla Dalmaz que, além do professor Jorge, foi fonte de inspiração em minha jornada pelo estudo da memória, e aos seus alunos, pela ajuda fundamental com os *western blot*. Aos professores da pós-graduação, pelo esforço em transformar cada disciplina em algo singular. Em especial à professora Denise Zancan e ao professor Jorge, que me guiaram no estágio didático e me deram a oportunidade de descobrir a sala de aula.

Ao Centro de Reprodução Animal (CREAL) e à técnica Tina, pelo cuidado meticuloso e comprometido com os animais, essenciais para este trabalho. À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por oferecer um curso de excelência e um espaço de transformação. Aos colegas e funcionários que me acompanharam e auxiliaram nessa jornada. Por fim, à CAPES, pela concessão da bolsa e pelo fomento à pesquisa, que tornaram esta caminhada possível.

Cada um de vocês plantou uma semente neste percurso. Esta conquista é fruto do solo que, juntos, ajudamos a nutrir.

O acervo de nossas memórias faz cada um de nós ser o que é:
um indivíduo, um ser para o qual não existe outro idêntico.
Ivan Izquierdo

RESUMO

A consolidação sistêmica da memória é um processo dinâmico caracterizado pela reorganização gradual dos traços mnésicos, que passam de uma dependência inicial do hipocampo para uma representação mais distribuída em redes neocorticais. O córtex pré-frontal medial (mPFC), especialmente o córtex pré-límbico (PLC), participa da modulação de memórias aversivas, e nossos achados sugerem que seu papel não é totalmente consistente com a teoria *sandard* de consolidação sistêmica. Neste estudo, investigamos se a integridade do PLC é necessária para a evocação de memórias de medo recentes (2 dias) ou remotas (28 e 45 dias), bem como para a generalização dependente do tempo. Para isso, ratos *Wistar* machos adultos foram submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto (CFC) e receberam infusão bilateral de muscimol ou veículo no PLC antes do teste, onde foram reexpostos ao contexto condicionado ou a um contexto novo. Aos 2 dias, os animais apresentaram discriminação entre contextos, e a inibição do PLC reduziu a resposta de *freezing* no contexto condicionado. Nos períodos remotos, observou-se generalização completa da memória, mas a inibição do PLC não alterou o comportamento, sugerindo que essa estrutura não é necessária para a evocação após 28 e 45 dias. Esses resultados indicam que PLC desempenha um papel distinto na consolidação sistêmica da memória de medo contextual, apresentando um perfil funcional mais semelhante ao do hipocampo do que ao do córtex cingulado anterior (ACC), sua região vizinha. Como o PLC integra circuitos envolvidos na expressão do medo, esse efeito pode refletir uma redução da resposta comportamental associada a emoção negativa, e não um prejuízo na evocação da memória. Para testar essa hipótese, utilizou-se o teste não aversivo de localização de objetos (OL), em que os animais foram testados 24 horas após o treino, com ou sem inibição do PLC. Ambos os grupos exploraram mais o objeto deslocado, indicando evocação intacta da memória. Assim, a ausência de efeito do muscimol tanto na evocação da memória espacial quanto na memória remota de medo condicionado sugere fortemente que o efeito observado no teste recente de CFC pode ser melhor explicado apenas pela inibição da expressão do medo e não por um déficit de evocação. Ainda assim, hipotetizou-se que, devido à reorganização das redes corticais e à maior consolidação do engrama ao longo do tempo, o ACC pudesse compensar a inibição do PLC durante a evocação remota. No entanto, a análise por *western blot* das proteínas c-Fos e ARC, codificadas por genes de expressão imediata, não forneceu evidências de recrutamento compensatório, embora tenha sugerido um perfil de expressão proteica de c-Fos distinto entre o ACC e o PLC. Em conjunto, esses achados contrariam a teoria *standard* da consolidação sistêmica e reforçam a existência de uma organização funcional heterogênea das regiões envolvidas nesse processo, destacando o PLC como uma estrutura funcionalmente especializada dentro do circuito pré-frontal medial, com contribuições diferenciadas para a memória recente e remota.

Palavras chaves: Córtex pré-límbico. Consolidação sistêmica. Condicionamento aversivo ao contexto.

ABSTRACT

Systemic consolidation is a dynamic process characterized by the gradual reorganization of memory traces, which shift from an initial dependence on the hippocampus to a more distributed representation within neocortical networks. The medial prefrontal cortex (mPFC), particularly the prelimbic cortex (PLC), is involved in modulating aversive memories, and our findings suggest that its role is not fully consistent with the standard model of systemic consolidation. In this study, we investigated whether the integrity of the PLC is necessary for the retrieval of recent (2 days) or remote (28 and 45 days) fear memories, as well as for time-dependent generalization. To this end, adult male Wistar rats underwent contextual fear conditioning (CFC) and received bilateral infusions of muscimol or vehicle into the PLC prior to testing, during which they were re-exposed to either the conditioned context or a novel context. At 2 days, animals showed discrimination between contexts, and PLC inhibition reduced freezing behavior in the conditioned context. At remote time points, complete memory generalization was observed; however, PLC inhibition no longer affected behavior, suggesting that this structure is not required for memory retrieval after 28 and 45 days. These findings indicate that the PLC plays a distinct role in systems consolidation of contextual fear memory, exhibiting a functional profile more similar to that of the hippocampus than to that of the neighboring anterior cingulate cortex (ACC). Because the PLC is part of neural circuits involved in fear expression, this effect may reflect a reduction in the behavioral response associated with negative emotional states rather than an impairment in memory retrieval itself. To test this hypothesis, we employed the non-aversive object location (OL) task, in which animals were tested 24 hours after training with or without PLC inhibition. Both groups preferentially explored the displaced object, indicating intact memory retrieval. Thus, the absence of muscimol effects on both spatial memory retrieval and remote fear memory strongly suggests that the impairment observed in recent CFC testing is better explained by reduced fear expression than by a retrieval deficit. We further hypothesized that, due to cortical network reorganization and greater engram consolidation over time, the ACC might compensate for PLC inhibition during remote retrieval. However, western blot analysis of c-Fos and ARC, proteins encoded by immediate-early genes, revealed no evidence of such compensatory recruitment, although they suggested distinct c-Fos protein expression profiles between the ACC and PLC. Together, these findings cannot be readily reconciled with the standard model of systems consolidation and support the existence of a functionally heterogeneous organization among brain regions involved in this process, highlighting the PLC as a specialized component of the medial prefrontal circuit with distinct contributions to recent and remote memory.

Keywords: Prelimbic cortex. Systemic consolidation. Contextual fear conditioning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aquisição, consolidação e transformação da memória 23
Figura 2 – Por meio da ativação de vias de sinalização dependentes de Ca^{2+}, a estimulação sináptica induz a expressão de c-Fos e ARC 25
Figura 3 – Organização hierárquica das conexões com a formação hipocampal 30
Figura 4 – Teoria standard da consolidação sistêmica 31
Figura 5 – Teoria dos Múltiplos Traços 32
Figura 6 – Discriminação x generalização em diferentes contextos ao longo do tempo 35
Figura 7 – Teoria do Índice e evocação de sequências episódicas 36
Figura 8 – Molécula de muscimol e GABA 42
Figura 9 – Conexões anatômicas relevantes para a expressão e extinção do medo 46
Figura 10 – Coordenada alvo no PLC 61
Figura 11 – Posicionamento das cânulas implantadas e fixadas com capacete de acrílico 62
Figura 12 – Equipamento para ensaio comportamental: contexto condicionado A 63
Figura 13 – Infusão intracerebral 65
Figura 14 – Equipamento para ensaio comportamental: contexto alternativo B. 66
Figura 15 – Desenho experimental do protocolo de CFC 67
Figura 16 – Desenho experimental do protocolo de OL 68
Figura 17 – Localização dos objetos: sendo adjacente, ou em diagonal. 68
Figura 18 – Corte coronal para dissecação e verificação das cânulas 70
Figura 19 – Efeito do muscimol intra-PLC sobre a evocação do CFC 75
Figura 20 – Efeito do muscimol intra-PLC sobre a evocação da tarefa de OL 77
Figura 21 – Expressão proteica de c-Fos e ARC 79
Figura 22 – Correlações de Spearman entre a expressão proteica de c-Fos e ARC 81
Figura 23 – Correlações entre a resposta comportamental e a expressão proteica de c-Fos e ARC ..84
Figura 24 – Avaliação na exploração do campo aberto 86
Figura 25 – Posição das cânulas no PLC implantadas a 15° 87
Figura 26 – Efeito do muscimol intra-PLC sobre a evocação CFC aos 2 dias com cânulas a 0° 89
Figura 27 – Evidência de aprendizado aversivo significativo no CFC 91
Figura 28 – Modelo proposto dos circuitos pré-límbicos para a evocação precoce e tardia do medo .94
Figura 29 – Avaliação computadorizada de rastreio no campo aberto 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação dos efeitos principais, bem como de suas interações, sobre a quantificação de c-Fos no PLC e ACC 78
Tabela 2 – Avaliação dos efeitos principais, bem como de suas interações, sobre a quantificação ARC no PLC e ACC 78
Tabela 3 – ANOVA de efeitos mistos para os intervalos de 2, 28 e 45 dias 92
Tabela 4 – Comparação do efeito tempo dentro dos grupos 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-OHT	4-hidroxitamoxifeno
A/P	Anteroposteriores
ACC	Córtex cingulado anterior
AMPAR	Receptores α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora 1
APV	Ácido D-2-amino-5-fosfonovalérico
ARC	Proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade
BCA	Ácido bicinconínico
BLA	Amígdala basolateral
CA	Corno de Ammon
Ca^{2+}	Cálcio
CaMKII	Proteína cinase II estimulada por cálcio/calmodulina
CeA	Amígdala central
CFC	Condicionamento aversivo ao contexto
CNO	N-óxido de clozapina
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CRE	Elemento de resposta ao AMPc
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP
D/V	Dorsoventral
df	Graus de liberdade
DP	Córtex peduncular dorsal
DREADD	*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*
DTT	Ditiotreitol
Egr1	*Early Growth Response Protein 1*
EPM	Erro padrão da média
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFP	Proteína verde fluorescente
GG	Greenhouse-Geisser
IB	Instituto de Biociências
IEGs	Genes de expressão imediata
ILC	Córtex infralímbico
ITC	Células intercaladas
L/L	Laterolateral
LCE	Labirinto em cruz elevada
LDS	Dodecil sulfato de lítio
LPBNC	Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogênio
mPFC	Córtex pré-frontal medial
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

MUS	Muscimol
NMDAR	Receptor *N*-metil-D-aspartato
Of	Objeto fixo
OL	Localização de objetos
Om	Objeto móvel
PKA	Proteína cinase A
PKMζ	Proteína cinase M zeta
PLC	Córtex pré-límbico
PVT	Núcleo paraventricular do tálamo
RNA	Ácido ribonucleico
TPA	12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
TER	Elemento de resposta ao TPA
TTX	Tetrodotoxina
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VEH	Veículo

LISTA DE SÍMBOLOS

[^{14}C]	Carbono-14
[^{3}H]	Trítio
μ	Micro
ω^2	*Omega-squared*
ρ	Rô (*rho*)
ζ	Zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 CONCEITUANDO MEMÓRIA 19
1.2 A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA É UM PROCESSO GRADUAL 20
1.2.1 Biologia molecular da formação da memória 23
1.3 HIERARQUIA DA CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS EXPLÍCITAS 29
1.4 TEORIAS DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA 30
1.5 PARADIGMA DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO 33
1.5.1 Discriminação e generalização 35
1.6 MÉTODOS DE MANIPULAÇÃO DA ATIVIDADE NEURAL 39
1.6.1 Aspectos metodológicos da inativação por muscimol 41
1.7 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL 44
1.7.1 Participação do mPFC na consolidação de memórias aversivas 48
1.7.2 Atividade do mPFC no reconhecimento contextual e localização espacial 51
1.7.3 Para além do modelo hipocampo-ACC: em busca do papel do PLC na memória remota 52
2. HIPÓTESE 57
3 OBJETIVOS 58
3.1 OBJETIVO GERAL 58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 58
4 METODOLOGIA 59
4.1 ANIMAIS 59
4.1.1 Cálculo amostral 60
4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICOS 60
4.3 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS 62
4.3.1 Condicionamento Aversivo ao Contexto (CFC) 62
4.3.2 Teste de Localização de Objetos (OL) 67
4.3.3 Teste de Campo Aberto 69
4.4 EUTANÁSIA E REMOÇÃO DO ENCÉFALO 69
4.5 WESTERN BLOT 70
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 72
5 RESULTADOS 74
5.1 O PLC PARECE TER PARTICIPAÇÃO NA MEMÓRIA RECENTE (2 DIAS), MAS NÃO NA REMOTA (28 OU 45 DIAS) 74

5.2 A PARTICIPAÇÃO DO PLC NA EVOCAÇÃO DA MEMÓRIA RECENTE PARECE ESTAR RELACIONADA A EXPRESSÃO DO MEDO E NÃO AO SEU ARMAZENAMENTO 76

5.3 O TRATAMENTO COM MUSCIMOL NÃO PARECE TER AFETADO A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CODIFICADAS POR IEGS EM NENHUMA ESTRUTURA OU CONTEXTO, MAS HÁ SUGESTÃO DE UM PERFIL BIOQUÍMICO DIFERENTE ENTRE AS ÁREAS. 78

5.4 OS NÍVEIS DE PROTEÍNAS CODIFICADAS POR IEGS NÃO SE CORRELACIONARAM COM A RESPOSTA COMPORTAMENTAL (% DE *FREEZING*) NEM NO PLC NEM NO ACC. 82

5.5 A CIRURGIA ESTEREOTÁXICA INCLINADA NO PLC NÃO PREJUDICOU CAPACIDADE EXPLORATÓRIA DOS ANIMAIS 85

5.6 A CIRURGIA COM INCLINAÇÃO DE 15° É MELHOR QUE A DE 0°? 88

5.7 APESAR DOS BAIXOS NÍVEIS DE *FREEZING* OBSERVADOS, O TREINAMENTO PROMOVEU UM AUMENTO SIGNIFICATIVO DESSA RESPOSTA EM RELAÇÃO AOS VALORES BASAIS (PRÉ-CHOQUE) 90

6 DISCUSSÃO 93

6.1 ASPECTOS METODOLÓGICOS 104

6.1.1 Conteúdo de proteínas expressas por genes precoces 104

6.1.2 Consequências da cirurgia e observações comportamentais 107

6.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS 110

6.3 PERSPECTIVAS 113

7 CONCLUSÕES 115

8 REFERÊNCIAS 117

APÊNDICE A 133

APÊNDICE B 135

APÊNDICE C 136

1 INTRODUÇÃO

A memória é essencial para a adaptação, pois permite que os indivíduos aprendam com experiências passadas e selecionem comportamentos apropriados caso vivenciem contingências semelhantes em outro momento (RICHARDS; FRANKLAND, 2017). Memórias de eventos (ditas episódicas), como, por exemplo, aquelas associadas a experiências ameaçadoras, podem persistir ao longo da vida; contudo, há evidências de que a sua representação neural se reorganiza progressivamente no encéfalo ao longo do tempo (DO MONTE *et al.*, 2016; QUIÑONES-LARACUENTE; VEGA-MEDINA; QUIRK, 2021). Após adquiridas, essas memórias são inicialmente lábeis, isso é, vulneráveis a interferências, e dependem do hipocampo para sua evocação, a qual é caracterizada por um elevado nível de detalhamento. Contudo, gradualmente assumem um estado mais permanente de armazenamento (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005), ao passo que se tornam cada vez mais dependentes de regiões corticais, incluindo o córtex pré-frontal medial (mPFC, do inglês *medial prefrontal cortex*) (GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026). Essa transição, acompanhada pela perda de precisão dos detalhes, caracteriza o processo de consolidação sistêmica descrito pela teoria *standard* da formação da memória.

Dentro desse quadro teórico, o condicionamento aversivo constitui um modelo amplamente utilizado para investigar a formação, reorganização e evocação de memórias. Nesse paradigma, um estímulo condicionado, como um contexto ou tom, inicialmente neutro, passa a evocar uma resposta de valência emocional negativa após ser pareado com um estímulo incondicionado aversivo, como um choque (MAREN, 2001; FANSELOW; POULOS, 2005). A ativação simultânea das sinapses que codificam ambos os estímulos resultam na associação de suas representações mnêmicas. Durante esse evento, subconjuntos de neurônios passam a exibir maior plasticidade sináptica e aumento na produção de proteínas codificadas por genes de expressão imediata, como c-Fos (PETTIT *et al.*, 2022) e ARC (ERIKSEN; BRAMHAM, 2022), organizando-se em conjuntos neuronais funcionalmente correlacionados (FRANKLAND; JOSSELYN; KÖHLER, 2019; KVEIM *et al.*, 2024) que constituem o traço biológico − o engrama − no qual a memória da experiência é codificada (KITAMURA *et al.*, 2017; JOSSELYN; TONEGAWA, 2020). Assim, essa memória associativa de medo integra componentes cognitivos e emocionais, combinando o

aprendizado da contingência entre estímulos com a atribuição de valor afetivo ao estímulo condicionado (FALIAGKAS; RAO-RUIZ; KINDT, 2018). No entanto, embora respostas condicionadas, como o congelamento (*freezing*), indiquem a formação da associação, na experimentação animal essas medidas comportamentais não permitem dissociar os aspectos cognitivos (expressão da memória) dos aspectos emocionais (expressão do medo).

Diante dessa limitação, e considerando que o engrama é suportado por redes amplamente integradas, torna-se útil investigar a contribuição de estruturas específicas nos processos envolvidos na formação e expressão da memória. Por exemplo, evidências indicam que a ativação do córtex pré-límbico (PLC, do inglês *prelimbic cortex*) está envolvido principalmente durante a evocação de memórias de medo aprendido (TAKEHARA; KAWAHARA; KIRINO, 2003; CORCORAN; QUIRK, 2007), enquanto regiões adjacentes, como o córtex cingulado anterior (ACC, do inglês *anterior cingulate cortex*), participam de processos de aquisição, armazenamento remoto e generalização (FRANKLAND *et al.*, 2004; EINARSSON; PORS; NADER, 2015; HAUBRICH *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2026). Já o córtex infralímbico (ILC, do inglês *infralimbic*) tem sido associado à extinção de memórias (VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006).

Nesse sentido, o presente estudo investigou o perfil de consolidação sistêmica do PLC, sub-região do mPFC, em ratos machos submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto (CFC, o inglês *contextual fear conditioning*), avaliando seu papel na evocação da memória e na precisão/generalização da resposta após inibição pré-teste em diferentes intervalos, no contexto condicionado ou em um contexto similar. Com base nesse delineamento, duas questões centrais foram propostas. A primeira buscou determinar se o PLC está envolvido no armazenamento da memória ou apenas na expressão do medo, considerando seu papel já estabelecido na modulação de respostas aversivas (VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2013). Para responder a essa pergunta, os animais foram submetidos a uma tarefa de memória de valência neutra e testados sob inibição do PLC. A segunda questão investigou a possibilidade de outras regiões encefálicas compensarem a redução de atividade da estrutura inibida durante a expressão do medo (SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010; GOSHEN *et al.*, 2011; MAREK *et al.*, 2018; MAREK; SUN; SAH, 2019). Nesse contexto, o ACC foi selecionado como região candidata, sendo analisados os níveis

de proteínas codificadas por genes de a expressão imediata como indicadores de possível compensação funcional.

1.1 CONCEITUANDO MEMÓRIA

A memória é a capacidade de um organismo armazenar representações internas de experiências passadas em uma forma que pode ser recuperada mais tarde (HAN *et al.*, 2022). Com base em experiências anteriores, os animais são capazes de antecipar consequências futuras e adequar suas escolhas. Assim, memórias previamente adquiridas orientam a repetição de comportamentos bem-sucedidos e a evitação de ações associadas a resultados desfavoráveis (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021). Memórias com conteúdo emocional são retidas mais facilmente do que aquelas de valência neutra (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011). O aprendizado do medo, em particular, é adquirido rapidamente e essa memória é duradoura (BERGSTROM, 2016), permitindo que os animais se lembrem e respondam de forma mais efetiva a situações ameaçadoras (DO MONTE *et al.*, 2016; MAREK; SUN; SAH, 2019).

Memórias podem ser classificadas quanto ao seu conteúdo como declarativas (ou explícitas, termo comumente usado para referir-se a animais não humanos) e não-declarativas (ou implícitas) (QUILLFELDT, 2016; IZQUIERDO, 2018; KANDEL, 2021). Memórias declarativas podem ser episódicas, quando de eventos experienciados, ou semânticas, quando se tratando de fatos. Podemos ter aprendido na escola que Pedro Álvares Cabral chegou ao Brasil no ano de 1500, isso é um fato, mas provavelmente não possuímos uma memória episódica de quando aprendemos essa informação, quais colegas estavam na sala de aula, e se era um dia chuvoso ou ensolarado. Em contrapartida, as memórias não-declarativas, como o nome sugere, são aquelas que não se consegue colocar em palavras, como andar de bicicleta ou tocar um instrumento.

Outra forma de classificar as memórias é pelo seu tempo de duração, distinguindo-se, de modo geral, em memória de trabalho, curta duração ou de longa duração (KANDEL, 2021). A memória de trabalho mantém a informação ativa por alguns segundos ou, no máximo, poucos minutos após a aquisição, sem passar pelo processo de consolidação. Ela permite a manipulação temporária do conteúdo, como ocorre durante a leitura de uma frase: as palavras são mantidas apenas o tempo

necessário para a construção do significado, sendo então esquecidas, enquanto o sentido geral é preservado (IZQUIERDO, 2018). Assim, a memória de trabalho sustenta a informação por tempo suficiente para que ela possa, ou não, ser incorporada a sistemas de memória mais duradouros.

Fora a memória de trabalho, as memórias explícitas podem persistir por minutos ou horas, por dias ou meses, ou até por décadas (IZQUIERDO, 2018). Convencionou-se denominar memória de curta duração aquela que se estende por aproximadamente uma a seis horas, intervalo considerado crítico para a consolidação das memórias de longa duração (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; QUILLFELDT, 2016). Apesar dessa relação temporal, a memória de curta duração e a memória de longa duração envolvem processos paralelos e parcialmente independentes. Embora compartilhem o mesmo conteúdo informacional, isto é, o mesmo *input* sensorial e o mesmo *output* comportamental, suas bases neurobiológicas são distintas (IZQUIERDO, 2018). A memória de curta duração não requer síntese proteica e provavelmente se sustenta na ativação transitória de cascatas de sinalização intracelular envolvendo diferentes cinases, sem a participação direta do núcleo celular. Após algumas horas, essa memória transitória é gradualmente substituída pela memória de longa duração, cuja estabilização depende de síntese proteica (ASOK *et al.*, 2019; KANDEL, 2021).

1.2 A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA É UM PROCESSO GRADUAL

A formação da memória não é um processo instantâneo, mas sim gradual que envolve inicialmente a aquisição de informações sensoriais, as quais, podem ser armazenadas por tempo variável através do processo de consolidação (DO MONTE *et al.*, 2016; QUILLFELDT, 2016), ou então esquecidas (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021). Mais especificamente, a formação de memórias ditas explícitas em roedores (análogas às autobiográficas em humanos) inicia com o recrutamento de neurônios que no momento da aquisição apresentavam maior excitabilidade (RUDY, 2008; BITTNER *et al.*, 2015; HADZIBEGOVIC *et al.*, 2025). Os neurônios recrutados passam por um processo de consolidação sináptica que ocorre ao longo de minutos a horas (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; ASOK *et al.*, 2019). Nesse período, sofrem alterações estruturais e funcionais, como aumento da densidade de espinhos dendríticos e da eficácia sináptica. Para que essas mudanças se estabilizem e

sustentem o armazenamento de longo prazo, é necessária a síntese de novas proteínas (KANDEL, 2021) (ver seção 1.2.1).

Paralelamente às adaptações celulares, ocorre também a consolidação sistêmica, que se estabelece no nível de redes neurais distribuídas entre múltiplas estruturas encefálicas. As teorias que explicam esse processo sugerem que, durante a aquisição, diferentes traços mnêmicos são formados e alocados entre essas estruturas, sendo que quando a memória ainda é recente, o hipocampo predomina como região essencial para sua evocação, permitindo a evocação de uma representação rica em detalhes contextuais (QUILLFELDT, 2016). Com o passar de semanas em roedores (ou de semana a anos em humanos), à medida que a memória se torna remota, acredita-se que ocorra uma “troca de guarda”. Nesse estágio, a ativação dos traços corticais dessa memória passa a predominar sobre a ativação hipocampal, assumindo um papel central na evocação da memória (ver seção 1.4), que por sua vez perde a precisão de detalhes (GILBOA *et al.*, 2004), mas tornam-se mais resistentes a disrupção (COHEN; EICHENBAUM, 1993; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015; SQUIRE *et al.*, 2015; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018; DENARDO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021; HAN *et al.*, 2022).

Em roedores, a classificação temporal das memórias de longo prazo varia conforme seu tipo e o paradigma experimental. De modo geral, memórias recentes são definidas como aquelas avaliadas entre 24 horas e 7 dias após o treinamento, enquanto memórias remotas correspondem a intervalos superiores a 7 dias, sendo períodos de 3 a 4 semanas frequentemente empregados para caracterizar memórias bem consolidadas (GOSHEN *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; STERN *et al.*, 2013; DENARDO *et al.*, 2019; GOLBABAEI *et al.*, 2025; GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026). Essa distinção temporal reflete mudanças nos substratos neurais envolvidos na manutenção da memória ao longo do tempo (QUILLFELDT, 2019).

Memórias já consolidadas podem ser evocadas e, nesse momento, tornam-se lábeis e suscetíveis a modificações. Essas alterações podem envolver a incorporação de novas informações ou o fortalecimento da memória existente, caracterizando o processo de reconsolidação (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021; HAN *et*

al., 2022). Alternativamente, a memória pode passar por extinção, situação em que um estímulo anteriormente capaz de eliciar uma resposta deixa de produzi-la. Há duas explicações principais para esse fenômeno. A teoria do *unlearning* propõe que as conexões sinápticas que sustentavam a memória original enfraquecem. Já a teoria do *new learning* sugere que a memória inicial não é apagada, mas sim inibida por uma nova memória (HAN *et al.*, 2022), sendo essa a interpretação atualmente mais aceita (AKIRAV; MAROUN, 2007) (Figura 1).

O sistema de memória episódica registra automaticamente muitos eventos do cotidiano. No entanto, grande parte dessas experiências é pouco relevante − como o que comemos no café da manhã ou conversas triviais. Essas memórias costumam ser recuperáveis por alguns dias, mas perdem força com o tempo. Como não têm grande importância, seu esquecimento não representa prejuízo. De fato, ele pode resultar de processos celulares ativos que despotencializam sinapses envolvidas na indexação dessas lembranças (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021).

Nesse sentido, pode-se concluir que o traço de memória é particularmente vulnerável a modificações logo após o aprendizado, especialmente quando ainda depende fortemente do hipocampo, tornando-se progressivamente mais resistente à disrupção com o passar do tempo, à medida que se consolida em redes corticais (MCGAUGH, 2000). Esse fenômeno, teorizado por Ribot (2005), foi claramente observado no caso do paciente H.M. Desde a infância, H.M. sofria de crises epilépticas decorrentes de um acidente e, na vida adulta, foi submetido a uma lobotomia bilateral com o objetivo de tratar o foco das crises (CORKIN, 2002). O procedimento resultou na remoção de grande parte do lobo temporal medial, incluindo a formação hipocampal. Após a recuperação cirúrgica, embora sua personalidade e capacidade intelectual geral tenham sido preservadas, H.M. passou a apresentar uma amnésia anterógrada severa, tornando-se incapaz de formar novas memórias episódicas (SCOVILLE; MILNER, 1957). Em contraste, apesar de também apresentar uma amnésia retrógrada limitada a alguns anos que antecederam a cirurgia, manteve preservadas as memórias da infância e da adolescência (SCOVILLE; MILNER, 1957; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005).

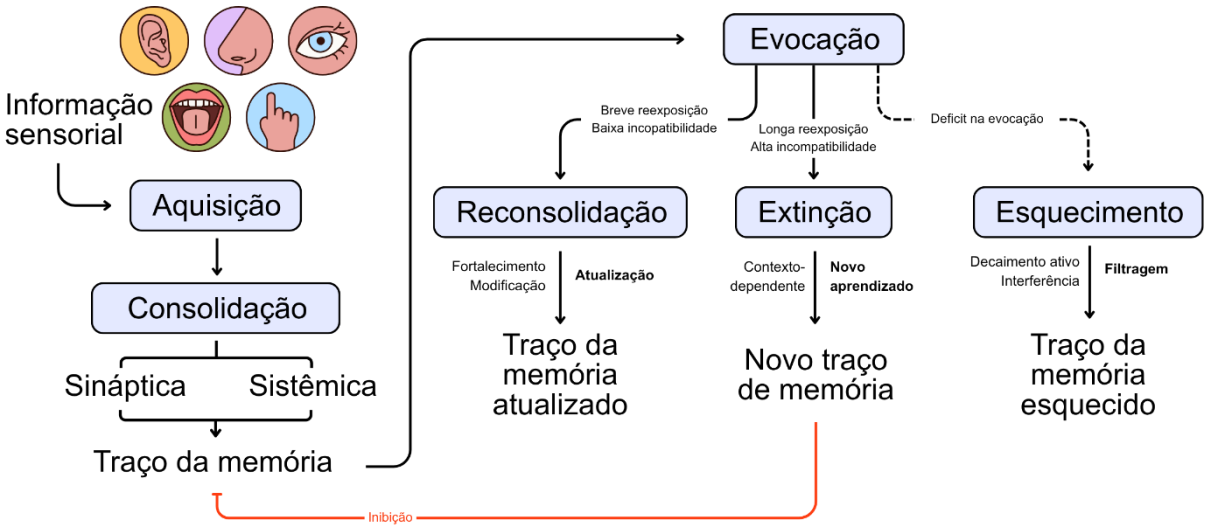

Figura 1 – Aquisição, consolidação e transformação da memória (DE OLIVEIRA ALVARES; DO-MONTE, 2021).

A memória de formas básicas de aprendizagem comportamental é sustentada por um conjunto específico de neurônios que, quando ativados simultaneamente, reproduzem o padrão necessário para evocar essa memória. Essas populações são chamadas de engrama, termo introduzido por Semon (1911) para designar um substrato físico e distribuído da memória. Em vez de ser uma entidade essencialmente celular, o engrama talvez seja melhor definido pelas alterações na força sináptica entre as células que o compõem (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020), especialmente porque diferentes sinapses de um mesmo neurônio podem armazenar partes de memórias distintas (ABDOU *et al.*, 2018).

1.2.1 Biologia molecular da formação da memória

A formação de memórias de longa duração requer ativação e fortalecimento concomitantes de neurônios pré e pós-sinápticos (HEBB, 2005), e o substrato para esse fortalecimento ocorre através da dinâmica entre potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD). Assim, a consolidação da memória depende de plasticidade sináptica, mediada por cascatas de sinalização molecular em sinapses específicas dos neurônios que compõem os circuitos que codificam essa memória (MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012), e envolve múltiplos mecanismos celulares e moleculares, incluindo a dependência de receptores e canais iônicos específicos (Figura 2), que variam conforme o tipo de sinapse e o padrão de atividade neural (KANDEL, 2021).

Está bem estabelecido que o receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDAR) é essencial para a indução da LTP, atuando como um detector de coincidência para a formação da memória (WANG; HU; TSIEN, 2006; WHITLOCK *et al.*, 2006; CASSINI *et al.*, 2013). A ativação do NMDAR permite a entrada de Ca^{2+}, que ativa a proteína cinase II estimulada por cálcio/calmodulina (CaMKII), principal mediadora da fase inicial da LTP, promovendo a potenciação sináptica sobretudo por inserção e/ou aumento da condutância de receptores α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPAR) e sustentando a LTP por até 1-3 horas (fase precoce) (KANDEL, 2021). A manutenção da LTP por períodos mais longos (fase tardia) depende da ativação das vias por proteína cinase ativada por mitogênio (MAPK) e a proteína cinase A (PKA). Essas cascatas de sinalização convergem para a ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB) no núcleo, que atua como fator de transcrição, promovendo a expressão gênica e a síntese *de novo* de proteínas necessárias à consolidação da memória de longa duração (SCHARF *et al.*, 2002; RUDY, 2008; NICOLL, 2017; KANDEL, 2021). Nesse sentido, Han *et al.* (2009) mostraram que neurônios com maior excitabilidade, identificados, por exemplo, pela superexpressão de CREB, são preferencialmente recrutados durante a formação e a evocação de memórias. Quando esses neurônios em específico são eliminados, mas não um número equivalente de neurônios aleatórios, a evocação da memória é comprometida.

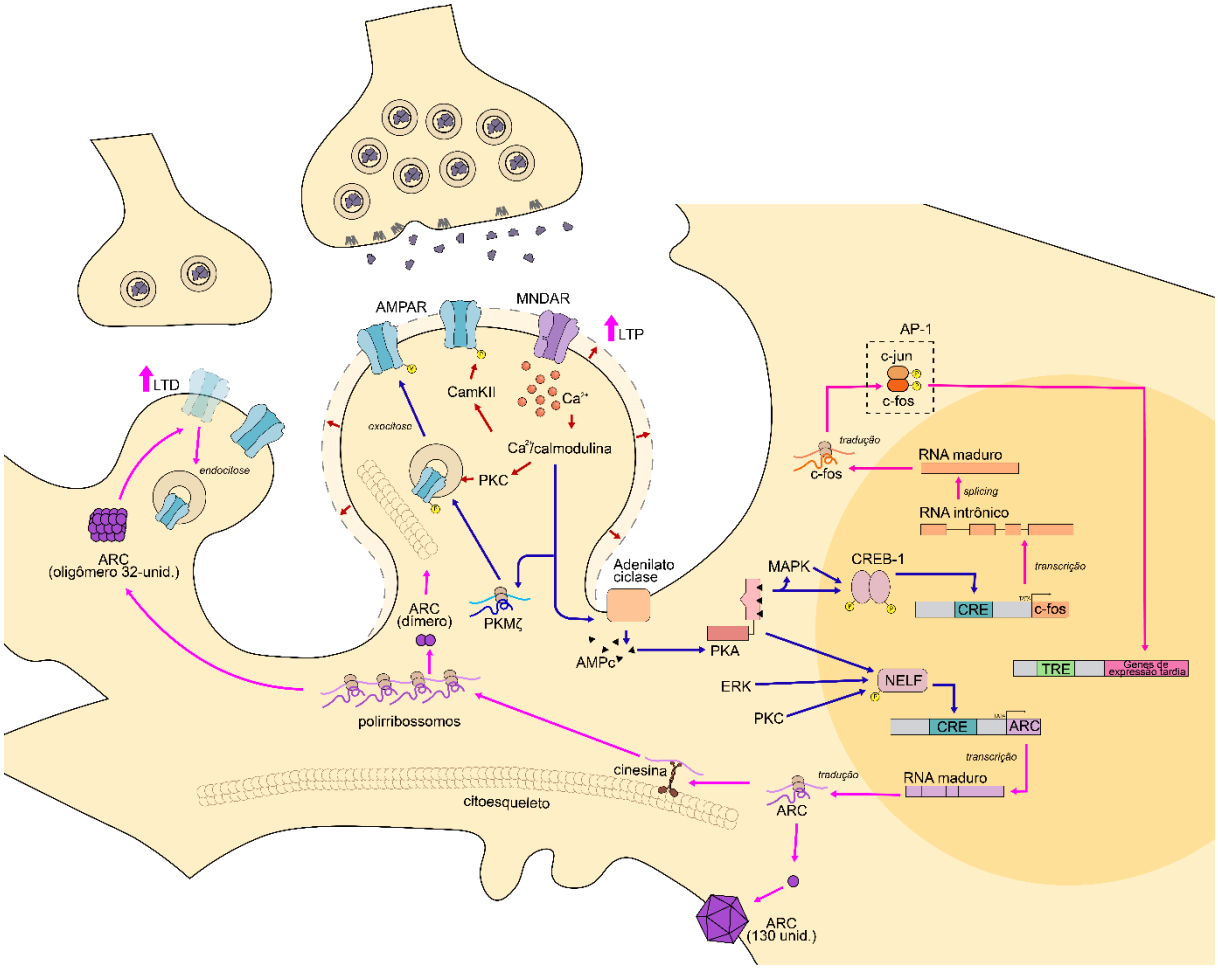

Figura 2 – Por meio da ativação de vias de sinalização dependentes de Ca^{2+}, a estimulação sináptica induz a expressão de c-Fos e ARC. AMPAR: receptor de α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico; AMPc: adenosina monofosfato cíclico, AP-1: proteína ativadora 1; ARC: proteína associada ao citoesqueleto regulada pela atividade; CaMKII: proteína cinase II dependente de cálcio/calmodulina; CRE: elemento de resposta ao AMPc, CREB-1: proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc 1; ERK: cinase regulada por sinal extracelular; LTD: depressão de longa duração; LTP: potenciação de longa duração; MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno; NMDAR: receptor de N-metil-D-aspartato, PKA: proteína cinase A; PKC: proteína cinase C; PKMζ: proteína cinase M zeta; RNA: ácido ribonucleico; TER: elemento de resposta ao 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Figura inspirada nos esquemas de Kandel (2021) capítulo 54 e Khan *et al.* (2025), e elaborada no Adobe Illustrator.

Além disso, neurônios recrutados durante a aquisição e a evocação de memórias podem ser identificados pela expressão de proteínas codificadas por genes de expressão imediata (IEGs, do inglês *immediate-early genes*), que apresentam baixa expressão basal e são rapidamente induzidos pela atividade neural. Esses genes incluem fatores de transcrição, moléculas de sinalização e proteínas sinápticas, desempenhando papel fundamental na plasticidade sináptica, na manutenção celular e na formação da memória.

1.2.1.1 Marcadores de atividade neuronal: c-Fos e ARC

Os IEGs são transcritos de forma rápida e transiente após estimulação neural (BULTHUIS *et al.*, 2025), utilizando a maquinaria de transcrição preexistente, frequentemente através da atracação prévia da RNA polimerase II próximo ao sítio de início da transcrição (KORB; FINKBEINER, 2011; ERIKSEN; BRAMHAM, 2022).

Um dos IEGs mais utilizados na imuno-histoquímica, como marcador de atividade neuronal (HAN *et al.*, 2022) é o *c-fos*. Sua expressão é rapidamente induzida pela atividade neuronal, por meio do aumento de Ca^{2+} e adenosina monofosfato cíclica (AMPc) intracelulares e da ativação da via MAPK (CHUNG, 2015). Seu mRNA é transcrito entre 30 e 60 minutos após o estímulo, enquanto a proteína c-Fos atinge seu pico entre 1 e 3 horas, e decai entre 4 e 6 horas após a estimulação (KOVÁCS, 1998). C-fos exerce dupla função: no núcleo, atua como fator de transcrição regulando genes efetores tardios (HE; YAMADA; NABESHIMA, 2002; MALNOU *et al.*, 2007) (Figura *2*); e no citoplasma, ativa a síntese de fosfolipídios e glicolipídios, favorecendo a formação de membranas e o crescimento de neuritos (RODRÍGUEZ-BERDINI; CAPUTTO, 2019; RODRÍGUEZ-BERDINI *et al.*, 2020).

Em condições basais, o gene *c-fos* apresenta baixos níveis constitutivos de expressão, devido à instabilidade de seu mRNA e ação autorrepressora que exerce sobre sua tradução (MORGAN; CURRAN, 1991). Durante a aprendizagem, porém, *c-fos* é rapidamente induzido nos neurônios recrutados para a codificação do traço mnêmico, sendo amplamente utilizado como marcador do recrutamento neuronal para o engrama. De fato, neurônios que expressam *c-fos* nesse período são frequentemente necessários para a evocação posterior da memória (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; ROY *et al.*, 2022), e a manipulação optogenética dessas células pode modificar o desempenho mnésico, sustentando seu papel na codificação de memórias específicas (GOSHEN *et al.*, 2011; JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015; ROY *et al.*, 2022; BULTHUIS *et al.*, 2025).

No entanto, existem diversas limitações no uso de c-Fos como indicador de atividade neuronal (CHUNG, 2015; KITAMURA *et al.*, 2017; SILVA; BURNS; GRÄFF, 2019). Seus níveis não permitem distinguir, de forma inequívoca, entre atividade associada ao condicionamento e atividade neural inespecífica, como aquela induzida por estresse ou outros estímulos, além de variar conforme a região encefálica e o tipo

de tarefa (ARAI *et al.*, 2025). Assim, seu valor preditivo é maior quando vinculado à análise de outros IEGs.

Nesse contexto, destaca-se a proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade ((ARC ou Arg3.1), do inglês *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), um IEG que atua como um efetor em vias neuronais (BRAMHAM *et al.*, 2010). A expressão de *Arc* pode ser impulsionada por múltiplas vias de sinalização (KORB; FINKBEINER, 2011; CHEN *et al.*, 2023). Seu mRNA é induzido rapidamente após o comportamento, sendo detectável poucos minutos após a exploração espacial (VAZDARJANOVA *et al.*, 2006) ou memória contextual (PEVZNER; GUZOWSKI; MEMORY, 2015) e atingindo níveis máximos em torno de 30 minutos após a indução, enquanto a proteína ARC apresenta pico entre 60 e 120 minutos (MYRUM; MORENO-CASTILLA; RAPP, 2022), retornando aos níveis basais em até 4 horas (LONERGAN *et al.*, 2010).

A hipótese de Eriksen e Bramham (2022), apoiada por Chen *et al.* (2023), sugere que funções distintas da ARC dependem de sua oligomerização (Figura *2*). Dímeros regulam a dinâmica de polimerização do citoesqueleto de F-actina, a qual é essencial para a estabilização e aumento no número de espinhos dendríticos finos (mais plásticos e associados à aprendizagem), ao mesmo tempo em que reduzem espinhos mais estáveis, favorecendo a remodelação sináptica (KORB; FINKBEINER, 2011). Tetrâmeros (e oligômeros maiores, com 32 unidades) de ARC modulam a endocitose de AMPAR, reduzindo a densidade de receptores de superfície e prevenindo hiperexcitabilidade de rede (KIM; KIM; UM, 2018; ERIKSEN; BRAMHAM, 2022; SIBAROV *et al.*, 2023). ARC também se automonta em capsídeos semelhantes a retrovírus (130 unidades), liberados em vesículas extracelulares para transferência intercelular de mRNA, possivelmente mediando sinalização parácrina e acumulando-se em astrócitos próximos a neurônios hiperativos (ERIKSEN; BRAMHAM, 2022; SIBAROV *et al.*, 2023).

Um estudo de Plath *et al.* (2006) utilizando a tarefa de reconhecimento de objetos mostrou que em um intervalo de 10 minutos entre treino e teste, camundongos *knockout* para *Arc* exibem preferência semelhante aos camundongos controle pelo novo objeto, indicando aprendizagem e memória de curta duração preservadas. Contudo, após um intervalo de 24 horas, apenas os animais controle mantiveram essa preferência, revelando prejuízo na consolidação da memória nos *knockouts*. Esses

animais também apresentam déficits em aprendizagem espacial, condicionamento do medo e aversão condicionada ao gosto (PLATH *et al.*, 2006; BRAMHAM *et al.*, 2010; KORB; FINKBEINER, 2011).

Em um estudo comparativo entre a expressão das proteínas ARC e c-Fos por Bulthuis *et al.* (2025) foi observado que ARC é mais sensível ao estado da memória do que c-Fos, especialmente em CA3 no hipocampo e no córtex retrosplenial ventral, envolvido na memória espacial e contextual (SMITH *et al.*, 2022). Trabalhos mostram que no hipocampo de ratos, a expressão de mRNA de *Arc*, mas não de *c-fos*, correlaciona-se com a força da memória após a evocação. Além disso, durante a evocação do medo contextual, o ARC pode atuar no escalonamento homeostático via endocitose de AMPAR (SHEPHERD *et al.*, 2006), preservando a capacidade de potenciação em regiões recorrentes como CA3, evitando generalização excessiva da representação.

A análise dos IEGs possibilita identificar alterações na ativação de áreas funcional ou anatomicamente conectadas após a inibição farmacológica de uma determinada região encefálica (COWANSAGE *et al.*, 2014; MINATOHARA; AKIYOSHI; OKUNO, 2016). Por exemplo, a comparação dos padrões espaciais de expressão entre grupos controle e tratados poderia revelar o recrutamento de vias neurais alternativas (GOSHEN *et al.*, 2011), enquanto a análise de múltiplas regiões interconectadas permite caracterizar mudanças na conectividade funcional em nível de circuito (ARAI *et al.*, 2025; BULTHUIS *et al.*, 2025). Assim, a análise conjunta da expressão desses genes e de seus padrões de co-expressão pode oferecer perspectivas sobre a redistribuição da atividade neuronal e o recrutamento de certos mecanismos dependentes de plasticidade.

Adicionalmente, o nível de expressão de proteínas codificadas por IEGs pode correlacionar-se com o comportamento do animal. Arai *et al.* (2025) observaram que, após o CFC, a duração do *freezing* correlacionou-se positivamente com a densidade de células c-Fos$^+$ no giro denteado e no córtex retrosplenial, bem como de células ARC$^+$ no PLC. Em contraste, após uma tarefa de recompensa apetitiva, a duração da ingestão de alimento correlacionou-se com o aumento da densidade de células ARC$^+$ no PLC e no ILC. Esses resultados indicam que o conteúdo de proteínas produzidas

por IEGs varia conforme a região encefálica recrutada e o tipo de tarefa comportamental.

Os autores também investigaram se diferentes proteínas codificadas por IEGs são expressas de forma independente ou co-expressas nos mesmos neurônios. Em regiões como o PLC, o ILC e a amígdala basolateral, essas proteínas tendem a ser expressas de forma independente em animais mantidos em *home cage*, mas passam a ser predominantemente co-expressas após o CFC ou a tarefa de recompensa, sugerindo o recrutamento coordenado de programas de expressão gênica dependentes da experiência. No entanto, esse padrão não foi uniforme entre todas as estruturas analisadas. No giro denteado, por exemplo, a co-expressão não apresentou o mesmo perfil, enquanto no córtex retrosplenial anterior apenas a tarefa de recompensa aumentou a densidade de células positivas para proteínas codificadas por IEGs. Já no córtex retrosplenial posterior, ambas as tarefas aumentaram o conteúdo dessas proteínas, embora a correlação de co-expressão tenha permanecido pouco consistente (ARAI *et al.*, 2025).

1.3 HIERARQUIA DA CONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS EXPLÍCITAS

O sistema de formação de memórias episódicas funciona com duas regras principais: uma hierarquia e um circuito em *loop* (Figura 3). As informações sensoriais chegam inicialmente às regiões primárias do neocórtex, onde diferentes modalidades de estímulos são representadas de forma distribuída (KANDEL, 2021). Então, essas informações seguem para áreas sensoriais secundárias, associativas e, na sequência, convergem primeiro para os córtices perirrinal e parahipocampal, e depois para o córtex entorrinal. Por fim, alcançam o circuito trissináptico do hipocampo (o chamado “arquicórtex”, de organização trilaminar) onde atingem o nível máximo de integração, permitindo a formação de representações episódicas complexas (AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007). Após processadas, essas informações retornam pelo mesmo caminho ao neocórtex (MORRIS *et al.*, 2003; EICHENBAUM, 2004). Esse fluxo inclui projeções específicas dentro da formação hipocampal: o córtex entorrinal projeta-se para o giro denteado, que envia informações para a região CA3; esta, por sua vez, projeta-se para CA1, que se projeta de volta ao entorrinal (chegando em outra camada). A principal via de saída do hipocampo ocorre através do subículo, que

retransmite as informações ao córtex entorrinal e, subsequentemente, aos córtices perirrinal e parahipocampal, culminando no retorno ao neocórtex.

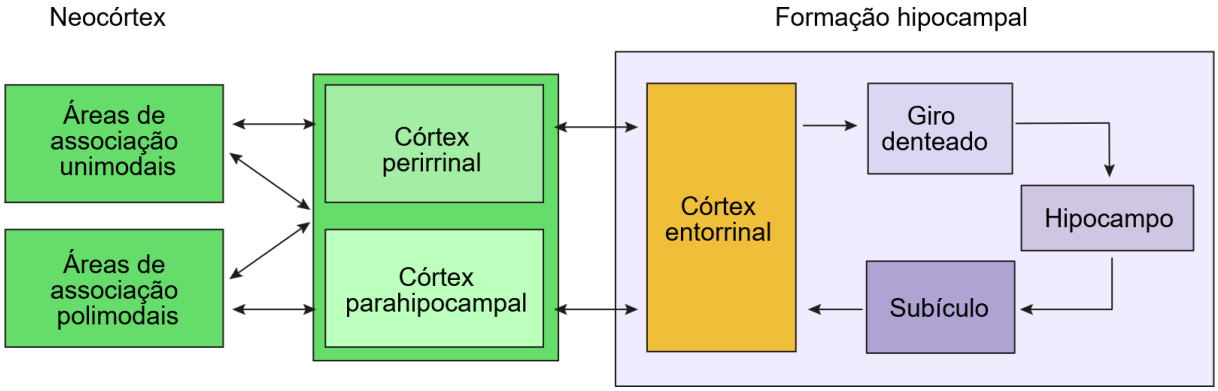

Figura 3 – Organização hierárquica das conexões com a formação hipocampal. Figura traduzida e adaptada de Kandel (2021), capítulo 4.

1.4 TEORIAS DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

David Marr, foi o pioneiro em desenvolver a teoria do papel do hipocampo no armazenamento da memória (MARR, 1970; MARR, 1971), na tentativa de explicar por que o paciente H.M. mesmo após a retirada bilateral de grande parte do lobo temporal medial, retinha suas memórias mais antigas. Marr (1971) sugeriu que o hipocampo atuaria como um sistema temporário para o armazenamento de informações recém-adquiridas, desempenhando papel central na evocação inicial da memória e no fortalecimento progressivo de traços mnêmicos distribuídos em regiões neocorticais. Com o passar do tempo, ocorreria uma reorganização dessas redes, de modo que a evocação da memória se tornaria progressivamente menos dependente do hipocampo e mais sustentada por circuitos neocorticais (MCCLELLAND; MCNAUGHTON; O'REILLY, 1995; NADEL; MOSCOVITCH, 1997; MCGAUGH, 2000; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). Isso explicaria o porquê de H.M. lembrar do seu passado anos antes da cirurgia, mas não conseguir formar novas memórias. Essa proposição é conhecida como a Teoria *standard* da consolidação sistêmica (Figura 4). Durante a formação da memória, processos intrínsecos operam para consolidá-la nas regiões corticais, enquanto o hipocampo, de alguma forma, mantém a coerência dos padrões neurais no neocórtex que representam essa memória. O sistema hipocampal aprende rapidamente, enquanto outros sistemas aprendem mais lentamente (MCCLELLAND; MCNAUGHTON; O'REILLY, 1995; SQUIRE; ALVAREZ, 1995).

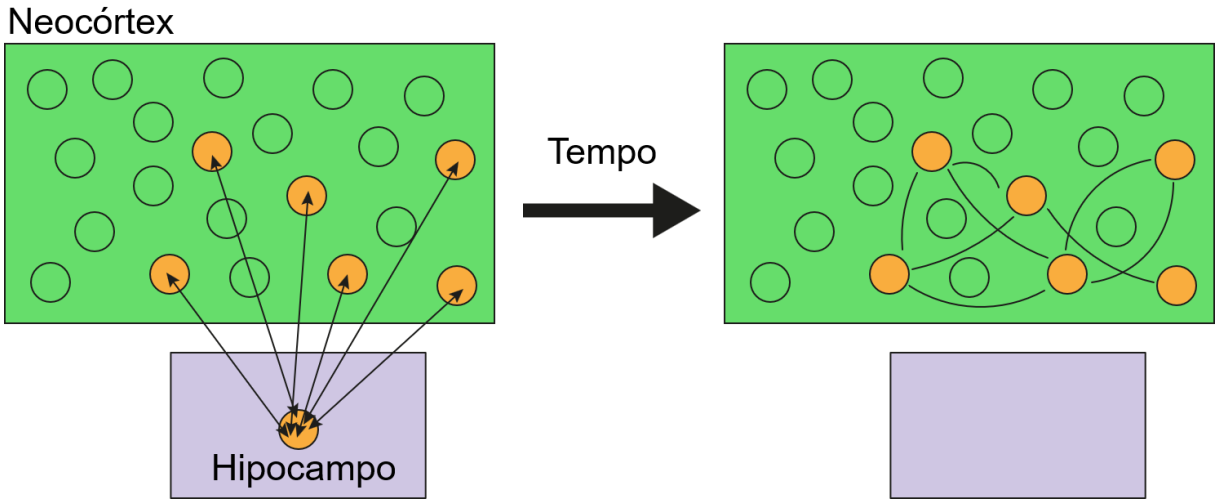

Figura 4 – Teoria *standard* da consolidação sistêmica.

A interação entre o lobo temporal medial e o neocórtex é necessária apenas para a consolidação de memórias declarativas, os demais tipos, seguem outros padrões de armazenamento. Em consonância com esse modelo, lesões ou inativação do mPFC prejudicam a evocação do medo quando realizadas semanas após o treino, mas têm pouco efeito logo após a aprendizagem (FRANKLAND *et al.*, 2004), enquanto intervenções no hipocampo comprometem a evocação apenas quando aplicadas pouco após o treino, e não em intervalos mais tardios (TAKEHARA; KAWAHARA; KIRINO, 2003; QUINN *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; BEEMAN *et al.*, 2013; HAUBRICH *et al.*, 2016). Além disso, a evocação de memórias contextuais recentes associa-se a forte expressão de IEGs no hipocampo, enquanto memórias remotas recrutam preferencialmente áreas neocorticais, reforçando a participação progressiva do córtex na consolidação e no armazenamento de memórias ao longo do tempo (FRANKLAND *et al.*, 2004; MAVIEL *et al.*, 2004; WANG; HU; TSIEN, 2006).

Por muito tempo, o caso do paciente H.M. era um dos únicos conhecidos que apresentava dano bilateral no córtex temporal medial, afetando o hipocampo, e cujos efeitos da lesão pareciam corroborar a Teoria *standard*. No entanto, o surgimento de outros pacientes com danos similares (ZOLA-MORGAN; SQUIRE; AMARAL, 1986; SQUIRE; ALVAREZ, 1995; REMPEL-CLOWER *et al.*, 1996; NADEL; MOSCOVITCH, 1997; BAYLEY; SQUIRE, 2005) levara Nadel e Moscovitch (1997) a questionarem essa teoria, partindo da observação de que, em alguns casos, a ativação do hipocampo ainda era necessária para a evocação de memórias remotas.

Anos antes, Timothy Teyler propôs um dos mais importantes conceitos teóricos em neurobiologia da memória, a chamada Teoria do Índice Hipocampal (*Hippocampal Indexing Theory*), sobre a organização espacial das memórias episódicas no encéfalo, onde as áreas corticais de armazenamento mais duradouro estariam mapeadas no hipocampo, formando um "índice" análogo à tabela FAT de um disco rígido de computador (TEYLER; DISCENNA, 1986; TEYLER; RUDY, 2007). Assim, durante a evocação da memória, um subconjunto do padrão do neocórtex ativa a representação hipocampal, que por sua vez projeta-se de volta para o neocórtex para ativar o padrão completo. Esta teoria está na base dos principais modelos de consolidação sistêmica da Memória, como a Teoria s*tandard* (SQUIRE; ALVAREZ, 1995), a Teoria dos Múltiplos Traços (NADEL; MOSCOVITCH, 1997) e a Teoria da Transformação dos Traços (WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010); veja a seguir.

Com base nessa lógica, Nadel e Moscovitch (1997) postularam a Teoria dos Múltiplos Traços, propondo que a evocação de uma memória episódica sempre depende do hipocampo. O que as torna mais resistentes a interrupções em relação a memórias recentes é o fato de terem tido mais oportunidades de serem reativadas (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). A cada reativação um novo índice (cópia) seria formado no hipocampo de forma distribuídas (Figura 5). Dessa forma, a memória pode sobreviver a danos parciais, mas não completos, no hipocampo, devido a redundância do traço que protege uma memória antiga (KIM; FANSELOW, 1992).

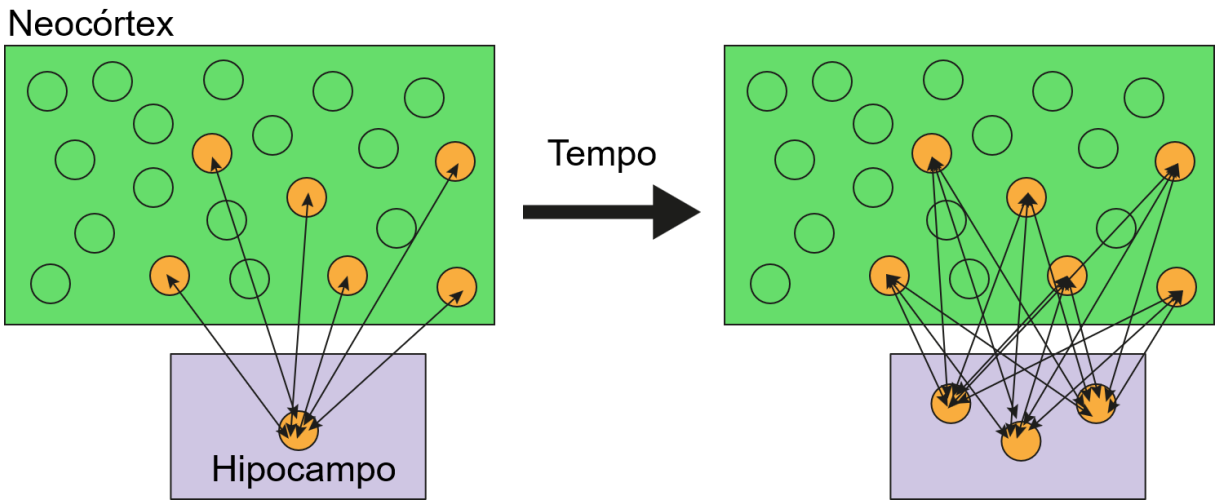

Figura 5 – Teoria dos Múltiplos Traços.

Anos mais tarde, a Teoria dos Múltiplos Traços foi reformulada por Gordon Winocur e colaboradores, que propuseram a chamada Teoria da Transformação dos Traços (WINOCUR; MOSCOVITCH; SEKERES, 2007; WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010). Segundo essa proposta, o traço cortical não corresponde a uma cópia do traço hipocampal, mas a uma representação transformada da memória. Em síntese, a teoria propõe que memórias episódicas detalhadas permanecem dependentes do hipocampo, enquanto este sustenta a formação de traços corticais mais esquemáticos (WINOCUR; MOSCOVITCH; SEKERES, 2007); e, durante a evocação, traços precisos (hipocampais) e traços generalizados (corticais) interagem e competem entre si, dependendo das condições da evocação (WINOCUR; MOSCOVITCH; BONTEMPI, 2010; SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018; QUILLFELDT, 2019).

Portanto, independentemente da teoria de formação da memória, múltiplas regiões encefálicas são recrutadas ao longo do tempo, e os circuitos envolvidos na evocação parecem diferir entre fases iniciais e tardias (DO MONTE *et al.*, 2016). Somado a isso, evidências recentes, baseadas em técnicas avançadas de imageamento, indicam que as representações neurais não são fixas: mesmo em condições comportamentais estáveis, os padrões de disparo neuronal mudam continuamente − fenômeno conhecido como deriva representacional (*representational drift*, no inglês) (MAU; HASSELMO; CAI, 2020; DRISCOLL; DUNCKER; HARVEY, 2022; DEVALLE *et al.*, 2025). Observada em diferentes regiões ao longo de horas a semanas, essa dinâmica não compromete a memória, mas reflete a flexibilidade do código neural (MAU; HASSELMO; CAI, 2020). Decorrente de processos como remodelação sináptica e alterações na excitabilidade neuronal, a deriva pode evitar o esquecimento catastrófico ao atualizar os neurônios ativos, promover a consolidação ao integrar associações ao longo do tempo e favorecer o esquecimento adaptativo ao eliminar informações irrelevantes (DRISCOLL; DUNCKER; HARVEY, 2022).

1.5 PARADIGMA DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO

Diante dessa complexidade dinâmica da consolidação da memória, torna-se essencial recorrer a modelos experimentais que permitam investigá-la de forma controlada. Ratos, em virtude de sua complexidade comportamental e notável propensão para aprender e adaptar-se, tornaram-se amplamente adotados como

paradigmáticos modelos de estudo no campo da pesquisa sobre memória (FANSELOW, 2000; CURZON; RUSTAY; BROWMAN, 2009). Esses animais podem ser treinados para associar distintos estímulos a respostas específicas, revelando-se de interesse particular aos neurocientistas dedicados à investigação do medo aprendido. Uma vez que a memória de medo tende a ser mais duradoura e a resposta condicionada pode ser observada mesmo após longos intervalos de retenção, opta-se por utilizar tarefas comportamentais aversivas para estudar esse fenômeno, permitindo a investigação de mecanismos de aprendizagem e memória em janelas temporais estendidas (TEZANOS; TREJO, 2025). Nesse sentido, o CFC, como paradigma por excelência, investiga como um estímulo inicialmente neutro (e.g., contexto), se torna condicionado, ao ser pareado com um estímulo incondicionado aversivo (e.g., choque elétrico), que naturalmente evoca respostas defensivas, e passa a eliciar respostas condicionadas, como o congelamento em roedores (BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986; MAREN; QUIRK, 2004; ZAMBETTI *et al.*, 2022).

Nesses animais, memórias de medo condicionado ao contexto permanecem específicas ao ambiente em que foram treinadas, persistindo por várias semanas após a aquisição. Ou seja, se os animais forem colocados em um ambiente novo, o tempo de resposta de congelamento (medo) será menor em relação àquele apresentado no contexto de treino (WANG *et al.*, 2009; WILTGEN; TANAKA, 2013). Estudos respaldam a ideia de que, durante o período em que o animal é capaz de discriminar diferentes ambientes, exista uma dependência do hipocampo na mediação da expressão detalhada da memória (WILTGEN *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012). Contudo, 2 a 4 semanas pós-treinamento, os animais exibem respostas condicionadas semelhantes a ambos os contextos (Figura 6) (HEIDBREDER; GROENEWEGEN, 2003; WILTGEN; SILVA, 2007; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012), sendo essa generalização consequência da redução do envolvimento do hipocampo e consolidação da memória em conjuntos neuronais neocorticais (TEYLER; RUDY, 2007; SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018).

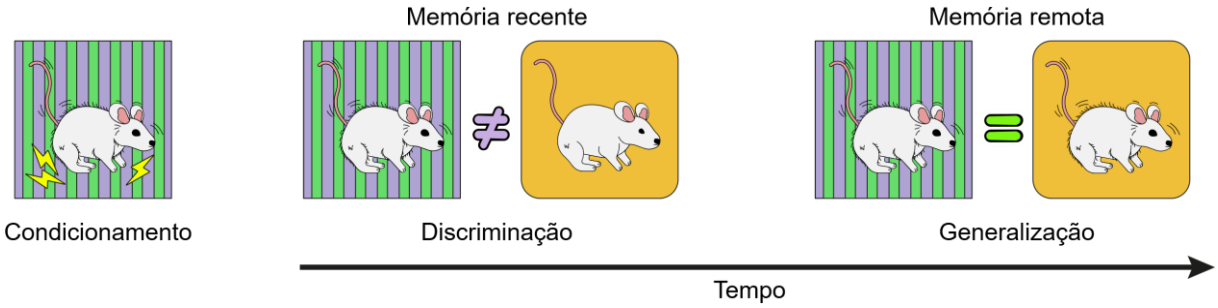

Figura 6 – Discriminação x generalização em diferentes contextos ao longo do tempo.

No paradigma de pré-exposição ao contexto, ratos que recebem um choque imediatamente ao entrar na câmara não desenvolvem medo ao ambiente. Em contraste, quando têm tempo para explorar o local antes de receber o estímulo aversivo, exibem forte resposta de medo condicionado (FANSELOW, 1990). Uma das razões para acreditar que a aquisição de uma representação depende do hipocampo é devido a presença de células de lugar (do inglês, '*place cells*') em CA3 e CA1 (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; MAU; HASSELMO; CAI, 2020).

Essa especialização hipocampal, contudo, não atua isoladamente, pois o circuito córtico-hipocampal constitui um dos principais sistemas envolvidos na recordação de eventos específicos, incluindo tarefas de reconhecimento e localização espacial (SQUIRE, 1992). A desconexão entre o hipocampo e o mPFC compromete a aprendizagem espacial (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997), e pode prejudicar a detecção de mudanças na posição de objetos familiares em tarefas que exigem reposicionamento espacial (BARKER *et al.*, 2007; VIEIRA; KORZUS, 2015). No entanto, esses efeitos parecem variar conforme a tarefa espacial e as condições experimentais empregadas (BARKER *et al.*, 2007; NELSON *et al.*, 2011).

1.5.1 Discriminação e generalização

O encéfalo utiliza um sistema hierárquico hipocampo-neocórtex porque o neocórtex, apesar de vasto, não possui conectividade suficiente para associar rapidamente padrões distribuídos de atividade (complementação de padrão) nem para manter episódios semelhantes separados (separação de padrões) (KANDEL, 2021). O hipocampo, por outro lado, possui alta interconectividade e sinapses facilmente modificáveis, permitindo associar rapidamente padrões arbitrários de entrada e garantir que experiências parecidas, mas não idênticas, permaneçam separadas

(Figura 7). Essa diferença estrutural reflete-se em velocidades de aprendizado distintas: o hipocampo codifica rapidamente novas experiências, enquanto o neocórtex as incorpora gradualmente ao longo do tempo (MCCLELLAND; MCNAUGHTON; O'REILLY, 1995), processo que fundamenta a consolidação sistêmica.

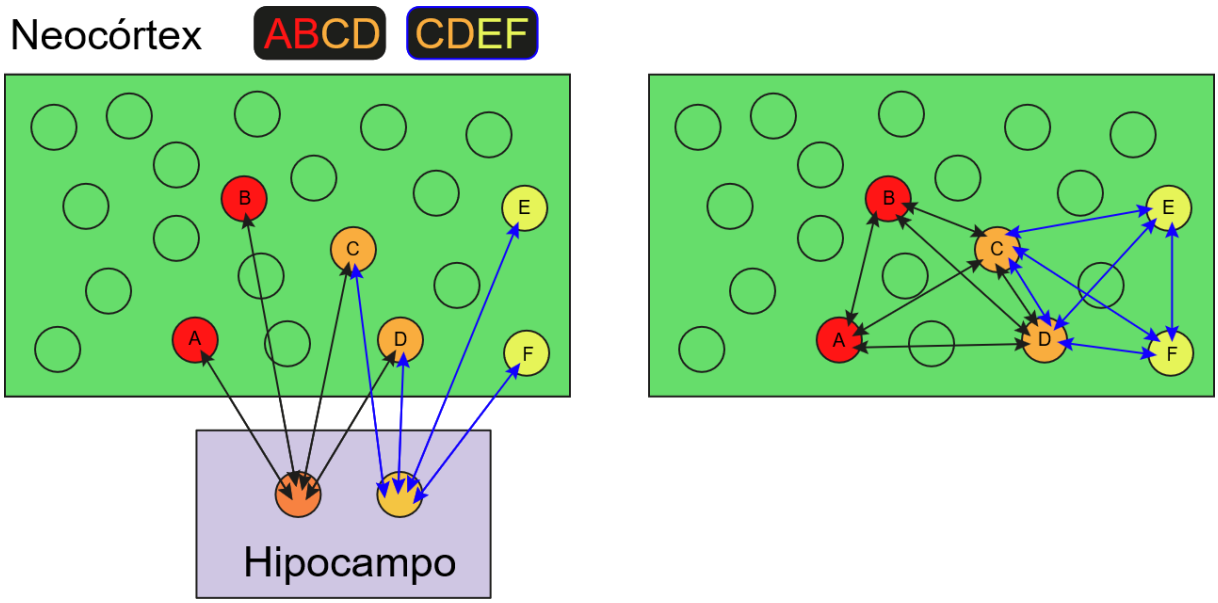

Figura 7 – Teoria do Índice e evocação de sequências episódicas.

Isso indica que a participação do hipocampo é essencial para discriminar o contexto realmente associado ao choque de outro apenas semelhante (PEARCE, 1987; FRANKLAND *et al.*, 1998), evitando que episódios parecidos sejam confundidos. Nesse sentido, ratos sem hipocampo apresentam uma generalização muito maior do que animais controle (FRANKLAND *et al.*, 1998; ANTONIADIS; MCDONALD, 2000).

Como estímulos naturais raramente ocorrem de forma idêntica em experiências similares, a capacidade de generalizar o aprendizado entre eventos é essencial, pois protege contra falsos negativos, evitando que o animal ignore predadores ou perigos que compartilham características sensoriais semelhantes (DUNSMOOR; PAZ, 2015). Ao mesmo tempo, a discriminação entre eventos limita a generalização e previne respostas comportamentais inadequadas. Esse equilíbrio é sustentado pela integração funcional entre hipocampo (contexto), amígdala (valor aversivo) e córtex

pré-frontal (avaliação de incerteza), permitindo a formação de gradientes flexíveis de medo e maior eficiência adaptativa (ASOK; KANDEL; RAYMAN, 2018).

Do ponto de vista evolutivo, níveis moderados de generalização aumentam a aptidão dos animais, enquanto a generalização excessiva é mal-adaptativa e constitui uma dimensão sintomática central do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e de outras condições associadas a ansiedade exacerbada (AKIRAV; MAROUN, 2007; LISSEK, 2012). Por essa razão, o condicionamento do medo é amplamente utilizado como modelo experimental para os sintomas de evitação e revivência desse transtorno, uma vez que os gatilhos que desencadeiam tais respostas podem apresentar apenas semelhanças vagas com o evento traumático original, diferindo deste em aspectos como forma, contexto, valência emocional, odor, associações semânticas e outras dimensões perceptivas e cognitivas (SCHECHTMAN; LAUFER; PAZ, 2010; DUNSMOOR; PAZ, 2015). Dessa forma, estímulos perceptivelmente semelhantes ao estímulo condicionado evocam respostas mais intensas, enquanto estímulos progressivamente distintos induzem respostas condicionadas mais fracas, caracterizando um gradiente de generalização (POLLACK *et al.*, 2018).

Além disso, a intensidade do condicionamento é capaz de modular a dinâmica da consolidação sistêmica e o tempo de perda gradual da precisão da representação contextual da memória. Pedraza *et al.* (2016) mostraram que em comparação a treino fraco (quatro choques de 0,4 mA/1 s) de condicionamento ao contexto, o treino intenso (oito choques de 1,0 mA/1 s) acelerou, de forma paralela, a consolidação sistêmica e a generalização da memória. Os autores discutem que esses efeitos parecem ser mediados pela liberação de glicocorticoides e noradrenalina durante o treino, indicando que o nível de estresse regula a qualidade da memória: estresse moderado favorece memórias precisas, enquanto estresse elevado favorece memórias mais generalizadas. De forma semelhante, Corrêa *et al.* (2019) demonstraram que a intensidade do choque no CFC está positivamente associada à magnitude do congelamento e à taxa de generalização da memória ao longo do tempo. Treinos mais intensos (0,6 e 1,0 mA) induziram maior congelamento durante a aquisição e promoveram generalização mais precoce (2 dias), enquanto o treino de menor intensidade (0,3 mA) preservou maior especificidade contextual em intervalos mais tardios (14 e 28 dias).

Outra estratégia para prolongar a precisão da memória foi constatada por De Oliveira Alvares *et al.* (2012) que mostraram que a reativação periódica da memória (por 90 segundos no contexto condicionado, em três dias distintos entre o treino e o teste) − suficientes para induzir reconsolidação, mas não extinção (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008) − mantém a precisão da memória e sua dependência do hipocampo aos 28 dias após o CFC, período em que, tipicamente, a memória já se encontra generalizada e independente dessa estrutura para evocação (KIM; FANSELOW, 1992).

Em uma revisão narrativa, Gazarini, Stern e Bertoglio (2023) discutem as principais estratégias experimentais utilizadas nas últimas cinco décadas para modelar memórias aversivas com características semelhantes às observadas em transtornos relacionados ao trauma. Entre elas destacam-se a exposição prévia ao estresse, o aumento da intensidade do treinamento aversivo e manipulações farmacológicas capazes de reproduzir alterações neuroquímicas (e.g., nos sistemas de glicocorticoides, noradrenalina e endocanabinoides) e epigenéticas (e.g., acetilação de histonas e metilação do DNA) induzidas pelo trauma, as quais favorecem a formação de memórias mais fortes, generalizadas e menos suscetíveis à extinção e à interferência durante a reconsolidação. Esses efeitos são consistentes em diferentes tarefas comportamentais, espécies, linhagens e intervalos de retenção, tanto recentes quanto remotos (GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2023).

Apesar da consistência dos achados, os autores destacam a elevada heterogeneidade metodológica entre os estudos, bem como a avaliação pouco sistemática da especificidade da memória, fatores que dificultam a comparação entre os resultados e podem subestimar a ocorrência de generalização. Também ressaltam a escassez de estudos em fêmeas (BEERY; ZUCKER; REVIEWS, 2011), apesar da maior prevalência de TEPT em mulheres (MCGINTY *et al.*, 2021). Além disso, argumentam que memórias aversivas mais fortes tendem a ser mais resistentes à extinção e à interferência durante a reconsolidação, sugerindo que a eficácia de intervenções direcionadas à reconsolidação depende de fatores como a idade da memória, o contexto de reativação e o estado de labilidade do engrama (GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2023).

1.6 MÉTODOS DE MANIPULAÇÃO DA ATIVIDADE NEURAL

As técnicas modernas de manipulação neural, fundamentadas no uso de transgênese e vetores virais, como a optogenética e a quimiogenética, representam uma evolução em relação aos métodos tradicionais de lesão, oferecendo maior precisão espacial e temporal, além de reversibilidade (WIEGERT *et al.*, 2017). A optogenética utiliza proteínas sensíveis à luz (opsinas) para ativar ou inibir neurônios com alta resolução espacial e temporal, sendo ideal para investigar padrões específicos de atividade neural (LI *et al.*, 2025). No entanto, sua aplicação é limitada pela baixa penetração da luz no tecido cerebral, pela necessidade de fibras ópticas e pelo risco de aquecimento local (ROST *et al.*, 2022).

Por outro lado, a quimiogenética emprega receptores geneticamente modificados ativados por ligantes específicos (DREADDs, do *inglês designer receptors exclusively activated by designer drugs*), permitindo modular a atividade neuronal por horas após uma única administração sistêmica do ligante, geralmente o N-óxido de clozapina (CNO) (SHARMA; PIENAAR, 2018; CLAES; DE GROEF; MOONS, 2022). Embora apresente menor resolução temporal e espacial que a optogenética e possa produzir efeitos *off-target* devido à conversão do CNO em seu precursor clozapina pelo metabolismo hepático mediado pelo citocromo P450 – uma vez que a clozapina apresenta afinidade por diversos receptores endógenos (MAHLER; ASTON-JONES, 2018) –, essa técnica permite a manipulação simultânea de amplas regiões encefálicas sem a necessidade de dispositivos acoplados ao animal. Apesar dessas vantagens relativas, tanto optogenética quanto quimiogenética permanecem mais complexas que abordagens farmacológicas tradicionais devido à necessidade de manipulação genética, entrega viral direcionada e validação da especificidade celular.

Em contraste, os estudos de lesão produzem danos permanentes ao tecido encefálico, fornecendo evidências de que uma determinada região é necessária para o desempenho de uma função. No entanto, por serem irreversíveis, não permitem avaliar sua contribuição em diferentes momentos do comportamento e podem induzir reorganizações compensatórias nos circuitos neurais, dificultando a interpretação dos resultados (VAIDYA *et al.*, 2019). Ainda assim, os estudos com pacientes portadores de lesões encefálicas constituíram a base da neurociência cognitiva, incluindo trabalhos seminais, como aqueles realizados com o paciente H.M. (SCOVILLE;

MILNER, 1957), que demonstraram que a memória é composta por múltiplos sistemas com substratos neurais distintos. Essas descobertas impulsionaram décadas de pesquisas sobre a organização funcional da memória. Posteriormente, muitas das limitações dos estudos de lesão foram superadas pelo desenvolvimento de técnicas de inativação reversível, que preservam suas principais vantagens e permitem maior controle temporal da atividade neural.

Os métodos farmacológicos de inativação temporária e reversível permitem investigar o papel causal de regiões encefálicas na formação, consolidação e evocação da memória, com a vantagem de possibilitarem delineamentos experimentais intra-sujeitos (MARTIN; GHEZ, 1999; ALLEN *et al.*, 2008). A inativação pode ser realizada por dois mecanismos principais: (1) bloqueadores de canais de sódio, que impedem a geração e a condução de potenciais de ação em corpos celulares e axônios; e (2) agonistas ou antagonistas de neurotransmissores, que modulam a atividade neuronal em nível sináptico (MARTIN; GHEZ, 1999). Em ambos os casos, os fármacos são administrados localmente por meio de cânulas de infusão conectadas a microseringas acopladas a bombas de infusão (GALLO; IMAGING, 2007). O volume, a velocidade de infusão e a dose do fármaco devem ser cuidadosamente estabelecidos, sendo recomendada a utilização dos menores volumes e velocidades possíveis para minimizar o deslocamento do tecido e o trauma mecânico, enquanto a dose pode ser inicialmente baseada em valores descritos na literatura e posteriormente ajustada conforme os objetivos experimentais (MARTIN; GHEZ, 1999).

Entre os principais agentes utilizados estão os agonistas dos receptores $GABA_A$, como o muscimol, que promovem hiperpolarização neuronal e silenciamento local pelo aumento da condutância de cloreto através do canal (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; STERN *et al.*, 2013; HAUBRICH *et al.*, 2016; PEDRAZA *et al.*, 2016; CRESTANI *et al.*, 2018; MAREK; SUN; SAH, 2019; TINTORELLI *et al.*, 2020); os bloqueadores de canais de sódio dependentes de voltagem, como a lidocaína e a tetrodotoxina (TTX), que impedem a geração de potenciais de ação (CORCORAN; QUIRK, 2007; GOSHEN *et al.*, 2011); e os antagonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA, como o ácido D-2-amino-5-fosfonovalérico (APV) e 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), que bloqueiam seletivamente a transmissão sináptica excitatória (CAIN *et al.*, 1996; GOSHEN *et al.*, 2011;

LESBURGUÈRES *et al.*, 2011; CRESTANI; QUILLFELDT, 2016; CRESTANI *et al.*, 2018). Apesar de amplamente empregados, esses métodos não oferecem o mesmo controle temporal proporcionado pelas abordagens genéticas e podem afetar fibras de passagem (no caso da TTX) ou desencadear adaptações compensatórias na rede neural, aspectos que devem ser considerados na interpretação dos resultados (GALLO; IMAGING, 2007; GOSHEN *et al.*, 2011).

O muscimol é amplamente utilizado por mimetizar a ação do GABA (Figura 8), porém com efeito mais duradouro (12-24 horas pós-infusão), promovendo um silenciamento neuronal prolongado em comparação ao neurotransmissor endógeno (MARTIN; GHEZ, 1999; GALLO; IMAGING, 2007), sem afetar fibras de passagem. No entanto, assim como ocorre com outros fármacos, sua administração isolada não permite determinar com precisão a extensão e a distribuição espacial do tecido efetivamente atingido. Essa limitação pode ser minimizada pelo uso de traçadores radioativos, como o [^{3}H]muscimol, ou fluorescentes, como o conjugado muscimol BODIPY TMR-X, que permitem visualizar a área de difusão do fármaco, embora sua dispersão possa diferir daquela do muscimol livre devido ao maior peso molecular e à interação com componentes lipídicos do tecido encefálico (ALLEN *et al.*, 2008). Alternativamente, a extensão da inativação também pode ser estimada por meio de abordagens eletrofisiológicas ou metabólicas, que avaliam diretamente os efeitos funcionais da infusão sobre a atividade neuronal (MARTIN; GHEZ, 1999). De forma mais indireta, porém amplamente utilizada, o posicionamento das cânulas e a extensão da difusão da solução infundida podem ser inferidos por análise histológica, mediante a infusão de corante (e.g. azul de metileno) no mesmo volume utilizado para a administração do fármaco (STERN *et al.*, 2013; CRESTANI *et al.*, 2018; TINTORELLI *et al.*, 2020).

1.6.1 Aspectos metodológicos da inativação por muscimol

A eficácia da inativação por muscimol depende da dose, do volume infundido, da taxa de infusão e da estrutura-alvo. Edeline *et al.* (2002) investigaram a difusão do muscimol após infusões no núcleo basal magnocelular (0,1 - 0,4 µL) e no núcleo reticular do tálamo (0,05 - 0,1 µL), combinando registros eletrofisiológicos e análises autoradiográficas com [^{3}H]muscimol (1 µg/µL, 8,7 mM) injetado a uma taxa de 0,1 µL/min. Os autores destacam que tanto a concentração de muscimol quanto os

volumes de infusão empregados são compatíveis com aqueles adotados em diversos estudos da literatura (BENINGER *et al.*, 1992; NAGAHARA; BRIONI; MCGAUGH, 1992; NAGAHARA; MCGAUGH, 1992; HOLT; MAREN, 1999; TINTORELLI *et al.*, 2020), sendo 0,5 µL o volume mais frequentemente utilizado (EDELINE *et al.*, 2002), inclusive pelo nosso laboratório (PEDRAZA *et al.*, 2016; CRESTANI *et al.*, 2018).

(A) **(B)**

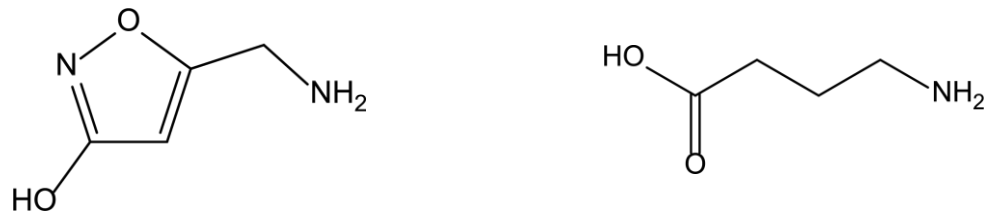

Figura 8 – Molécula de (A) muscimol e (B) GABA.

Registros eletrofisiológicos realizados a cada 5 minutos durante os 30 minutos anteriores e os 120 minutos posteriores à infusão de muscimol demonstraram que a atividade espontânea foi reduzida para menos de 20% do valor basal em apenas 2 minutos, permanecendo praticamente abolida a partir de 25 minutos após a infusão até o término do experimento. As análises autoradiográficas corroboraram esses achados, mostrando que, 15 minutos após a infusão de 0,05 µL, o muscimol já havia se difundido por cerca de 1,4 - 1,7 mm, enquanto após 60 minutos, ou com o aumento do volume para 0,1 µL, a difusão alcançava 1,7 - 2,7 mm. Além disso, análises por radioimagem de alta resolução indicaram que a difusão do muscimol podia atingir até aproximadamente 3,25 mm.

Utilizando autoradiografia com [^{3}H]muscimol e marcação da utilização de [^{14}C]glicose, Martin (1991) demonstrou que o muscimol (1 µg/µL; 0,25 µL/min) permanece relativamente restrito ao local de infusão, apresentando raio de difusão constante durante as primeiras duas horas, variando de aproximadamente 1,6 mm aos 10 minutos para 1,4 mm aos 30 minutos, com níveis detectáveis ainda presentes após 120 minutos. Embora a difusão do muscimol tenha permanecido circunscrita, sua ação funcional foi mais ampla, produzindo redução significativa da utilização local de glicose. Aos 10 minutos após a infusão, observou-se redução máxima de aproximadamente 42,7% na captação de glicose no centro da infusão, com diminuição progressiva do efeito até cerca de 0,8 - 1,0 mm de distância. Em tempos posteriores (60 e 120 minutos), a redução do metabolismo persistiu, porém com menor magnitude

(≈30%), indicando que os efeitos funcionais do muscimol se mantêm mesmo após a estabilização de sua difusão tecidual.

Experimentos controle com infusão de salina demonstraram reduções discretas da utilização de glicose (11 - 12,5%) restritas à região imediatamente adjacente ao trajeto da cânula (240 - 270 μm), confirmando que o hipometabolismo observado decorre predominantemente da ação farmacológica do muscimol, e não do trauma mecânico da infusão (MARTIN, 1991). Os autores propõem que a redução metabólica na região central resulta da inibição direta da atividade neuronal mediada pelo agonismo sobre receptores $GABA_A$, enquanto a diminuição observada nas áreas adjacentes reflete uma redução secundária da atividade sináptica em neurônios funcionalmente conectados. A persistência do muscimol no tecido é atribuída à sua elevada afinidade pelos receptores $GABA_A$, associada aos mecanismos de captação por neurônios e células da glia, que favorecem seu sequestro local e limitam sua difusão. Esses achados corroboram evidências comportamentais de que a inativação produzida pelo muscimol pode persistir por várias horas, chegando a 12 - 24 horas (HIKOSAKA; WURTZ, 1985; MARTIN; GHEZ, 1993), dependendo da dose administrada.

Em outro estudo de Martin e Ghez (1999) ao infundirem 1 μg/μL de [^{3}H]muscimol no córtex sensório-motor de ratos, observaram que o fármaco atingiu sua máxima difusão entre 10 e 20 minutos após a infusão, alcançando um raio de aproximadamente 1,5 a 2 mm e permanecendo detectável no tecido por até 2 horas. Dez minutos após a infusão de muscimol, os autores observaram uma redução de aproximadamente 50% na captação de glicose em uma região com raio de cerca de 1 mm ao redor do centro da infusão.

Para roedores, as doses utilizadas variam amplamente, desde dezenas de nanogramas até 2 μg por sítio de infusão (MISANE *et al.*, 2013), sendo concentrações de aproximadamente 1 μg/μL (considera-se 1 μL igual a 1 mm^3) frequentemente empregadas para promover inativação robusta (EDELINE *et al.*, 2002). A extensão da difusão é diretamente influenciada pela dose e pelo volume administrado (MARTIN; GHEZ, 1999; ALLEN *et al.*, 2008), embora barreiras anatômicas, como tratos de fibras mielinizadas, possam restringir essa distribuição (ALLEN *et al.*, 2008). Em testes comportamentais, os efeitos da infusão bilateral de muscimol na região CA1 do hipocampo dorsal tornam-se evidentes cerca de 15 minutos após a administração e

permanecem por pelo menos 6 horas, desaparecendo, em geral, entre 9 e 24 horas. Durante esse período, o fármaco compromete seletivamente a formação da memória de longo prazo para o medo contextual, caracterizando uma inativação reversível e sem evidências de toxicidade tecidual (MISANE *et al.*, 2013). Dessa forma, a escolha da dose e do volume deve ser cuidadosamente ajustada à dimensão da estrutura-alvo e à extensão de inativação desejada.

1.7 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL

A consolidação sistêmica é dependente das áreas neocorticais e o mPFC destaca-se como um possível núcleo integrador desse processo devido à sua ampla conectividade. Essa região recebe projeções tanto de áreas corticais sensoriais quanto de estruturas subcorticais envolvidas na formação da memória, como a formação hipocampal, a amígdala e o tálamo (DIXSAUT; GRAEFF, 2021), o que a posiciona como um elo central na consolidação das memórias (CHO; RENDALL; GRAY, 2017; DIXSAUT; GRAEFF, 2021).

O mPFC de roedores é composto por sub-regiões anatômica e funcionalmente distintas, incluindo o ACC, PLC, ILC e o córtex peduncular dorsal (DP), distribuídos nessa ordem ao longo do eixo dorsoventral (CAMPOS-CARDOSO *et al.*, 2024). Estas regiões fazem conexões recíprocas com os córtices sensoriais, motores e límbico, fazendo delas ideais para a integração e síntese de informações (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). O PLC, em particular, tem sido identificado como uma região crítica para a regulação das memórias de medo (MAREK; SUN; SAH, 2019).

Assim como as memórias contextuais dependem do hipocampo nas primeiras semanas após a aquisição (MARR, 1971; SQUIRE, 1992; NADEL; MOSCOVITCH, 1997; RUDY, 2008; SUTHERLAND; GIBB; KOLB, 2010; SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018), a amígdala também é uma estrutura essencial para o condicionamento aversivo (LEDOUX, 2000; ANGLADA-FIGUEROA; QUIRK, 2005; AKIRAV; MAROUN, 2007; KITAMURA *et al.*, 2017). Evidências sugerem que tanto o PLC quanto o ILC modulam suas influências por meio da amígdala, indicando uma interação funcional com o mPFC na coordenação das respostas de medo (SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010). Vidal-Gonzalez *et al.* (2006) demonstraram, por meio de microestimulação acoplada à apresentação do estímulo condicionado, que essas sub-regiões do mPFC exercem efeitos opostos sobre a expressão do medo. Enquanto a

estimulação do PLC aumentou o comportamento de congelamento e prejudicou a extinção, a estimulação do ILC reduziu o congelamento e facilitou a extinção. Em contraste, a estimulação do ACC não produziu efeitos comportamentais significativos.

Esses resultados sugerem que o PLC favorece a expressão do medo, possivelmente por meio de projeções excitatórias para a amígdala basal e/ou pela supressão da atividade do ILC. Por outro lado, o ILC parece inibir a expressão do medo ao recrutar interneurônios GABAérgicos na amígdala, reduzindo a atividade de saída do núcleo central da amígdala (CeA) (ROYER; MARTINA; PARÉ, 1999; QUIRK *et al.*, 2003; PARÉ; QUIRK; LEDOUX, 2004; VERTES, 2004). Reforçando essa intepretação, outros estudos demonstram que a estimulação do ILC inibe neurônios do CeA (QUIRK *et al.*, 2003) e aumenta a ativação (medida por c-Fos) em células intercaladas (ITC) (BERRETTA *et al.*, 2005). O padrão distinto de ativação do PLC e do ILC também se reflete no nível molecular. A expressão do RNA de *Arc* é maior no ILC de animais submetidos à extinção do medo, enquanto não difere do PLC durante a renovação do medo (ORSINI; YAN; MAREN, 2013). Em contraste, após o condicionamento do medo, tanto o PLC quanto o ILC apresentam aumento da expressão de c-Fos (HERRY; MONS, 2004).

Acredita-se que durante a expressão do medo, a informação do estímulo condicionado chega à amígdala basolateral (BLA) e é transmitida ao PLC. Além disso, o PLC também recebe parte dessas informações diretamente e envia projeções excitatórias de volta à amígdala, promovendo o recrutamento da CeA e, consequentemente, a intensificação da resposta de medo (Figura 9, traços verdes) (QUIRK *et al.*, 2003). Estudos mostram que neurônios do PLC exibem aumento sustentado da atividade em resposta ao tom 24 h após o condicionamento, sendo essa ativação proporcional à magnitude das respostas de medo (DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015). A participação do circuito BLA-PLC na expressão do medo condicionado é evidenciada pelo fato de que a inativação farmacológica da BLA reduz tanto a atividade espontânea quanto as respostas evocadas pelo tom em neurônios de projeção do PLC (SOTRES-BAYON *et al.*, 2012). Em consonância com esses achados, estudos de rastreamento retrógrado e optogenéticos demonstraram a existência de neurônios na amígdala basal que se projetam seletivamente para o PLC e que o silenciamento dessa via prejudica a evocação da memória de medo (SENN *et al.*, 2014). De forma recíproca, a inibição

das projeções do PLC para a BLA também compromete a evocação, evidenciando uma comunicação bidirecional entre essas estruturas e um controle *top-down* do PLC sobre a atividade amigdalar (DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015; DO MONTE *et al.*, 2016).

Por outro lado, após a extinção, o estímulo condicionado continua ativando a BLA, mas passa a recrutar o ILC, cujas projeções inibitórias para a amígdala, mediadas principalmente pelas ITC, reduzem a atividade da CeA e, consequentemente, a expressão do medo (Figura 9, traços azuis) (SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010). As projeções da CeA são responsáveis por mediar as respostas de luta ou fuga, incluindo comportamentos como congelamento ou evasão, bem como o aumento da frequência cardíaca e da liberação de adrenalina (MAREK; SUN; SAH, 2019). Embora esse circuito seja bem estabelecido, novas evidências têm refinado e ampliado sua compreensão, ao indicar uma reorganização das projeções envolvidas na evocação da memória, na qual a BLA deixa de exercer um papel essencial, enquanto o núcleo paraventricular do tálamo (PVT) passa a contribuir para esse processo (DO MONTE *et al.*, 2016; QUIÑONES-LARACUENTE; VEGA-MEDINA; QUIRK, 2021). Para mais detalhes ver seção 6, Figura 28.

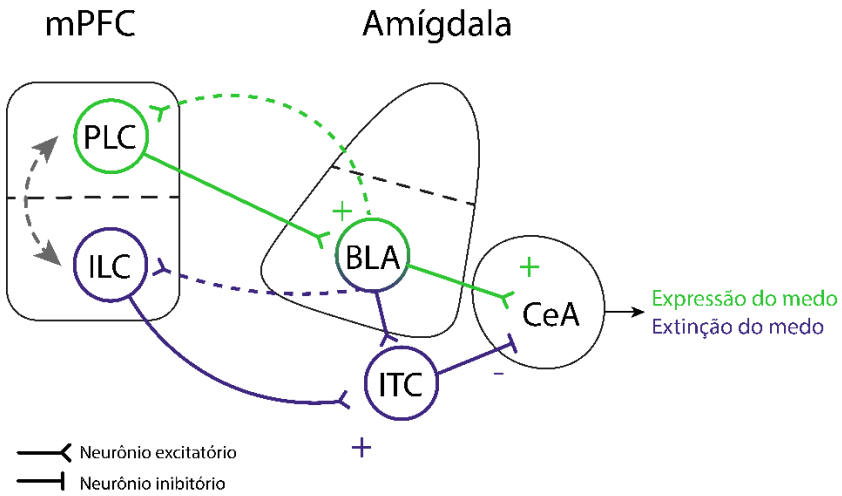

Figura 9 – Conexões anatômicas relevantes para a expressão e extinção do medo. BLA: amígdala basolateral; CeA: amígdala central; ILC: córtex infralímbico; ITC: células intercaladas; mPFC: córtex pré-frontal medial; PLC: córtex pré-límbico. Figura adaptada de Marek *et al.* (2013) e Sotres-bayon e Quirk (2010), com correções de Mukherjee e Caroni (2018).

Dentro da amígdala basal, neurônios envolvidos tanto na expressão do medo quanto na extinção projetam-se para o mPFC (HERRY *et al.*, 2008), embora ainda não esteja claro se essas projeções apresentam organização funcional ou topográfica

distinta entre o PLC e o ILC. Consideradas em conjunto, essas evidências de conectividade contribuem para uma compreensão mais integrada de como PLC e ILC combinam informações contextuais, saliência emocional e outros aferentes para modular, de forma coordenada, a expressão e a extinção do medo. Embora tradicionalmente associados a funções opostas, achados anatômicos (VERTES, 2004; HOOVER; VERTES, 2007), eletrofisiológicas (VAN AERDE; HEISTEK; MANSVELDER, 2008) e optogenéticos (MAREK *et al.*, 2018) demonstram conexões funcionais robustas entre essas duas regiões, sugerindo uma sobreposição parcial de seus papéis na regulação do comportamento relacionado ao medo.

Mukherjee e Caroni (2018) demonstraram que o PLC e o ILC apresentam conectividade recíproca entre as camadas 5 e 6, por meio da qual exercem funções complementares, e possivelmente antagônicas, na flexibilidade da aprendizagem. Utilizando uma tarefa de formação de conjunto atencional (*attentional set-shifting task*), os autores avaliaram a capacidade dos animais de aprender uma regra, mantê-la e modificá-la quando ela deixava de prever a recompensa. Os resultados mostraram que a atividade do PLC favorece o uso de associações previamente aprendidas e ainda relevantes, enquanto a atividade do ILC é necessária para abandonar estratégias que se tornaram inadequadas e aprender novas associações. Em contrapartida, nenhuma dessas regiões foi necessária para a simples evocação de associações já estabelecidas.

Além disso, os autores demonstraram que a comunicação entre o ILC e PLC durante uma janela crítica de aproximadamente 12 a 14 horas após a aprendizagem é necessária para que os animais consigam, posteriormente, abandonar uma estratégia antiga e aprender uma nova. Especificamente, apenas a atividade da projeção ILC→PLC se mostrou essencial para essa aprendizagem flexível, uma vez que sua inibição impediu a aquisição de novas estratégias. Por outro lado, a ativação dessa projeção produziu efeitos semelhantes aos observados após o silenciamento do PLC – isso é, menos perseverança (função do PLC) e mais flexibilidade (função do ILC) – sugerindo que a entrada do ILC reduz a influência do PLC sobre o comportamento. Em conjunto, esses resultados indicam que o PLC tende a favorecer a manutenção de associações previamente aprendidas, enquanto o ILC atua para flexibilizar o comportamento, permitindo a atualização dessas associações quando elas deixam de ser adaptativas (MUKHERJEE; CARONI, 2018).

Complementando esse modelo funcional, Luft *et al.* (2024) utilizou o procedimento Daun02 em ratos c-Fos-lacZ para investigar se a reativação da memória promove a formação de um novo engrama ou a modificação do traço original na BLA e no ILC. Os autores demonstraram que o engrama da BLA é fundamental para a memória de medo. Em contraste, a extinção depende da formação de uma nova memória mediada pelo ILC, cuja interrupção isolada é suficiente para comprometer a expressão da extinção.

Em um estudo de Campos-Cardoso *et al.* (2024), a comparação entre animais expostos apenas ao tom, submetidos ao condicionamento ao tom ou à extinção não revelou diferenças na densidade de células c-Fos$^+$ no ACC ou no PLC. Em contraste, o grupo submetido à extinção apresentou maior densidade de células c-Fos$^+$ no ILC. No DP, entretanto, foi observado um padrão oposto ao esperado com base na hipótese de organização funcional dorsoventral do mPFC, com menor densidade de células c-Fos$^+$ após a extinção em comparação ao condicionamento. Os autores destacam, ainda, que outros estudos atribuíram ao DP um papel na extinção (BOTTERILL *et al.*, 2024), em consonância com a hipótese de organização dorsoventral do mPFC. Essas divergências reforçam a complexidade funcional dessa região e dificultam a atribuição de papéis rígidos às suas sub-regiões. A heterogeneidade das populações neuronais e a plasticidade dos circuitos podem resultar em diferentes padrões de recrutamento conforme a tarefa e a manipulação experimental, contribuindo para as inconsistências observadas na literatura.

1.7.1 Participação do mPFC na consolidação de memórias aversivas

Como mencionado, a adaptação a situações ameaçadoras depende da capacidade de gerar respostas de medo, que podem ser inatas ou adquiridas pela experiência. Esse processo é sustentado por circuitos neurais conservados entre mamíferos, nos quais a amígdala ocupa papel central ao integrar estímulos condicionados e incondicionados para formar memórias associativas. Lesões nessa estrutura comprometem tanto a aquisição (GOOSENS; MAREN, 2001) quanto a expressão do medo aprendido (ANGLADA-FIGUEROA; QUIRK, 2005) e inato (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972).

O PLC, por sua vez, mantém projeções robustas para a amígdala basal (VERTES, 2004) e apresenta plasticidade neuronal induzida pelo condicionamento,

indicando sua participação na modulação das respostas de medo. Entretanto, Corcoran e Quirk (2007) demonstraram que a atividade do PLC é essencial para a expressão de medos aprendidos, mas não de medos inatos. A inativação do PLC com tetrodotoxina, um bloqueador de canais de sódio, reduziu o congelamento diante de estímulos sonoros ou contextuais previamente associados ao choque, sem afetar a resposta a um predador, e não interferiu na aquisição das memórias de medo quando realizada antes do condicionamento, indicando seu papel específico na expressão do medo aprendido (CORCORAN; QUIRK, 2007).

Um extenso corpo de estudo tem demonstrado que os circuitos neurais envolvidos na evocação da memória do medo sofrem uma reorganização dependente do tempo. Assim, embora a manifestação comportamental do medo permaneça relativamente constante, os circuitos que a sustentam se modificam com o passar do tempo (DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015). Nesse contexto, diversos estudos têm questionado o modelo *standard* de consolidação, o qual o mPFC estaria envolvido apenas na memória remota e a memória recente dependeria predominantemente do hipocampo, ao demonstrar que o mPFC também participa da codificação e da evocação de memórias recentes (CHOI *et al.*, 2010; ZELIKOWSKY *et al.*, 2013; DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015; RAJASETHUPATHY *et al.*, 2015; CUMMINGS; CLEM, 2020). Blum, Hebert e Dash (2006) argumentam que a dependência do mPFC para memórias recentes e/ou remotas parece variar conforme a tarefa exigir ou não o recrutamento do mPFC, seja já durante o treino, favorecendo o armazenamento da memória, ou posteriormente, ao longo da consolidação sistêmica. Em seu trabalho Blum e colegas, observaram que a inativação do mPFC com muscimol, aos 2 ou 30 dias após o condicionamento de medo com intervalo (*trace fear*), prejudicou igualmente a evocação da memória de medo, sem afetar o medo contextual dependente do hipocampo. Em contrapartida, outros estudos utilizando tarefas diferentes mostraram que a participação do mPFC emerge principalmente em fases tardias da memória. Em tarefas como discriminação espacial (MAVIEL *et al.*, 2004) e condicionamento de piscada do olho (*trace eyeblink conditioning*) (TAKEHARA; KAWAHARA; KIRINO, 2003), observou-se um aumento da expressão de marcadores de atividade neuronal no mPFC apenas em testes remotos (≈30 dias), mas não em testes recentes (≈1 dia). De forma consistente, a inativação temporária ou a lesão do mPFC nesses estudos prejudicou apenas as

memórias remotas, enquanto as recentes permaneceram preservadas, indicando que, nesses paradigmas, o mPFC não foi necessário para a evocação inicial da memória.

Em um trabalho de Haubrich *et al.* (2016), a infusão de muscimol no hipocampo prejudicou a evocação da memória até 35 dias após o condicionamento aversivo ao contexto, enquanto o ACC tornou-se sensível à inativação apenas a partir de 45 dias. Entretanto, quando, entre o treino e o teste, os animais foram submetidos a tarefas adicionais, incluindo o reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris, ambas dependentes do hipocampo (LISSNER *et al.*, 2021; OTHMAN; HASSAN; CHE HAS, 2022), essa transição ocorreu mais precocemente: o efeito do muscimol no hipocampo deixou de ser observado aos 20 dias, exatamente quando a inativação do ACC passou a comprometer o desempenho. Esses achados indicam que a aprendizagem de novas informações acelera a reorganização sistêmica das memórias entre o hipocampo e regiões corticais (HAUBRICH *et al.*, 2016).

Acredita-se que esse fenômeno seja explicado devido à dimensão finita e à limitada quantidade de neurônios hipocampais, cuja função é indispensável para a formação de novas memórias e, para isso, necessita, liberar sinapses anteriormente envolvidas no processamento de experiências prévias, para disponibilizá-las ao armazenamento das novas memórias (NEISSER; WINOGRAD, 1988; QUILLFELDT, 2019). Curiosamente, as células de engrama no mPFC parecem permanecer funcionalmente silenciosas até que a memória esteja plenamente consolidada, embora sejam recrutadas já nas fases iniciais da aprendizagem (KITAMURA *et al.*, 2017; DENARDO *et al.*, 2019) e mantenham, desde então, a capacidade de desencadear a evocação da memória quando artificialmente ativadas (DIXSAUT; GRÄFF, 2022).

Quanto à participação específica do PLC, os estudos divergem quanto ao seu perfil temporal de envolvimento na consolidação sistêmica e na evocação de memórias recentes e remotas. Entretanto, evidências mais recentes têm demonstrado que essa região contribui para ambos os estágios da memória por meio de uma reorganização dinâmica de subpopulações neuronais, cujas projeções passam a exercer maior ou menor influência ao longo do tempo. Por exemplo, Do-Monte; Quiñones-Laracuente e Quirk (2015), demonstraram que a evocação da memória de medo em fases tardias ativa preferencialmente neurônios do PLC que se projetam para o PVT. O silenciamento optogenético das projeções do PLC para essa região

talâmica prejudica a evocação apenas em momentos tardios, enquanto a inibição das projeções PLC-BLA afeta exclusivamente a evocação em tempos iniciais, evidenciando uma reorganização dependente do tempo dos circuitos que sustentam a memória. Os autores ainda destacam que a evocação da memória aversiva poderia recrutar a via PLC-PVT-CeA, integrando o medo a respostas adaptativas, como o estresse, e fortalecendo sua expressão (DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015). Alterações nesse rearranjo temporal possivelmente contribuem para respostas de medo exacerbadas em transtornos de ansiedade. Para uma discussão mais completa sobre esse assunto, ver seção 6.

1.7.2 Atividade do mPFC no reconhecimento contextual e localização espacial

Evidências indicam que o mPFC contribui para o processamento contextual e para a expressão do medo, codificando informações espaciais relevantes ao contexto (HOK *et al.*, 2005). Kim *et al.* (2013) demonstraram que o PLC é importante para a expressão de medo dependente de contexto em um paradigma de discriminação contextual de medo condicionado a tom, no qual o estímulo sonoro é pareado com choque apenas em um contexto específico, mas não em outros. Foi observado que lesão bilateral no PLC após o treinamento interrompe a expressão diferencial do medo condicionado porque o PLC não é essencial para a discriminação contextual em si – função predominantemente dependente do hipocampo (MAREN; HOBIN, 2007) –, mas para o uso dessa informação contextual na modulação da resposta de medo ao estímulo condicionado. Assim, mesmo com a memória dos contextos preservada, a ausência do PLC compromete o controle contextual da expressão do medo, impedindo que a resposta ao tom seja ajustada de acordo com o ambiente, sem afetar a capacidade do animal de distinguir entre os contextos a qual é mediada pelo hipocampo e amígdala central (LEDOUX, 2000; MAREN; HOBIN, 2007).

De acordo com essa visão, gravações unitárias de neurônios no PLC mostram elevação significativa de disparos durante o tom especificamente no contexto condicionado, correlacionando com maior *freezing* nessa condição em relação a contextos seguros (KIM *et al.*, 2013). Porém, a discriminação fina entre contextos não é autônoma no PLC e dependem de *inputs* contextuais prévios (TWINING *et al.*, 2020) para modular seletivamente sua excitabilidade. Assim, o PLC amplifica a expressão de medo quando "ameaça" é sinalizada, mas não codifica sozinho a representação

contextual completa, que requer hipocampo/amígdala (ZELIKOWSKY *et al.*, 2014). Esses achados posicionam o PLC como integrador essencial de informações contextuais para a expressão seletiva de medo.

Além disso, o mPFC, como um todo, parece ser um componente importante para a rede que suporta a memória de localização de objetos, particularmente para tarefas que exigem a integração da identidade do objeto e do contexto espacial (VIEIRA; KORZUS, 2015). Evidências demonstram que essa região é necessária para a codificação e evocação a longo-prazo de associações entre objetos e sua localização. A perturbação de mecanismos moleculares (por exemplo, acetilação de histonas) no mPFC, compromete esse tipo de memória (VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006), indicando seu papel para a consolidação da memória espacial, para além do papel tradicionalmente atribuído ao hipocampo. Corroborando essa ideia, estudos de lesão e inativação mostram que o PLC está envolvido em tarefas que exigem a integração de informações espaciais e de objetos, como as tarefas de associação *object-in-place* (BARKER *et al.*, 2007).

Somado a isso, a atividade do mPFC tem sido associada à aquisição de tarefas que exigem a manutenção de informações ao longo do tempo. Dados de Santos *et al.* (2017) sugerem que o condicionamento contextual depende da manutenção da representação do contexto, um processo dependente do mPFC. Enquanto o hipocampo codifica representações espaciais do ambiente (ver seção 5.1), funcionando como um "mapa cognitivo" (O'KEEFE; DOSTROVSKY, 1971), o mPFC contribui para a integração e o uso flexível dessas informações. Assim, tarefas de localização de objetos dependem não apenas da codificação espacial pelo hipocampo, mas também da manutenção e atualização das relações entre objetos e suas posições, processos nos quais o mPFC parece desempenhar um papel modulador.

1.7.3 Para além do modelo hipocampo-ACC: em busca do papel do PLC na memória remota

Como mencionado anteriormente, a descrição da amnésia retrógrada com gradiente temporal por Ribot (2005) e, posteriormente, o estudo do paciente H.M. forneceram evidências fundamentais para a compreensão da consolidação sistêmica da memória. Impulsionados por essa perspectiva, diversos estudos ao longo do último

século buscaram identificar quais áreas corticais sustentariam a evocação de memórias remotas. Nesse contexto, o ACC emergiu como uma das regiões de maior interesse devido a evidências de seu recrutamento durante a evocação de memórias remotas e do prejuízo dessas memórias após sua inibição.

Entre os trabalhos mais influentes nesta área, podemos citar o de Frankland *et al.* (2004), que demonstrou que a evocação recente da memória é acompanhada por aumento da expressão de proteínas codificadas por IEGs, Zif268 e c-Fos, na região CA1 do hipocampo, enquanto a evocação remota está associada ao aumento seletivo desses marcadores no ACC. Consistente com esse achado, camundongos *α-CaMKII*$^{+/-}$, que apresentam déficits de memória remota, exibiram redução do congelamento e ausência desse aumento de atividade no ACC após 36 dias (FRANKLAND *et al.*, 2001). Estudos subsequentes reproduziram resultados semelhantes, reforçando a interpretação de que o ACC desempenha papel causal na evocação de memórias remotas (WEIBLE, 2013; EINARSSON; PORS; NADER, 2015).

No entanto, além de seu envolvimento na aprendizagem associativa, o ACC tem sido implicado em uma ampla gama de processos cognitivos, incluindo atenção (TOTAH *et al.*, 2009), bem como processos relacionados às funções executivas (especialmente à memória de trabalho) e à tomada de decisão (LENARTOWICZ; MCINTOSH, 2005), evidenciando que uma mesma região pode contribuir para múltiplas funções comportamentais. Ademais, embora frequentemente tratado como uma estrutura unitária, o ACC constitui uma região neuroanatômica e funcionalmente heterogênea, cujas sub-regiões apresentam padrões distintos de conectividade e especialização funcional (WEIBLE, 2013). Por exemplo, sua porção rostral apresenta conexões mais estreitas com o PLC e ILC estando associada principalmente a processos “afetivos”, enquanto sua porção dorsal está mais relacionada ao controle motor (JONES; GROENEWEGEN; WITTER, 2005; WEIBLE, 2013).

Diante da diversidade de funções que uma região pode ter e considerando que a consolidação sistêmica ocorre em uma rede cortical distribuída, surge uma questão: como uma única estrutura poderia ser responsável pela evocação remota de informações aprendidas? A evocação remota envolve, na verdade, a reativação coordenada de múltiplos nós dessa rede, cada um fornecendo diferentes elementos da memória completa. As evidências indicam que o armazenamento de longo prazo

ocorre de forma distribuída e "específica do domínio": diferentes córtices sensoriais contêm fragmentos de características associados a modalidades específicas da experiência passada (DAMASIO, 1989). Portanto, a visão que atribui a uma única região o papel central na memória remota cria um ponto cego, obscurecendo a compreensão de uma rede altamente distribuída de estruturas.

Entretanto, se a consolidação sistêmica depende da interação entre múltiplas regiões corticais, por que a inibição do ACC é frequentemente suficiente para comprometer a evocação de memórias remotas? Uma possível explicação é que a relevância dessa estrutura não decorra de sua atuação isolada, mas de sua posição estratégica dentro da rede cortical de memória. Os neurônios piramidais do ACC apresentam extensa arborização dendrítica e maior tamanho somático, características que favorecem a integração de um grande número de aferências convergentes (WEIBLE, 2013). Além disso, o ACC mantém amplas conexões diretas e indiretas com regiões sensoriais e motoras, bem como com estruturas de ordem superior envolvidas no controle *top-down (*RAJASETHUPATHY *et al., 2015)*. Dessa forma, mais do que atuar como um local exclusivo de armazenamento mnêmico, o ACC parece estar idealmente posicionado para integrar informações distribuídas e coordenar a evocação de experiências passadas.

Mas o que dizer das demais regiões corticais envolvidas nos diferentes aspectos da memória? Entre essas regiões, o córtex entorrinal atua como uma importante interface entre o hipocampo e o neocórtex, favorecendo a formação de novas associações (TAKEHARA-NISHIUCHI, 2014). Os córtices perirrinal e pós-rinal (parahipocampal em primatas), por sua vez, contribuem para o processamento de informações relacionadas ao reconhecimento de objetos, à detecção de novidade e ao contexto espacial (KINNAVANE *et al.*, 2016). De forma semelhante, o córtex retrosplenial, fortemente conectado ao hipocampo dorsal e às regiões parahipocampais, tem sido implicado tanto na evocação de memórias recentes quanto remotas (CORCORAN *et al.*, 2011). O córtex parietal também participa dessa rede, contribuindo para processos atencionais, navegação espacial e evocação de memórias espaciais (OLSEN *et al.*, 2017).

Além disso, conforme discutido anteriormente, o PLC e ILC ilustram como regiões anatomicamente próximas podem exercer funções distintas na expressão de uma mesma memória (VERTES, 2004). Essa especialização funcional também foi

evidenciada por Stern *et al.* (2013), que demonstraram que a inativação temporária do PLC com muscimol, imediatamente após a reexposição ao contexto condicionado, prejudica a reconsolidação de memórias de medo contextual recentes (1 dia) e remotas (7 e 21 dias), reduzindo de forma persistente o comportamento de congelamento em testes subsequentes. Em contraste, a inativação do ILC não produziu alterações comportamentais, indicando uma participação específica do PLC na reconsolidação de memórias aversivas. Corroborando esse achado, a expressão de *Zif268/Egr1*, um IEG associado à reconsolidação da memória, aumentou no PLC e no ACC, mas não no ILC, após a reexposição do rato ao contexto condicionado. Para excluir a possibilidade de que a redução do congelamento refletisse facilitação da extinção ou déficits na evocação e/ou expressão do medo, em vez de bloqueio da reconsolidação, os autores inativaram o PLC imediatamente após a reativação da memória e, em seguida, avaliaram a “reinstalação” da resposta de medo por meio da reapresentação do estímulo incondicionado após uma sessão de extinção. Como a resposta de medo não foi restabelecida, os autores concluíram que a redução do congelamento decorreu, de fato, do bloqueio da reconsolidação.

Funcionalmente, o envolvimento do ACC e do PLC na promoção do medo e do ILC em sua supressão levou à proposição de uma arquitetura funcional do mPFC organizada ao longo do eixo dorsoventral. No entanto, estudos mais recentes indicam que essa divisão de funções pode ser mais complexa do que inicialmente proposto, uma vez que a atividade neuronal em algumas sub-regiões do mPFC não ocorre de maneira uniforme, mas apresenta padrões específicos entre as diferentes camadas corticais (CAMPOS-CARDOSO *et al.*, 2024). Essa heterogeneidade pode estar relacionada à complexa organização das aferências e eferências ao longo das camadas do mPFC.

Em vista dessas perspectivas, fica claro que compreender a dinâmica da memória exige olhar além de seus protagonistas tradicionais. Se o ACC representou, por décadas, a principal janela para a compreensão da Consolidação sistêmica, o avanço do campo revela que outras regiões também participam dessa orquestra neural. O presente trabalho integra um esforço mais amplo do laboratório para mapear os perfis temporais de recrutamento de diferentes áreas corticais e sua relação com a precisão e a generalização das memórias evocadas. Entre elas, o PLC emerge como uma peça particularmente intrigante, situado na tênue interface que separa a

evocação mnêmica da expressão do medo, cuja participação na reorganização dos engramas ao longo do tempo ainda permanece em grande parte desconhecida.

2. HIPÓTESE

O presente projeto partiu da hipótese de que a consolidação sistêmica no PLC deveria seguir a mesma dinâmica temporal de outras regiões corticais, a exemplo do ACC, previamente caracterizadas em vários laboratórios, inclusive no nosso, por meio do paradigma do condicionamento aversivo ao contexto mediante a inibição farmacológica pré-teste com muscimol em diferentes intervalos treino-teste. Nesse sentido, espera-se que, ao longo de semanas, o controle da evocação da memória deixe de depender tanto do hipocampo e passe a ser controlado por regiões neocorticais: neste trabalho queremos saber se o PLC, que também é parte do mPFC, funciona como seu vizinho, o ACC. Uma vez que a corticalização prevista pelo modelo da consolidação sistêmica implica também em mudanças qualitativas na memória expressa, os testes de evocação são realizados em dois contextos distintos, o condicionado e um outro, alternativo, para avaliar a capacidade de discriminação.

Uma vez que muitas regiões encefálicas participam de mais de uma função, como, por exemplo, o hipocampo, é possível que uma área-alvo neocortical esteja, de fato, envolvida em memória e/ou outra função cognitiva. Nossa hipótese é a de que o PLC participa da evocação de memórias consolidadas sistemicamente, mas, conforme o tipo de resultado encontrado, pode ser necessário avaliar essa outra função separadamente. No caso do PLC, essa possibilidade é plausível de ser antecipada, dado seu importante envolvimento como mediador da expressão da resposta de medo, através de suas conexões com a amígdala (VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010; QUIÑONES-LARACUENTE; VEGA-MEDINA; QUIRK, 2021). No entanto, não é possível estabelecer *a priori* se essa região participa de uma ou de ambas as funções concomitantemente. Ainda assim, essa preocupação se justifica, uma vez que, em nosso paradigma comportamental – o CFC – o medo expresso no teste é exatamente o fator utilizado para quantificar a expressão da memória. Além disso, para interpretar os achados, independentemente dos resultados obtidos, quantificamos a expressão de algumas proteínas marcadoras de atividade neuronal, tanto no PLC, quanto no ACC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil temporal da participação do PLC no processo da consolidação sistêmica de memórias contextuais aversivas de longo prazo, avaliando sua evocação recente (2 dias após o treino) e remota (28 ou 45 dias). Além da expressão do medo, será avaliada a precisão contextual ao longo do tempo (generalização da memória). Os encéfalos dos animais serão, então, dissecados para avaliar a expressão, através da técnica de *western blot*, de duas proteínas codificadas por IEGs – c-Fos e ARC – tanto no PLC, quanto no ACC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) **Estudar o efeito do muscimol infundido pré-teste, bilateralmente no PLC, em ratos treinados na tarefa do medo condicionado ao contexto, e testados em diferentes contextos (A, do condicionamento, ou B, alternativo) nos intervalos de 2, 28 ou 45 dias pós-treino;**

b) **para compreender o resultado de (a), independentemente do desfecho observado, avaliar também, o efeito do muscimol infundido pré-teste, bilateralmente no PLC, em ratos treinados na tarefa não-aversiva de localização de objetos;**

c) **avaliar [c.1] a expressão das proteínas c-Fos e ARC, codificadas por IEGs, no PLC e ACC de animais treinados na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto e testados nos diferentes tempos, bem como [c.2] a correlação entre essas e as respectivas respostas comportamentais;**

d) **avaliar possíveis efeitos comportamentais espúrios decorrentes da cirurgia estereotáxica da canulação do PLC em duas condições: [d.1] 15° (efeito exploratório) e [d.2] 0° (expressão do medo).**

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, adultos, com idade igual ou superior a 60 dias (250 – 310 g) produzidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e mantidos no Biotério do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC) no Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências (IB). Os animais foram acondicionados em grupos de 4 por gaiolas de *plexiglass*, com dimensões 41 x 34 x 16 cm, equipadas com grade alta (5,0 cm acima da borda), e assoalho de maravalha, trocada a cada 2-3 dias. O macroambiente era mantido climatizado, com temperatura entre 22-26°C e umidade constante entre 40 e 60%. A instalação operava em ciclo claro-escuro de 12h, com luzes acesas das 7h às 19h, período durante o qual os experimentos eram conduzidos.

Após o transporte dos animais do CREAL ao IB, era permitido a eles uma semana de aclimatação ao novo ambiente antes de serem submetidos aos protocolos experimentais. Durante essa semana, os ratos que passaram pelo experimento de condicionamento aversivo ao contexto (seção 4.3.1) não foram manipulados pelo pesquisador, sendo uma prática estipulada como padrão no laboratório (LOTZ *et al.*, 2025). Entretanto, os ratos que passaram pelo teste de localização de objetos (seção 4.3.2) e de campo aberto (seção 4.3.3) foram manipulados diariamente durante 5 minutos pelos pesquisadores (BARKER *et al.*, 2007; NELSON *et al.*, 2011). Todas as manipulações foram realizadas com o auxílio de um tecido de flanela laranja, 100% algodão.

Após o período de aclimatação, os animais de cada caixa eram numerados de 1 a 4 através da marcação de suas caudas com marcador permanente. Foi permitido 40-60 minutos de aclimatação do animal a sala de experimentação, ou em uma antessala quando os procedimentos envolviam cirurgia e eutanásia. Todos os experimentos foram realizados após aprovação prévia do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS sob número 45.177.

4.1.1 Cálculo amostral

Foram utilizados 250 animais no total. O cálculo amostral necessário para garantir a confiabilidade dos resultados foi realizado no software G*Power, versão 3.1.9.7 (FAUL *et al.*, 2007; FAUL *et al.*, 2009). Com base nos parâmetros adotados poder estatístico (1−β) de 0,80, nível de significância (α) de 0,05 e tamanho de efeito estimado de 0,45 (elevado) estimou-se a necessidade de aproximadamente 10 animais por grupo, valor consistente com estudos anteriores conduzidos pelo LPBNC e por outros laboratórios (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; GENRO *et al.*, 2012; CRESTANI *et al.*, 2022).

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICOS

Os animais foram pesados e submetidos a anestesia geral por meio da administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina 10%, (*Cetamin* fabricação Syntec) associado ao cloridrato de xilazina 2% (*Xilazin* de fabricação Syntec), nas doses de 140 mg/Kg e 12 mg/Kg, respectivamente. Após conferida a ausência de reflexo pelo pinçamento da pata, os ratos eram cuidadosamente posicionados no aparelho estereotáxico (fabricação David Kopf, modelo 1404) e presos a ele através de barras auriculares. Os pelos da cabeça eram removidos e a superfície esterilizada com álcool iodado (marca Dinâmica). O escalpo era cortado para exposição do crânio e a limpeza era realizada pela aplicação de peróxido de hidrogênio 3% (fabricação NEON). O braço do estereotáxico era colocado sobre o bregma, para a medida das coordenadas anteroposteriores (A/P), laterolateral (L/L) e dorsoventral (D/V) direcionadas ao PLC, seguindo o Atlas de Paxinos e Watson (2006): +3,2 mm A/P, ±0,5 mm L/L, -3,7 mm D/V, com a barra do incisivo fixada em -0,33 cm. No entanto, para desviar do seio venoso medial, e evitar o risco de sangramento e entupimento das cânulas, a inserção da cânula (calibre 27) foi realizada em um ângulo de 15°, utilizando coordenadas ajustadas: +3,2 mm A/P, ±1,5 mm L/L em relação ao bregma e -2,8 mm D/V relativo à superfície do crânio (Figura 10).

Com uma broca odontológica, foi realizada a craniotomia bilateral nos locais correspondentes às coordenadas A/P e L/L da estrutura-alvo. Cânulas de aço inoxidável, fabricada a partir de uma agulha *gauge* 27 (fabricação Medix), eram fixadas à torre móvel do estereotáxico e cuidadosamente introduzidas em ângulo de 15° pelos orifícios feitos na calota craniana, sendo deslocadas para baixo, lentamente,

até alcançar a coordenada D/V definida, onde a ponta da cânula terminaria posicionada 1 mm acima do alvo designado. Um parafuso (2,35 mm de diâmetro de cabeça, 5,90 mm de comprimento total e 1,45 mm de diâmetro da base (rosca)) foi posicionado atrás do bregma para ajudar na fixação de uma espécie de "capacete" de resina acrílica autopolimerizável dentária (Jet pó marca Clássico) usado para manter as cânulas na posição desejada (Figura 11). Cada procedimento cirúrgico teve duração média de aproximadamente 1h 30 minutos, incluindo a indução e manutenção da anestesia. O tempo médio para recuperação da anestesia e despertar completo dos animais foi de cerca de 3 h após o término da cirurgia.

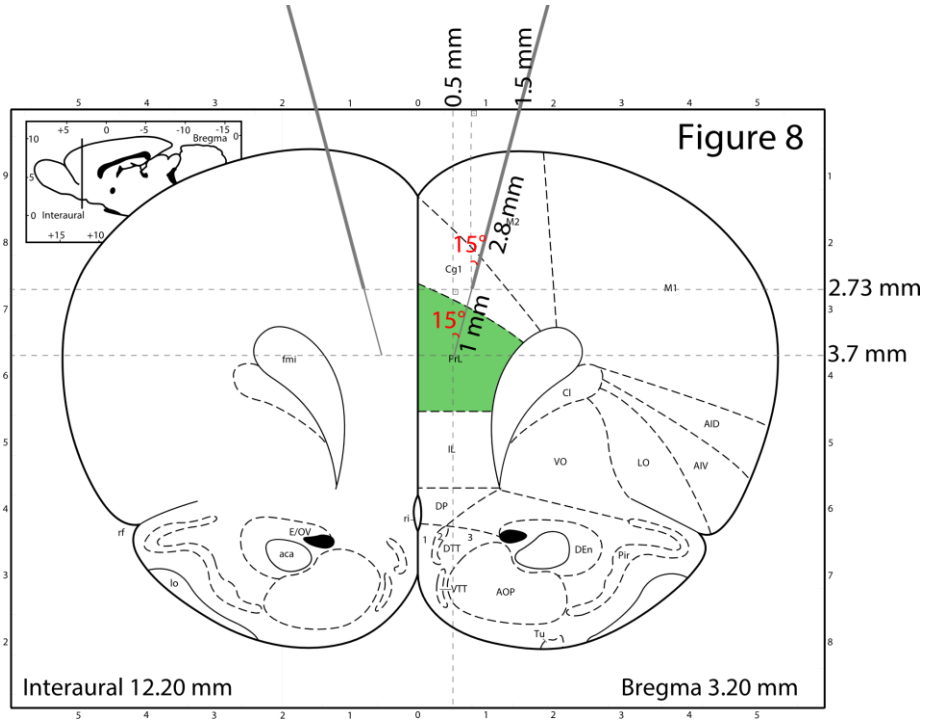

Figura 10 – Coordenada alvo no PLC. Ilustração adaptada do Atlas "*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*" (PAXINOS; WATSON, 2006) enfatizando em verde a estrutura de interesse.

No período imediatamente subsequente à cirurgia, os animais permaneceram em uma câmara aquecida (30-35°C), evitando assim efeitos hipotérmicos. Para analgesia pós-operatória, utilizou-se o anti-inflamatório não esteroide Meloxicam 2% (Ourofino), diluído a 0,15% em solução salina 0,9% e administrado por via subcutânea na dose de 1 mg/kg a cada 24 horas, no dia da cirurgia e nos dois dias subsequentes. Através da água do bebedouro, os ratos receberam acetaminofeno (Paracetamol 200mg/ml de uso oral sabor *tutti-frutti*, EMS). Por fim, os animais permaneceram em recuperação por 5 a 7 dias antes dos testes comportamentais e foram monitorados quanto à dor usando a *Rat Grimace Scale* (SOTOCINA *et al.*, 2011).

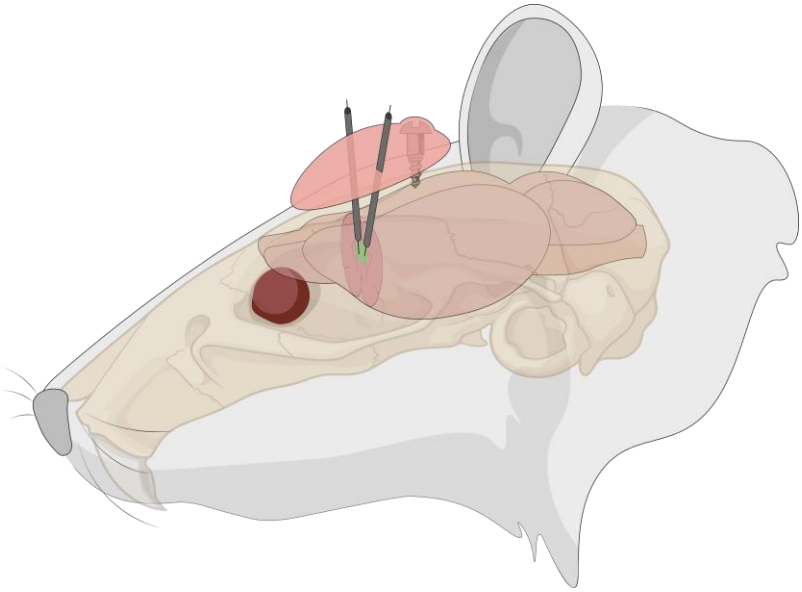

Figura 11 – Posicionamento das cânulas implantadas e fixadas com capacete de acrílico.
Fonte: elaborada pelo autor com auxílio do Biorender.

Vale destacar que, no protocolo de memória recente (2 dias), a cirurgia precedeu o treinamento. Nos protocolos de memória remota (28 e 45 dias), por outro lado, o procedimento foi realizado após o treino e antes do teste. Na tarefa de localização de objetos, por sua vez, a canulação foi realizada antes da primeira sessão de habituação (ver seção 4.3.2).

4.3 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

4.3.1 Condicionamento Aversivo ao Contexto (CFC)

4.3.1.1 Sessão de treino

Todos os grupos experimentais foram treinados no contexto A, o qual consistiu em uma caixa de acrílico (22 x 22 x 33 cm) (Fabricação: Insight) específica para condicionamento de esquiva automatizada, com iluminação interna. Três paredes apresentavam listras verticais em preto e branco, enquanto a quarta era marrom e texturizada. O assoalho era composto por uma grade de barras paralelas de aço inoxidável, com espaçamento de 1 cm entre si e calibre de 0,1 cm (Figura 12). A sala apresentava ruído de fundo do ar-condicionado.

Na sessão de condicionamento, os animais foram individualmente habituados ao contexto de treino A (estímulo condicionado) durante 3 minutos antes de serem submetidos ao recebimento de dois choques consecutivos (estímulo incondicionado)

contínuos com intensidade de 0,5 mA e 2 segundos de duração, em intervalos de 30 segundos. Passados 30 segundos adicionais do último choque, os ratos eram retirados do contexto e retornados à sua caixa moradia. O treinamento foi gravado por meio de uma webcam instalada na tampa da caixa. Entre o treino de um animal e outro, o aparato era higienizado com etanol 70%.



Figura 12 – Equipamento para ensaio comportamental: contexto condicionado A.

4.3.1.2 Infusão bilateral

Uma hora antes do teste, as cânulas dos animais foram verificadas para assegurar que não estavam obstruídas, e os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: muscimol (MUS) ou veículo (VEH). Infusões intracerebrais de muscimol ou veículo através das cânulas implantadas bilateralmente eram conduzidas 15 minutos antes da sessão de teste, conforme critérios preestabelecidos em experimentos anteriores (QUILLFELDT *et al.*, 1996; HAUBRICH *et al.*, 2016). Para isso, os animais eram delicadamente envoltos em um pano de flanela e contidos pela pele do dorso. Uma agulha gengival (*gauge 30*) de 1 cm era conectada a um tubo de polietileno P10 contendo a substância a ser infundida. Este tubo, por sua vez, se acoplava a uma microsseringa Hamilton atrelada a uma bomba de infusão automática (Cole-Parmer, modelo 74900). A agulha gengival era então inserida cuidadosamente na cânula previamente posicionada 1 mm acima da estrutura-alvo; sendo, portanto, o último milímetro percorrido pela agulha gengival

durante o processo de infusão. É fundamental que a agulha ultrapassasse levemente a extremidade da cânula, evitando que a substância injetada retornasse por capilaridade pelo espaço entre ambas.

Após o posicionamento da agulha gengival, a bomba era acionada para infundir 0,5 µL/hemisfério da solução de muscimol (8,76 mM, 1 µg/µL, Sigma-Aldrich) − um agonista reversível dos receptores $GABA_A$, capaz de suprimir temporariamente a atividade neuronal e, assim, inativar a região alvo − ou do veículo (PBS 1,5 mM: 51,3 mM NaCl, 18 mM NaH_2PO_4 e 81 mM Na_2HPO_4), ao longo de 90 segundos (taxa de infusão: 20 µL/h). A dose e o volume empregados são compatíveis com os valores utilizados na literatura para a inibição do PLC (0,2 a 0,5 µL por lado, bilateral, em concentrações de 5 a 10 mM), correspondendo a aproximadamente 2 a 5 nmol por infusão (STERN *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2017; THOMAS; BOUTON; GREEN, 2023). O desenho experimental está ilustrado na Figura 15.

Posteriormente, aguardavam-se 10 segundos adicionais antes da remoção da agulha, garantindo a difusão completa da substância. O mesmo procedimento era repetido no hemisfério contralateral. A cada hemisfério infundido era verificado se houve ou não entupimento da agulha gengival (ligando-se a bomba e verificando a formação de uma gota, que posteriormente era removida antes da agulha ser inserida dentro da cânula) para assegurar que na próxima infusão a substância seria devidamente injetada (Figura 13).

O efeito inibitório inicia-se rapidamente, com redução da atividade neural já nos primeiros minutos após a administração (EDELINE *et al.*, 2002) (ver seção 1.6.1). O PLC de ratos Wistar machos adultos apresenta volume aproximado de 3,65 mm³, segundo estimativas estereológicas obtidas pelo método de Cavalieri (CONTE *et al.*, 2019), sendo sua extensão A/P ~1,5 mm (PAXINOS; WATSON, 2006). Considerando a difusão limitada do muscimol, atribuída à sua elevada afinidade pelos receptores $GABA_A$ e aos mecanismos de captação por neurônios e células da glia (MARTIN, 1991), estima-se que o alcance da inativação varie entre 1,5 e 2,0 mm a partir do sítio de infusão (EDELINE *et al.*, 2002), podendo abranger uma fração relevante dessa estrutura. Não utilizamos o muscimol conjugado a moléculas fluorescentes ou radiomarcadores, mas como forma de verificar essa estimativa, azul de metileno foi

infundido pelas cânulas no mesmo volume utilizado para a administração do muscimol, e seu padrão de difusão foi avaliado histologicamente (ver seção 4.4).



Figura 13 – Infusão intracerebral.

4.3.1.3 Sessão de teste

Após 2 (memória recente), 28 ou 45 dias (memória remota) do treino, os animais foram testados para avaliar o comportamento de medo (consolidação da memória) e da precisão / generalização da memória. No teste, metade dos animais de cada tratamento (VEH ou MUS) foi avaliada no contexto condicionado, enquanto a outra metade foi testada em um contexto diferente. Vale ressaltar que, dentro de cada caixa de alojamento, composta por quatro animais, foi realizada uma distribuição aleatória de modo que cada grupo experimental estivesse representado por um indivíduo. Esse procedimento foi adotado para minimizar o chamado “efeito caixa” (LANDES, 2024), ou seja, a influência de fatores compartilhados entre animais da mesma gaiola, como hierarquia social, odores, níveis de estresse ou interações sociais, que podem introduzir viés nos resultados experimentais.

O teste consistiu na exposição individual de cada rato ao contexto original de condicionamento (contexto A) ou a um semelhante (denominado como contexto B), durante 5 minutos, sem a presença do choque. O contexto B consistia em uma caixa retangular (50 × 25 × 29 cm) (Fabricação: Albarsch) composta por duas paredes em tom bege, uma de madeira escura e uma parede frontal transparente. A iluminação era proporcionada por uma lâmpada de mesa posicionada ao lado da parede transparente. O assoalho consistia em barras de cobre paralelas, com calibre de 0,1 cm e espaçamento de 1 cm entre elas (Figura 14). Uma tampa semitranslúcida era colocada no topo do contexto e os ratos monitorados por uma câmera montada em

um suporte. Após cada teste, os aparatos eram higienizados com solução de etanol 70%, para garantir a ausência de pistas olfativas. A sala apresentava ruído de fundo do ar-condicionado. A escolha dos contextos foi realizada com base em estudos rigorosos conduzidos por Lotz *et al.* (2025).

(A) **(B)**



Figura 14 – Equipamento para ensaio comportamental: contexto alternativo B.

Os testes foram registrados em vídeo por meio de uma webcam, e o tempo de congelamento (ou *freezing*), caracterizado pela cessação de todos os movimentos, exceto os necessários para a respiração, foram considerados como indicador da retenção da memória, assim como definido por Blanchard, Flannelly e Blanchard (1986). A avaliação do congelamento foi conduzida por um observador experiente, cegado ao tratamento farmacológico administrado. Os resultados foram expressos como a % de *freezing*, calculada da seguinte forma: (tempo em que o animal expressou comportamento de congelamento / tempo total do teste) * 100.

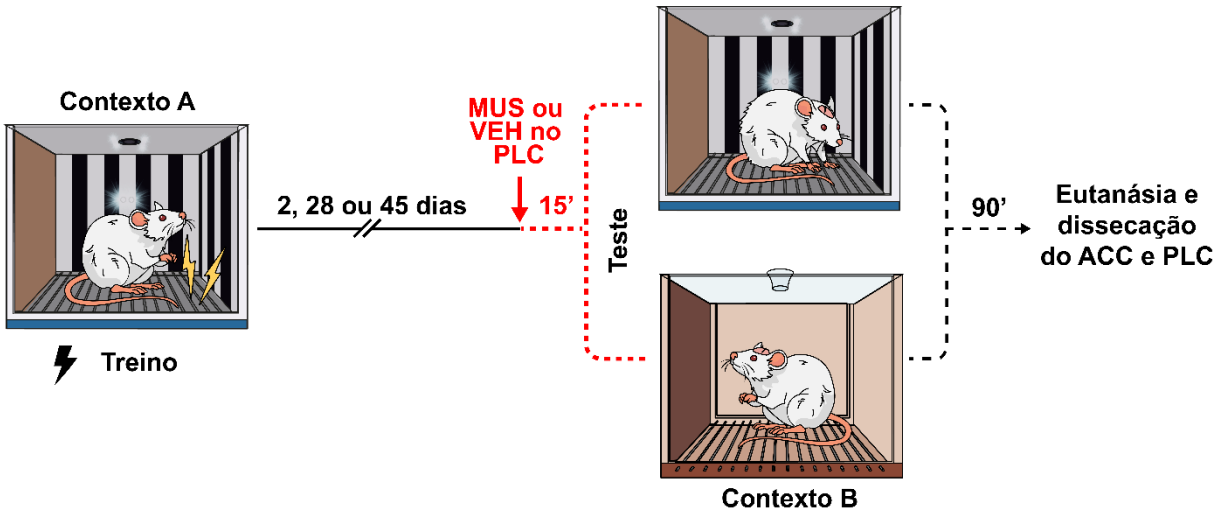

Figura 15 – Desenho experimental do protocolo de condicionamento aversivo ao contexto (CFC). Ilustração elaborada pelo autor com auxílio do Adobe Illustrator.

4.3.2 Teste de Localização de Objetos (OL)

Para a tarefa localização de objetos (OL, do inglês *object location*), utilizou-se uma arena quadrada preta de madeira (60 × 60 × 60 cm), contendo pistas visuais distintas nas paredes (SACHSER *et al.*, 2016). Os animais passaram inicialmente por dois dias consecutivos de habituação, com sessões de 20 minutos na arena sem objetos (CASSINI *et al.*, 2013). No dia seguinte à última sessão de habituação, eram realizadas duas sessões de treinamento de 5 minutos, separadas por um intervalo de 40 minutos. Em cada sessão, dois objetos idênticos eram posicionados a 10 cm das paredes do aparato. Os objetos consistiam em cones amarelos (18 cm × 11 cm), preenchidos com brita branca (730 g) para impedir que os animais os deslocassem. Além disso, eram fixados ao chão do aparato com fita dupla face, garantindo que permanecessem estáveis durante o experimento. A fita era trocada e os objetos eram higienizados com álcool 70% entre cada animal.

Passadas 24 h do treino, foi realizada a sessão de teste para avaliar a retenção da memória. Uma hora antes, as cânulas foram verificadas quanto à obstrução, e os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos MUS ou VEH. A infusão das substâncias ocorreu 15 minutos antes do teste, conforme descrito na seção 4.3.1.2. Para a avaliação da memória, um dos objetos idênticos era movido para uma nova posição na arena (Figura 16). A posição do objeto deslocado foi contrabalançada entre os animais (BARKER *et al.*, 2007). Assim, para parte dos ratos, os objetos foram posicionados em cantos adjacentes durante o treino (Figura 17A), e, no teste, um

deles foi deslocado para o canto oposto da arena (Figura 17B). Para os demais animais, foi adotado o arranjo inverso. Os animais foram sempre introduzidos em uma mesma posição no aparato, com a cabeça voltada para a parede da arena.



Figura 16 – Desenho experimental do protocolo de localização de objetos. Ilustração elaborada pelo autor com auxílio do Adobe Illustrator.

Os experimentos foram conduzidos em uma sala silenciosa e pouco iluminada. Chão e paredes do aparato foram higienizados com solução de etanol 70% entre cada teste. O comportamento exploratório foi definido como o tempo em que o animal direcionava o focinho próximo ao objeto e o explorava ativamente (cheirando e/ou interagindo com o objeto). A exploração não foi contabilizada se o animal estivesse em contato com o objeto, mas não de frente para ele, ou se estivesse utilizando-o como apoio para olhar ao redor (NELSON *et al.*, 2011). A arena era filmada por uma câmera posicionada acima, e a análise comportamental foi realizada por um observador cego aos tratamentos.

(A) **(B)**



Figura 17 – Localização dos objetos: sendo (A) adjacente, ou (B) em diagonal.

A porcentagem de discriminação foi calculada como a razão entre o tempo de exploração de um dos objetos e o tempo total de exploração de ambos * 100. Uma maior exploração do objeto deslocado em comparação ao objeto fixo foi interpretada como evidência de retenção da memória espacial.

4.3.3 Teste de Campo Aberto

O teste de campo aberto foi empregado para avaliar os níveis gerais de atividade locomotora (cruzamentos) e exploratória (elevações), com o objetivo de excluir possíveis alterações motoras decorrentes da cirurgia estereotáxica (HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2017). O teste foi realizado na mesma arena descrita na seção 4.3.2, a qual foi virtualmente dividida em uma grade 3 × 3, totalizando 9 quadrados (20 × 20 cm).

Para fins de comparação, ratos intactos foram introduzidos individualmente no aparato, com a face voltada para um dos vértices da arena. Durante 5 minutos, foram registrados o número de cruzamentos e de elevações realizados por cada animal. Os cruzamentos foram contabilizados quando o animal entrava em um novo quadrado com as quatro patas, enquanto as elevações correspondiam aos episódios em que o animal erguia-se sobre as patas traseiras. Para os animais submetidos à canulação, o mesmo procedimento foi adotado. Entretanto, os sujeitos avaliados corresponderam aos mesmos indivíduos utilizados no teste de OL, sendo os dados do campo aberto obtidos a partir dos 5 minutos iniciais da primeira sessão de habituação ao aparato.

4.4 EUTANÁSIA E REMOÇÃO DO ENCÉFALO

Os animais que passaram pelo CFC foram anestesiados por inalação de isoflurano (fabricação Syntec) e submetidos a eutanásia por guilhotina, 90 minutos após a finalização dos testes comportamentais. O encéfalo foi removido do crânio e, em seguida, seccionado em uma fatia coronal de aproximadamente 1,5 mm, correspondente às coordenadas 3,70 mm a 2,20 mm A/P em relação ao bregma (PAXINOS; WATSON, 2006), com auxílio de uma matriz para corte (fabricação Bonther, #0Q8ZYV1012). A fatia foi fotografada para registro da posição da cânula (Figura 18A) e, posteriormente, dissecada para coleta das estruturas ACC e PLC, as quais foram armazenadas a -80 °C no *ultrafeezer* para posterior análise por *western blot*.

Para os animais que passaram pelo teste de OL, a confirmação da correta posição da cânula na região de interesse foi realizada anestesiando-se os animais com uma mistura de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Após conferência da ausência de reflexos da pata, em cada cânula foi injetado azul de metileno, no mesmo volume usado na administração de muscimol e veículo (0,5 µL). Posteriormente, os animais foram submetidos a eutanásia por guilhotina e os encéfalos retirados e fixados em uma solução de paraformaldeído 4%, à temperatura ambiente. Com auxílio de uma matriz de corte foram feitas fatias da porção do mPFC para verificação do posicionamento das cânulas (Figura 18B). Aquelas que não estavam de acordo com as coordenadas ou que apresentavam lesões severas em regiões adjacentes foram excluídas da análise.

(A) **(B)**

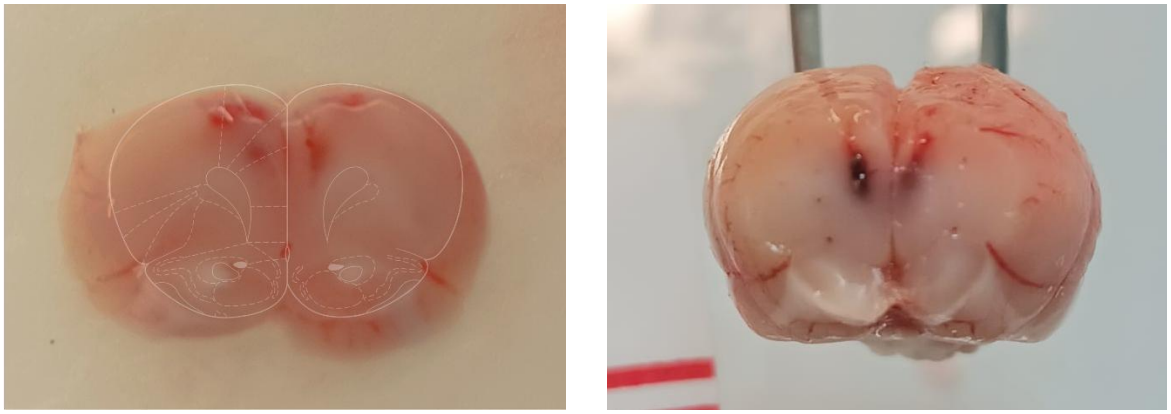

Figura 18 – Corte coronal para (A) dissecação e verificação das cânulas (B) com infusão de azul de metileno.

4.5 WESTERN BLOT

Amostras de PLC e ACC provenientes dos mesmos animais expostos ao protocolo de CFC no intervalo de 28 dias e previamente armazenadas a -80 °C, foram pesadas e submetidas à lise para extração proteica. As estruturas foram maceradas mecanicamente em tampão NEB 1:8 (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0,6 mM EDTA, pH 7,9), suplementado com 1% de Nonidet P-40 (Cat# E109, Amresco, EUA), e 1% de coquetel de inibidor de proteases (Cat# 11697498001, Roche, Alemanha). Os extratos de tecido foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes coletados. A concentração de proteínas totais no sobrenadante foi determinada usando um kit comercial de ensaio de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce,

Thermo Fisher Scientific, EUA). Posteriormente, as amostras foram reduzidas com dodecil sulfato de lítio (LDS) e 5% de ditiotreitol (DTT), seguidas por desnaturação no *dry block* a 95ºC e carregadas (40 µg de proteína/poço) em géis de poliacrilamida gradiente de 4%−12% pré-moldados NuPAGE (#NP0323BOX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), juntamente com o marcador de peso molecular de 3,5–260 kDa (#LC5800, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A eletroforese foi realizada em um XCell SureLock Mini-Cell (#EI0002, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (#10600002, GE HealthCare, Alemanha) usando o equipamento Transferblot (Bio-Rad), sob condições de 2,5 A, 25 V, por 10 minutos, em tampão de transferência (40 mM tris, 32,5 mM glicina, 1,08 mM SDS e 16,7% metanol). As membranas foram bloqueadas por 2 h em solução salina tamponada com Tris contendo Tween 20 (T-TBS) e 5% (m/v) de leite em pó desnatado (Molico). Posteriormente foram incubadas *overnight*, a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: coelho anti-c-Fos (1:1.000, Cell Signaling Technology Cat# MA5-15055, RRID: AB_10984728), coelho anti-ARC (1:500, Cell Signaling Technology Cat# PA5-19934, RRID: AB_11154320), e camundongo anti-α-tubulina (1:1000, Sigma, #T607-200UL), esta última usada como normalizador de carga. No dia seguinte, foi realizada a incubação por 2 h em temperatura ambiente (23°C) com anticorpo secundária anti-coelho (1:1.000, Sigma-Aldrich Cat# AP132P, RRID: AB_90264) ou anti-camundongo (1:1.000, Millipore Cat# 402335-2ML, RRID: AB_437955) conjugados com peroxidase. Os sinais quimioluminescentes foram revelados utilizando o Pierce ECL Western Kit (#32106; Thermo Fisher Scientific) e detectados no sistema de imageamento Bio-Rad ChemiDoc, sendo as imagens capturadas em formato .scn. As intensidades das bandas foram quantificadas com o software *Image Lab* (versão 6.1; Bio-Rad Laboratories) por meio da delimitação manual das colunas de corrida (*lanes*) e da identificação das bandas (*bands*) de interesse. A intensidade volumétrica de cada banda foi calculada após subtração do sinal de fundo. A expressão da proteína de interesse foi normalizada em relação ao respectivo controle e os resultados foram expressos como a razão entre a intensidade da proteína de interesse e os níveis de tubulina na mesma membrana.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os animais serem considerados nas análises estatísticas, todos deveriam atender às seguintes condições: (a) completa recuperação da cirurgia de implantação das cânulas, (b) preservação do capacete de acrílico até o momento da infusão e (c) cânulas posicionadas de acordo com as coordenadas e (d) ausência de lesões severas em regiões adjacentes. Além disso, para os testes de condicionamento, os animais não poderiam apresentar comportamento de congelamento durante os 3 minutos prévios de habituação ao contexto A. Quanto ao teste de OL, foram excluídos das análises os animais que apresentaram viés de exploração durante o treinamento, definido como mais de 65% do tempo total dedicado a um único objeto nas sessões 1 e/ou 2. Também foram excluídos os animais que não alcançaram 10 segundos de exploração total dos objetos durante as sessões de 5 minutos de teste. Ao final 35 animais (14% do total) foram excluídos do estudo por demonstrarem um ou mais dos critérios de exclusão previamente estabelecidos.

Inicialmente, os valores discrepantes (*outliers*), definidos como aqueles situados além de dois desvios-padrão acima ou abaixo da média, foram identificados e excluídos das análises. Em seguida, a distribuição dos dados foi avaliada quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e à homocedasticidade pelo teste de Levene. Para dados paramétricos, as análises estatísticas foram conduzidas conforme a natureza de cada comparação: (i) teste t de *Student* para amostras independentes (comparação entre dois grupos); (ii) ANOVA unidirecional para amostras independentes (um fator *between-subjects*); (iii) ANOVA bidirecional para amostras independentes (dois fatores *between-subjects*); (iv) ANOVA para medidas repetidas (um fator *within-subjects*); ou (v) de efeitos mistos (um fator *between-subjects* e um *within-subjects*) e (vi) ANOVA fatorial mista de 3 vias (dois fatores *between-subjects* e um fator *within-subjects*), quando apropriado. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), e cada sujeito foi representado individualmente nos gráficos por símbolos, permitindo a visualização da distribuição dos dados dentro de cada grupo. Quando observada significância estatística ($p < 0,05$), aplicou-se o teste *post hoc* de Tukey ou Bonferroni (para comparações planejadas ou com correção para múltiplas comparações).

Adicionalmente, para quantificar a magnitude das diferenças observadas, foram calculados os tamanhos de efeito para todas as análises e apresentadas quando pertinente. Utilizou-se: Omega-squared (ω^2) para ANOVAs com fatores *between-subjects* ou Omega-squared parcial (ω^2p) para ANOVAs que incluíam medidas repetidas (fatores *within-subjects*), com pontos de corte de 0,01 (pequeno), 0,06 (médio) e 0,14 (grande). Para as comparações post hoc, foi utilizado o Hedges' g (*between-subjects*) ou Hedges' g_z para comparações pareadas dentro do mesmo grupo (*within-subjects*), com os seguintes critérios de interpretação: pequeno = 0,20; médio = 0,50; grande = 0,80.

Para correlações de dados não paramétricos foi utilizado o teste de Spearman bicaudal. Todas as análises estatísticas foram realizadas no RStudio, e os gráficos foram elaborados neste mesmo software ou no GraphPad Prism 9.

6 DISCUSSÃO

No experimento de CFC para investigação do PLC, foram analisados simultaneamente dois aspectos fundamentais da consolidação sistêmica: (1) o componente anátomo-funcional, avaliado pela comparação entre a administração de MUS x VEH e o comportamento dos animais treinados e testados no contexto A; e (2) o componente qualitativo, avaliado pela comparação entre a administração de MUS x VEH e o comportamento dos animais treinados no contexto A e testados no contexto B.

A infusão de muscimol no PLC, realizada antes do teste, bloqueou a expressão comportamental (expressão do medo e/ou expressão da memória) apenas 2 dias após o treino (Figura 19B), mas não em momentos posteriores, aos 28 ou 45 dias (Figura 19 C e D). Os animais foram capazes de discriminar o contexto A do B somente no teste recente (2 dias), enquanto nos testes de evocação remota da memória, ocorreu generalização contextual. Esse perfil temporal, semelhante ao observado no hipocampo dorsal em ratos machos adultos (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; HAUBRICH *et al.*, 2016), sugere que o PLC é necessário nas fases iniciais da consolidação sistêmica, em consonância com seu papel de suporte na expressão do medo de traços recentes (DIXSAUT; GRÄFF, 2022). Além disso, o fato de o muscimol não ter alterado os níveis de *freezing* aos 28 e 45 dias indica que outras regiões encefálicas podem ter passado a sustentar esse processamento ou compensado pela perda transitória da função do PLC. Essa possibilidade ainda requer investigação adicional, especialmente à luz de evidências recentes que apontam para a participação do PLC tanto na memória recente quanto na remota (a partir de 7 dias) (GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026).

Diversos estudos têm investigado a heterogeneidade funcional do PLC, buscando identificar subpopulações neuronais e suas projeções específicas envolvidas no processamento das memórias. Nesse contexto, Quiñones-Laracuente; Vega-Medina e Quirk (2021) combinaram rastreamento retrógrado e imunohistoquímica de c-Fos para examinar a organização temporal das projeções do PLC. Os autores observaram que neurônios PLC-BLA, localizados principalmente nas camadas II/III e V, eram preferencialmente recrutados 2 horas após o treinamento,

enquanto as projeções PLC-PVT, restritas à camada VI, apresentavam maior ativação após 7 dias.

Em seguida, por meio de registros eletrofisiológicos *in vivo*, verificaram que os neurônios da camada V (relacionados a BLA) exibiam maior excitabilidade ao tom em períodos recentes (2 e 24 horas), resposta que diminuía após 4 dias. Em contraste, os neurônios da camada VI (relacionados a PVT) apresentavam pouca excitação ao tom e uma resposta predominantemente inibitória em períodos mais tardios (≥4 dias). Assim, apesar do aumento de c-Fos nas projeções PLC-PVT, os autores propuseram que essa ativação refletiria o recrutamento de interneurônios inibitórios. Em conjunto, os dados sugerem uma transição temporal de um predomínio da atividade excitatória do circuito PLC-BLA para uma maior inibição das projeções PLC-PVT, o que poderia desinibir a via tálamo-amígdala (Figura 28). Contudo, permanece desconhecido se esse padrão persiste em períodos mais remotos, como aos 28 dias investigados no presente estudo.

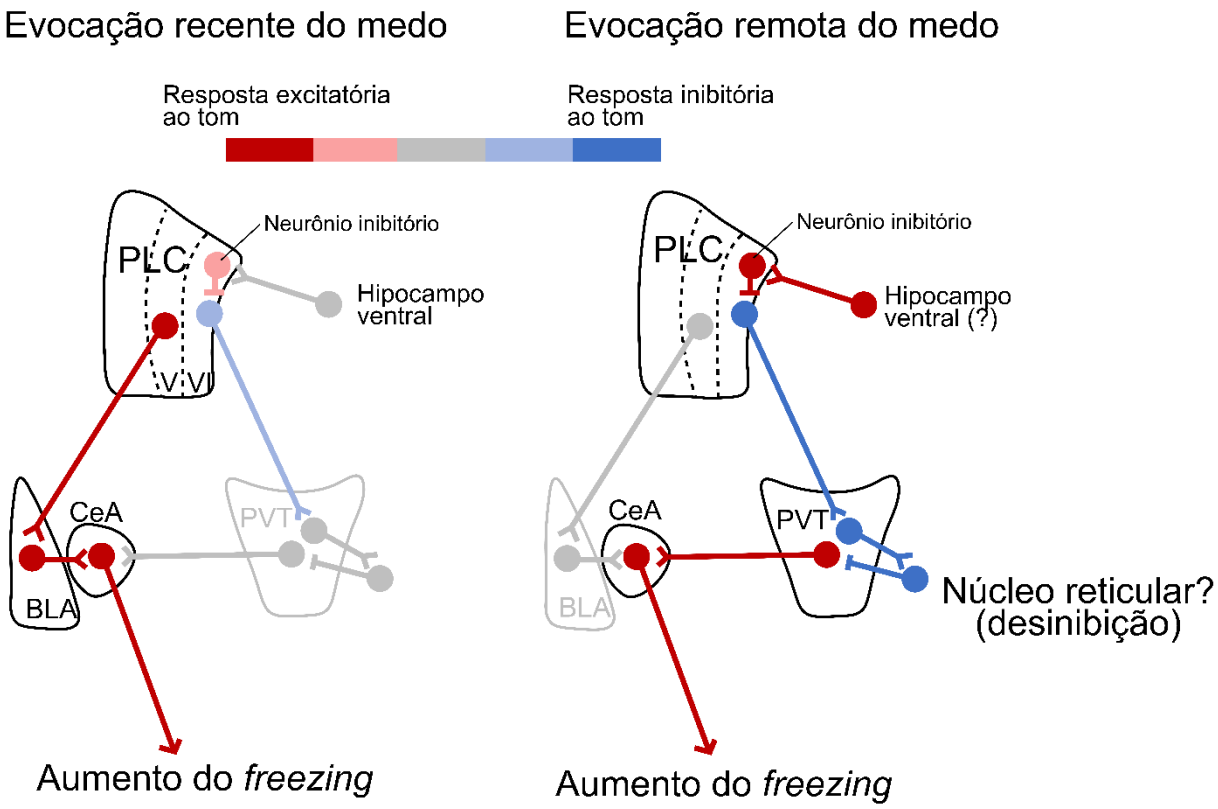

Figura 28 – Modelo proposto dos circuitos pré-límbicos para a evocação precoce e tardia do medo. Respostas excitatórias (vermelho) e inibitórias (azul). Figura adaptada de Quiñones-Laracuente; Vega-Medina e Quirk (2021). BLA: amigdala basolateral; CeA: núcleo central da amígdala; PLC: córtex pré-limbico; PVT: núcleo paraventricular do tálamo.

Reforçando a ideia de um recrutamento temporalmente dinâmico de diferentes populações neuronais do PLC, Golbabaei, Josselyn e Frankland (2026) utilizando camundongos TRAP2 combinados a abordagens virais, optogenéticas e quimiogenéticas, demonstraram que os conjuntos neuronais do PLC se reorganizam ao longo do tempo, formando subpopulações distintas que sustentam a consolidação e a evocação da memória em diferentes estágios temporais. A inibição das células do engrama no PLC reduziu a resposta de medo tanto para memórias recentes quanto remotas, sendo o efeito mais pronunciado nestas últimas. Esses achados corroboram nossos resultados ao indicar a participação do PLC na evocação de memórias recentes. Entretanto, diferem dos dados obtidos para a memória remota, uma vez que, em nosso estudo, a inativação do PLC aos 28 ou 45 dias não alterou a resposta de medo. Essa discrepância pode estar relacionada às diferentes janelas temporais avaliadas, já que Golbabaei, Josselyn e Frankland (2026) investigaram a memória remota aos 14 dias, enquanto o presente estudo a avaliou a partir dos 28 dias.

Ao caracterizar as populações neuronais marcadas, Golbabaei, Josselyn e Frankland (2026) observaram que as projeções do PLC para a amígdala basal e para o córtex entorrinal lateral contribuem para a evocação de memórias recentes e remotas, enquanto as projeções para o núcleo accumbens e para o núcleo reuniens participam apenas da evocação de memórias remotas. Por outro lado, embora a ativação das projeções PLC-PVT tenha aumentado o congelamento em um contexto novo, sua inibição no contexto de treino não alterou a resposta de medo, sugerindo que essa via está mais relacionada à modulação do estresse do que à expressão da memória (WANG *et al.*, 2023; GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026).

Essa interpretação contrasta com a proposta de Quiñones-Laracuente; Vega-Medina e Quirk (2021), segundo a qual as projeções PLC-PVT tornam-se predominantemente inibidas em períodos mais tardios, favorecendo indiretamente a expressão do medo por meio da desinibição da via tálamo-amígdala. Em contrapartida, os achados de Golbabaei, Josselyn e Frankland (2026) indicam que a ativação dessa via é suficiente para induzir uma resposta de congelamento mesmo na ausência de uma memória aversiva específica, sugerindo um papel mais direto na geração de estados defensivos do que na evocação da memória condicionada propriamente dita.

Entretanto, a identificação dos circuitos de evocação do medo é dificultada pelo fato de que as memórias se reorganizam ao longo do tempo, deixando de depender de uma única região encefálica. Além disso, déficits observados após a inativação de um circuito antes do teste podem indicar sua participação na evocação da memória, mas não permitem concluir se esse mesmo circuito é também um sítio de armazenamento mnésico (DO MONTE *et al.*, 2016).

A evocação do medo consiste no acesso ao traço mnêmico previamente consolidado de uma associação aversiva, induzido pela reexposição do animal ao estímulo ou contexto condicionado (GUTHRIE, 1930); enquanto a expressão do medo corresponde à manifestação comportamental e fisiológica dessa memória, como congelamento, respostas autonômicas (e.g., frequência cardíaca e pressão arterial) e comportamentos de esquiva ou fuga (DO MONTE *et al.*, 2016). Dessa forma, uma manipulação neural pode prejudicar a capacidade de acessar a memória (evocação) ou afetar apenas os circuitos responsáveis por gerar a resposta comportamental (expressão), sem alterar o traço mnésico subjacente. Por exemplo, lesões no núcleo central da amígdala suprimem a expressão comportamental de medo (*freezing*) em camundongos condicionados a tons ou contextos, sem abolir alterações na excitabilidade sináptica hipocampo-septal associadas à memória, indicando que a memória factual permanece acessível mesmo quando sua expressão comportamental é bloqueada (DESMEDT; GARCIA; JAFFARD, 1998). Uma vez que o PLC se projeta para a amígdala modulando a expressão do medo, talvez um processo semelhante de dissociação, como o descrito por Desmedt, Garcia e Jaffard (1998), esteja acontecendo.

Por outro lado, evidências recentes mostram que manipulações do PLC ou de suas projeções podem interromper seletivamente a evocação da memória do medo sem necessariamente afetar sua aquisição ou expressão, demonstrando que esses processos são mediados por substratos neurais parcialmente distintos. Estudos optogenéticos e quimiogenéticos indicam que projeções do hipocampo ventral para o PLC desempenham papel central nesse processo: enquanto o silenciamento dessas vias durante o treinamento prejudica especificamente a memória contextual do medo (TWINING *et al.*, 2020), sua ativação é capaz de suprimir a evocação dessa memória e alterar a capacidade dos neurônios do PLC de discriminar diferentes fases do

aprendizado aversivo (HALLOCK *et al.*, 2020), reforçando a importância funcional desse circuito na modulação da evocação do medo contextual.

Essa distinção é essencial para a interpretação de resultados experimentais e para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos transtornos relacionados ao trauma. Se uma manipulação afeta apenas a expressão, a memória permanece intacta e pode ser expressa em outras condições ou por meio de comportamentos alternativos (DO MONTE *et al.*, 2016). Se a evocação é prejudicada, a memória não pode ser acessada, independentemente da integridade dos circuitos a jusante. Portanto, são necessárias avaliações cuidadosas para determinar se uma manipulação afeta o acesso à memória ou os circuitos de saída responsáveis pela expressão do medo.

Nosso caso foi particularmente desafiador porque a própria medida utilizada para quantificar a memória aversiva – o medo expresso, mensurado pelo comportamento de *freezing* – é diretamente regulada pela região investigada. Isso cria uma importante limitação interpretativa, uma vez que uma redução no *freezing* após a manipulação do PLC pode refletir tanto um déficit na evocação da memória quanto uma alteração específica nos circuitos responsáveis pela expressão do medo. Assim, apenas aplicando-se o teste de CFC, parece que o PLC tem participação importante na memória recente, mas não permite avaliarmos se nesse período ela é importante apenas para a expressão do medo (rato lembra do contexto e do choque, dissociada da valência emocional negativa suscitada) ou para a memória como um todo (não lembra da experiência de ter estado no contexto anteriormente e ali ter recebido o choque). Para compreender melhor essa dinâmica e avaliar a participação do PLC na evocação mnésica sem a interferência dos circuitos envolvidos na expressão do medo, utilizamos o paradigma OL, uma tarefa de memória espacial desprovida de estímulos aversivos.

Evidências indicam que o mPFC participa da consolidação e da evocação da memória de localização e reconhecimento de objetos, de modo que déficits nessas tarefas tendem a refletir prejuízos no armazenamento ou na evocação da memória (VIEIRA; KORZUS, 2015). Diferentemente de paradigmas aversivos, nos quais alterações no *freezing* podem resultar tanto de mudanças na evocação quanto em circuitos relacionados à expressão do medo, a tarefa de OL permite dissociar mais

diretamente processos mnemônicos de respostas emocionais. Essa interpretação é reforçada por estudos mostrando que, após a fase de aquisição em tarefas de reconhecimento de objetos − idêntica à utilizada em OL −, os níveis de corticosterona plasmática são significativamente menores do que após treinamentos em labirintos radial ou aquático (SANDI; LOSCERTALES; GUAZA, 1997; OKUDA; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2004), caracterizando-a como um paradigma de baixo estresse e valência emocional neutra.

Com base nisso, partiu-se da hipótese de que, se a inibição do PLC durante o teste levasse os animais a explorarem igualmente ambos os objetos, isso indicaria participação dessa região no armazenamento ou evocação da memória espacial. Em contrapartida, a manutenção da preferência pelo objeto deslocado sugeriria que o PLC não atua como um *nó* essencial para o armazenamento dessa memória, mas estaria mais relacionado à modulação da expressão do medo. Nossos resultados sustentam essa segunda interpretação (Figura 20), indicando que, na memória recente, o PLC parece desempenhar papel mais relevante na expressão do medo do que no armazenamento mnemônico. Ainda assim, é importante considerar que o envolvimento do mPFC em tarefas espaciais pode variar conforme as demandas específicas de cada paradigma. Embora alguns estudos mostrem que o mPFC não é essencial em tarefas de OL, especialmente em testes de memória de curto prazo (BARKER *et al.*, 2007; VIEIRA; KORZUS, 2015), modificações metodológicas − como o uso de pistas visuais adicionais e contextos espaciais mais complexos − podem aumentar a exigência de aprendizagem de regras e, consequentemente, o recrutamento dessa região (VIEIRA; KORZUS, 2015).

Vale ressaltar que, embora o teste de OL não permita excluir de forma definitiva uma participação do PLC na evocação da memória, ele ao menos sugere fortemente que essa área – consideradas suas bem descritas funções afetivo-cognitivas – atua de forma seletiva sobre a componente de "expressão do medo". Isso nos permite inferir que o PLC não está especificamente envolvido em outra função concomitante, a saber, a evocação do traço de memória do contexto aversivo em si. Esses achados também advogam contra a possibilidade de que essa região, apesar de sua proximidade anatômica com o ACC, desempenhe simultaneamente múltiplas funções independentes ("multitarefas") durante a fase recente da memória. Um experimento que não realizamos, mas que poderia ser feito, seria utilizar um *antagonista* de

receptores $GABA_A$ no PLC para verificar se a estimulação dessa região durante um teste de memória recente, os níveis de congelamento aumentariam caso o PLC esteja envolvido somente na expressão do medo, e não no armazenamento da memória. Além disso, se esse efeito se relaciona com a mera expressão do medo, seria esperado um aumento do congelamento também em um contexto novo, reforçado por algum componente neofóbico. Esse experimento contribuiria para reforçar a principal interpretação proposta neste trabalho

Para além dos achados observados na tarefa de OL, é importante retomar o papel do PLC no condicionamento aversivo ao contexto. Nesse paradigma, embora nossos resultados não tenham corroborado a hipótese inicial de fortalecimento progressivo do traço mnêmico nessa região, eles se mostram consistentes com achados prévios da literatura. Frankland *et al.* (2004), por exemplo, demonstraram que a inibição do ACC com lidocaína − um bloqueador de canais de sódio dependentes de voltagem − comprometeu a memória contextual do medo em intervalos remotos (18 e 36 dias), mas não em intervalos recentes (1 e 3 dias). Em contrapartida, a inibição do PLC, tanto em 1 quanto em 36 dias após o treino, não alterou significativamente a expressão do medo. Em conjunto, esses resultados sugerem que o ACC desempenha papel central na evocação de memórias remotas, enquanto o PLC parece ter participação menos determinante nesse processo. Adicionalmente, os dados ressaltam a importância da apresentação e discussão de resultados negativos, uma vez que a ausência de efeito experimental também constitui uma evidência científica relevante para a delimitação das funções neurais envolvidas.

Outros estudos, no entanto, apresentam um panorama diferente. Utilizando camundongos transgênicos, Denardo *et al.* (2019) rotularam com tdTomato os neurônios ativados em diferentes janelas temporais após o condicionamento ao tom − imediatamente, 1 dia, 7 dias ou 14 dias após o aprendizado − usando TRAP2, de modo que, quando o animal recebe 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), apenas as células recentemente ativadas naquele intervalo de tempo passam a expressar o transgene (e.g. proteína repórter). Em seguida, 28 dias depois do condicionamento, avaliaram quais desses neurônios rotuladas com tdTomato voltavam a ser recrutados durante a evocação da memória de 28 dias (identificados pela imuno-histoquímica de c-Fos). Os resultados mostraram que as células do PLC marcadas 7 e 14 dias após o aprendizado apresentavam maior sobreposição de $tdTomato^+$ e $c\text{-}Fos^+$ do que os

neurônios marcados em tempos mais precoces, como imediatamente após o condicionamento ou 1 dia depois. Isso indica que, ao longo das duas primeiras semanas após o aprendizado, o engrama do PLC não é fixo: ele passa por uma reorganização gradual, na qual conjuntos recrutados mais tardiamente tornam-se mais fortemente associados à expressão da memória remota.

Neste mesmo estudo, quando empregada a técnica de iDISCO+ para clarificação tecidual e imageamento cerebral em 3D, combinada a uma pipeline de análise axonal em neurônios do PLC/TRAPed expressando proteína verde fluorescente (GFP) de membrana, Denardo *et al.* (2019) demonstraram que o padrão anatômico geral das projeções do PLC permanece relativamente estável ao longo do tempo. Entretanto, a análise de *clusters* indicou uma reorganização funcional do circuito, caracterizada por mudanças no padrão de coagrupamento do PLC com diferentes regiões encefálicas ao longo das fases da memória. Em estágios mais precoces, suas interações estiveram mais associadas a estruturas subcorticais, principalmente amígdala basolateral e basomedial, amígdala central, núcleos talâmicos de linha média, além de hipotálamo, estriado e pallidum. Enquanto na memória remota o PLC passou a se agrupar preferencialmente com regiões corticais de associação, incluindo o ACC, áreas temporais de associação, córtex ectorrinal, entorrinal, auditivo, visual e somatossensorial de ordem superior. Esses achados indicam que, embora a arquitetura anatômica das projeções se mantenha, a organização funcional do circuito evolui dinamicamente, com maior recrutamento de redes corticais durante a fase remota da memória, em concordância com o processo de corticalização descrito pela consolidação sistêmica (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005).

Assim, uma possível explicação para a ausência de efeito da inibição do PLC sobre a memória remota seria a transferência da responsabilidade pela expressão do medo para outras regiões neurais, uma vez que sua inibição afetou a memória recente no paradigma de CFC, mas não a remota. Alternativamente, caso o PLC participe não apenas da expressão do medo, mas também do armazenamento de memórias remotas, hipótese que ainda requer investigação experimental, é possível que a perda transitória de sua função seja compensada por mecanismos recrutados em outras estruturas cerebrais, preservando o desempenho comportamental observado.

Os sistemas de aprendizagem parecem funcionar em paralelo; quando um é inibido, outro pode compensar o déficit (ZELIKOWSKY *et al.*, 2013; VIEIRA; KORZUS, 2015). Por isso, é importante considerar que a preservação da evocação da memória após a inibição de uma determinada região pode estar relacionada à ação lenta das intervenções farmacológicas (CRESTANI *et al.*, 2018; DIXSAUT; GRÄFF, 2022), o que permitiria a compensação funcional por outras regiões encefálicas. Em contraste, a inativação rápida por meio de abordagens optogenéticas impede que outras áreas compensem de forma suficientemente rápida a perda súbita de atividade da região inibida (GOSHEN *et al.*, 2011), permitindo avaliar de maneira mais fidedigna a participação dessa estrutura na evocação da memória.

Nesse sentido, hipotetizou-se que, em decorrência da reorganização dinâmica das redes corticais ao longo do tempo e da consequente consolidação sistêmica do engrama em regiões corticais, o ACC pudesse assumir a responsabilidade pela evocação de memórias remotas quando o PLC é inibido farmacologicamente com muscimol. Essa hipótese baseou-se nos achados de Goshen *et al.* (2011), que observaram aumento da atividade do ACC (avaliada pela expressão da proteína c-Fos) após o silenciamento optogenético prolongado da região CA1, mimetizando técnicas convencionais de inativação. Esse efeito não ocorreu após a inibição imediata do CA1, sugerindo que o ACC poderia assumir um papel compensatório na evocação da memória.

Com o objetivo de investigar possíveis mecanismos compensatórios em resposta à inibição do PLC, foi realizado um ensaio de *western blot* para avaliar se regiões como o ACC poderiam assumir a função de evocação da memória. Para isso, analisou-se a expressão das proteínas c-Fos e ARC, amplamente utilizadas como marcadores de ativação neuronal (FRANKLAND *et al.*, 2004; DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015; DIXSAUT; GRÄFF, 2022), uma vez que diferenças em sua expressão entre as áreas analisadas no grupo tratado em relação ao veículo poderiam indicar o recrutamento de outras regiões encefálicas. Essa hipótese é sustentada por evidências prévias de reorganização funcional em circuitos de memória e medo contextual. Por exemplo, na ausência do hipocampo dorsal, tanto o ILC quanto o PLC são necessários para a expressão do medo ao contexto (ZELIKOWSKY *et al.*, 2013). Além disso, por meio da análise de c-Fos, Zelikowsky *et*

al. (2013) demonstraram que a evocação do medo contextual altera o balanço de atividade entre PLC e ILC, com aumento da atividade no PLC e redução no ILC.

Entretanto, no presente estudo, a análise de c-Fos e ARC não evidenciou maior envolvimento do ACC (Figura 21), sugerindo que a inibição transitória do PLC, na memória remota, pode não ser suficiente para desencadear uma reorganização detectável nesta região. Alternativamente, outras regiões neurais não investigadas aqui poderiam estar involucrados atuando de forma compensatória, se é que tais sutis (ou temporalmente restritas) alterações funcionais seriam detectáveis pelos marcadores utilizados.

Portanto, esses resultados devem ser interpretados com cautela. Evidências recentes por Bulthuis *et al.* (2025) demonstram que a expressão das proteínas c-Fos e ARC não reflete de maneira uniforme a ativação neuronal, sendo dependente da região encefálica, do estado da memória e de mecanismos regulatórios específicos. Nesse sentido, os autores demonstraram que, embora ambos sejam amplamente utilizados como marcadores de atividade neuronal, c-Fos e ARC podem identificar populações neuronais parcialmente distintas, com padrões de expressão que variam conforme a fase do processamento mnêmico. Notavelmente, ARC parece ser mais sensível ao estado da memória, especialmente durante a evocação, enquanto c-Fos apresenta um perfil mais generalista de ativação (BULTHUIS *et al.*, 2025).

Nessa perspectiva, nossos resultados também fornecem evidências de diferenças moleculares entre o ACC e o PLC. A correlação positiva entre c-Fos e ARC observada apenas no ACC (Figura 22) corrobora os achados apresentados por Bulthuis *et al.* (2025). Embora a relevância funcional dessa dissociação ainda não esteja esclarecida, ela sugere que ACC e PLC podem recrutar mecanismos moleculares distintos durante o processamento e a evocação das memórias. Nesse contexto, a ausência de diferenças detectáveis entre o PLC e o ACC não implica necessariamente inexistência de variações na atividade neuronal entre essas regiões.

Embora o ACC tenha sido considerado uma possível região compensatória em função de sua proximidade com o PLC e seu envolvimento no armazenamento e na evocação de memórias remotas (FRANKLAND *et al.*, 2004; EINARSSON; PORS; NADER, 2015; HAUBRICH *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2020), evidências sugerem que o PLC está inserido em uma rede muito mais ampla. Estudos com vírus de

infecção retrógrada demonstram que essa região recebe projeções de múltiplas áreas corticais e subcorticais envolvidas na formação do traço mnemônico (KITAMURA *et al.*, 2017; DIXSAUT; GRAEFF, 2021; GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026). Nesse contexto, Dixsaut e Gräff (2022) propõem que, à medida que a memória se torna remota, torna-se difícil atribuir a evocação a uma única via da qual o PLC participa, uma vez que, com a consolidação sistêmica, a informação passa a ser distribuída em uma rede cortical mais ampla e redundante, tornando sua interrupção por uma manipulação isolada menos provável.

Essas observações levantam questões sobre os mecanismos pelos quais a inibição do ACC é capaz de suprimir a expressão do medo remoto (FRANKLAND *et al.*, 2004; HAUBRICH *et al.*, 2016) enquanto, em nosso estudo, a inibição do PLC não produziu efeito semelhante. Uma possível explicação é que o ACC e o PLC desempenham papéis distintos na expressão de memórias remotas de medo, em decorrência de suas diferenças de conectividade e organização molecular (SUNG; KAANG, 2022; BULTHUIS *et al.*, 2025). O PLC parece estar mais diretamente envolvido na expressão do medo (VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010) associado a um contexto específico (TWINING *et al.*, 2020), ao passo que o ACC parece assumir um papel mais central na manutenção e integração das representações mnêmicas consolidadas ao longo do tempo (EINARSSON; PORS; NADER, 2015; BIAN *et al.*, 2019; VINCENT *et al.*, 2026). Dessa forma, a inibição do ACC poderia comprometer um componente central da rede responsável pela evocação da memória remota, dificultando o acesso ou a integração dessas representações e resultando na supressão da resposta de medo.

Isso reforça a ideia de que a contribuição neocortical na formação e evocação de memórias não é homogênea, com algumas regiões podendo apresentar maior especialização funcional no circuito ou participando de múltiplas funções compartilhadas por diferentes redes, de modo que essa redundância funcional pode ser compensada por outras áreas corticais e subcorticais funcionalmente relacionadas (DIXSAUT; GRÄFF, 2022), preservando a evocação da memória e a expressão do medo mesmo quando sua atividade é reduzida. Consequentemente, a supressão do medo remoto observada após a inibição do ACC sugere que essa estrutura desempenha um papel mais indispensável e menos redundante na rede que sustenta a memória remota em comparação ao PLC.

Reconhecemos ainda que outra limitação do presente estudo foi a ausência do uso de ratas fêmeas, de modo que nossos resultados não podem ser generalizados para ambos os sexos. Entretanto, estudos prévios conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o perfil de consolidação da memória apresenta características sexo-específicas (CRESTANI *et al.*, 2022; LOTZ *et al.*, 2025), reforçando a importância de considerar essa variável em investigações futuras. Estudos mostram que fêmeas apresentam generalização contextual do medo mais rápida do que machos, um efeito associado à ativação do receptor de estrogênio β (LYNCH *et al.*, 2013; LYNCH *et al.*, 2014). De forma consistente, em ratas adultas ovariectomizadas a administração tanto aguda quanto crônica de estradiol acelera a generalização, enquanto, em machos gonalectomizados, a injeção de testosterona favorece a manutenção da precisão da memória (LYNCH *et al.*, 2013; LYNCH *et al.*, 2016). Esse padrão, entretanto, parece depender da fase do desenvolvimento: na adolescência, fêmeas discriminam os contextos até cerca de 14 dias após o treino e passam a generalizar posteriormente, ao passo que machos não exibem discriminação em nenhum dos tempos avaliados (CRESTANI *et al.*, 2022). Nesse período de desenvolvimento, a ovariectomia em fêmeas adolescentes antecipa a generalização, reforçando o papel do estrógeno e de diferenças maturacionais nos circuitos de memória. Além disso, Lotz *et al.* (2025) observaram que diferentes características contextuais podem adquirir relevância distinta para machos e fêmeas ao longo do tempo.

Embora a influência hormonal na consolidação da memória esteja fora do escopo deste estudo, há evidências de que diferenças sexuais na expressão do medo aprendido podem estar associadas à atividade persistente do PLC. Por exemplo, Fenton *et al.* (2014) mostraram que fêmeas exibem maior expressão do medo durante a extinção e sua evocação, além de maior recuperação espontânea e maior medo contextual basal, efeitos associados à atividade sustentada do PLC.

6.1 ASPECTOS METODOLÓGICOS

6.1.1 Conteúdo de proteínas expressas por genes precoces

É importante considerar também que a expressão da proteína c-Fos não deve ser interpretada apenas como um marcador binário de ativação neuronal, mas sim

como um processo dinâmico e dependente do tempo. A ativação neuronal induz rapidamente a transcrição de RNA intrônico de c-Fos no núcleo, que posteriormente sofre *splicing* para gerar RNA maduro, exportado ao citoplasma para a síntese da proteína c-Fos (Figura 2). Ao comparar RNA intrônico, RNA maduro e proteína c-Fos no PLC, Molina *et al.* (2025) demonstraram que a quantificação isolada da proteína c-Fos pode subestimar a ativação neuronal, especialmente após exposições breves ao estresse. O estudo mostrou que o RNA intrônico surge precocemente, seguido pelo aumento do RNA maduro, enquanto a proteína c-Fos apresenta uma dinâmica temporal distinta, indicando que cada marcador reflete uma etapa específica da resposta celular. Notavelmente, os autores identificaram neurônios c-Fos$^+$ precocemente, entre 8 e 15 minutos após o início da exposição ao estresse, indicando rápida tradução proteica. Além disso, o número de neurônios mRNA$^+$ continuou aumentando mesmo após o retorno dos animais à condição de *home cage*, sugerindo que a maturação do c-Fos depende de atividade transcricional sustentada, a qual também se mostrou diretamente associada à duração do estresse.

Corroborando essa interpretação, Ivashkina *et al.* (2016) demonstraram que a expressão proteica de c-Fos e ARC no hipocampo pós-CFC apresenta um padrão bifásico, com um pico inicial entre 15-30 minutos e uma segunda onda menos pronunciada entre 1-3 horas após o treino. Esses achados reforçam que a expressão dessas proteínas codificadas por IEGs não segue um padrão linear, mas sim dinâmico e oscilatório ao longo do tempo, de modo que diferentes janelas de coleta podem refletir fases distintas da resposta neuronal, nem sempre reproduzindo o padrão de ativação mais amplamente reportado na literatura (ver sessão 1.2.1.1).

As dissecações dos tecidos para a análise do conteúdo de proteínas codificadas por IEGs foram realizadas 90 minutos após o teste, intervalo amplamente descrito para a detecção de c-Fos (GOSHEN *et al.*, 2011; DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015; DIXSAUT; GRÄFF, 2022; LEE *et al.*, 2023; TENG *et al.*, 2023; CAMPOS-CARDOSO *et al.*, 2024; LUFT *et al.*, 2024; GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026), e o *western blot* foi conduzido utilizando a fração citosólica do lisado tecidual. No entanto, considerando que c-Fos exerce parte de sua função no núcleo (HE; YAMADA; NABESHIMA, 2002; MAU; HASSELMO; CAI, 2020), é possível que alterações em seu conteúdo nuclear não tenham sido detectadas por essa abordagem, o que pode ter contribuído tanto para a ausência de diferenças

expressivas entre os grupos (Figura 21) quanto para a detecção de correlações consistentes entre sua expressão e o desempenho comportamental dos ratos no CFC (Figura 23), caso estas de fato existam. Além disso, a escolha de uma única janela temporal pode não ter capturado integralmente a dinâmica de expressão proteica de ARC e c-Fos. Adicionalmente, a comparação desses marcadores com os níveis observados 2 dias após o treinamento fortaleceria a interpretação acerca da ausência de recrutamento compensatório do ACC.

Outro problema que se observa no ACC é a presença de duas bandas na marcação de c-Fos. Embora não tenha sido possível determinar com precisão a origem desse padrão, algumas possibilidades podem ser consideradas. A hipótese de ligação inespecífica do anticorpo parece menos provável, uma vez que foi utilizado um anticorpo monoclonal para a proteína e sua marcação foi avaliada nas primeiras incubações, antes da detecção de ARC e α-tubulina. Diante disso, ambas bandas foram incluídas na quantificação (APÊNDICE C). Uma possível explicação seria a ocorrência de modificações pós-traducionais capazes de alterar discretamente o peso molecular aparente da proteína, embora esse padrão não tenha sido observado no PLC. Alternativamente, a presença de duas bandas poderia estar relacionada à fragmentação proteica durante o processamento das amostras. No entanto, essa possibilidade também parece menos provável, uma vez que o padrão de banda dupla foi consistentemente observado em todos os grupos de amostras do ACC.

Cabe destacar ainda uma limitação importante metodológica da análise por *western blot*. Como o conteúdo proteico foi normalizado pela α-tubulina e, posteriormente, pelo grupo controle (veículo), assume-se que o PLC e o ACC do grupo veículo apresentam o mesmo nível basal de expressão, arbitrariamente definido como 100%. No entanto, é provável que essas regiões apresentem níveis basais de ativação intrinsecamente distintos, de modo que esse procedimento de normalização possa mascarar diferenças regionais na expressão proteica, dificultando a comparação direta entre as estruturas. Nesse contexto, a inclusão de um grupo *home cage* constituiria um controle mais adequado para comparações entre regiões corticais. Ainda assim, na comparação dentro de uma mesma estrutura, observou-se que a administração de muscimol não alterou os níveis das proteínas avaliadas em relação aos respectivos veículos (Figura 21), sugerindo que a inativação farmacológica não promoveu mudanças detectáveis na expressão dessas proteínas no intervalo

temporal avaliado. Dessa forma, estudos futuros poderão investigar diferentes intervalos de coleta, incluir a comparação entre os distintos tempos do protocolo de CFC e empregar abordagens complementares, como a imuno-histoquímica, proporcionando uma caracterização espacial e temporal mais precisa da expressão de ARC e c-Fos.

6.1.2 Consequências da cirurgia e observações comportamentais

Convém também ressaltar que algumas particularidades metodológicas merecem ser consideradas. Com o objetivo de minimizar possíveis interferências e garantir maior precisão na interpretação dos resultados, o mesmo animal não foi testado sequencialmente nos contextos A e B, ou vice-versa, uma vez que a reexposição a um contexto conhecido ou a pré-exposição a um contexto novo pode interferir na expressão da memória no teste subsequente (HADZIBEGOVIC *et al.*, 2025). Ainda assim, aspectos inerentes ao protocolo experimental devem ser levados em consideração na interpretação desses achados. Dentre eles, destaca-se a diferença no intervalo entre a cirurgia e o procedimento comportamental: no experimento de memória recente, a canulação foi realizada 5-7 dias antes do treino, enquanto, no experimento de memória remota, o procedimento cirúrgico ocorreu após o treino e antes do teste, sendo realizado entre os dias 21-23 para o protocolo de 28 dias, e 38-40 para o de 45 dias. Essa diferença ocorre, pois, a durabilidade do capacete é limitada, e com o passar do tempo as cânulas entopem ou o animal acaba descolado o capacete, expondo o escapo, o qual fica propenso a infeccionar. Entretanto, os animais submetidos à cirurgia antes do teste não apresentaram déficits da capacidade de aquisição da memória, em relação ao canulados em períodos posteriores e testados para a memória remota (Figura 29).

Vale ressaltar que devido à passagem de um seio venoso medial acima da região pré-límbica (DIAS *et al.*, 2021), optou-se pela realização da cirurgia com inclinação de 15°, a fim de desviar dessa estrutura e evitar que seu rompimento causasse hemorragias ou obstruções das cânulas. A cirurgia não prejudicou a capacidade locomotora dos animais, como observado no teste de campo aberto (Figura 24). Contudo, observou-se que os animais apresentaram um comportamento de *freezing* significativamente reduzido durante o teste, em relação a trabalhos já publicados pelo laboratório (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; HAUBRICH *et al.*,

2016). No intuito de verificar se o ângulo poderia estar causando algum prejuízo, testamos realizar a cirurgia sem ângulo, e para evitar o entupimento das cânulas por coágulos, em caso de sangramento, introduzimos um mandril dentro das cânulas, após a cirurgia. Além disso, prendemos o capacete com dois parafusos, para garantir que antes do teste, quando os mandris fossem retirados, o capacete permaneceria preso evitando maiores desconfortos para o animal. No entanto, uma vez que vimos que o percentual de *freezing* permaneceu baixo e não foi encontrada discriminação entre os contextos A e B, aos 2 dias (Figura 26), como esperado para ratos machos adultos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013), acreditamos que o procedimento de retirada do mandril seja um processo muito estressante para o animal. Além disso, durante as infusões, pós-retirada do mandril, houve vários casos de sangramento pela cânula, o que desfavoreceu a precisão de infusão da droga.

Convêm mencionar que outros estudos relataram observações semelhantes, com redução da resposta de *freezing* em animais controle (e.g., veículo) submetidos à microinfusão, em comparação àqueles avaliados exclusivamente em testes comportamentais, sem canulação prévia (SANTOS *et al.*, 2017; CRESTANI *et al.*, 2022). Experimentos adicionais realizados por Santos *et al.* (2017) indicaram que o procedimento de microinfusão pode atuar como um evento estressor agudo, atenuando a resposta de medo condicionada. Em relação a respostas ao estresse, estudos têm demonstrado uma correlação entre a atividade aumentada do PLC com níveis de maior ansiedade. Utilizando imageamento endoscópico de cálcio *in vivo* em ratos (machos e fêmeas) submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), Smoak *et al.* (2024) demonstraram que animais apresentam maior atividade no PLC ao entrar nos braços abertos e menor frequência de entradas nesses braços em comparação aos braços fechados, indicando que a atividade dessa região está associada a um maior comportamento do tipo ansioso e à evitação. Corroborando com esses achados, estudos que empregaram lesões (LACROIX *et al.*, 2000) ou inativação farmacológica do mPFC (GREEN *et al.*, 2020), bem como a inibição optogenética da via PLC-BLA, demonstraram aumento da exploração dos braços abertos no LCE.

Entretanto, outros trabalhos não encontraram qualquer relação entre a atividade do PLC e o comportamento tipo-ansioso (SHIMIZU; MINAMI; MITANI, 2018), ou observaram efeitos opostos, em que a estimulação do PLC demonstrou efeito

ansiolítico (WANG *et al.*, 2015). Soma-se a isso a complexidade da organização funcional do mPFC, uma vez que resultados divergentes entre estudos podem decorrer não apenas de mecanismos compensatórios ou de diferenças nos procedimentos experimentais, mas também da localização específica das infusões ou manipulações nessa região. O envolvimento diferencial de suas sub-regiões no processamento mnemônico pode, portanto, explicar parte das inconsistências observadas na literatura (CAMPOS-CARDOSO *et al.*, 2024).

A ausência de efeito do muscimol aos 28 e 45 dias talvez devesse ser interpretada com cautela, uma vez que níveis relativamente baixos de congelamento reduzem a sensibilidade para detectar diferenças adicionais nesse comportamento. Essa consideração é particularmente relevante aos 28 dias, pois, embora a comparação entre os grupos VEH e MUS testados no contexto A não tenha alcançado significância estatística ($p = 0,277$), foi observado um tamanho de efeito moderado ($g = 0,64$), sugerindo uma tendência que merece ser examinada em estudos com maior poder estatístico e por meio de replicações independentes. Em contraste, aos 45 dias, a ausência de significância ($p = 0,964$) foi acompanhada de um tamanho de efeito pequeno ($g = 0,18$), reforçando a consistência da ausência de efeito nessa condição. Dentro do espírito da reforma estatística nas ciências comportamentais para combater a crise de replicabilidade (KORBMACHER *et al.*, 2023), é recomendável mostrar-se o tamanho do efeito junto à significância “p” mesmo quando não se acharam diferenças significativas, especialmente quando se trata de amostras pequenas e o poder estatístico é baixo, pois isso ajuda a compreendê-las melhor (KLINE, 2013).

Nesse contexto, sugere-se que a utilização de um protocolo de treinamento mais intenso poderia elevar os níveis basais de congelamento e minimizar essa potencial limitação. Esse aumento da intensidade do treinamento poderia ser obtido por meio da elevação da intensidade do choque, do número de choques ou da combinação de ambos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; PEDRAZA *et al.*, 2016; GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2023; GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026). Vale ressaltar, no entanto, que a intensidade do treinamento é capaz de modular o perfil temporal da consolidação sistêmica, de modo que experiências mais aversivas podem acelerar esse processo e favorecer a generalização da memória (PEDRAZA *et al.*, 2016). Portanto, qualquer alteração na intensidade do treinamento deve considerar seus potenciais efeitos não apenas sobre os níveis de congelamento, mas também

sobre os mecanismos mnemônicos investigados (ver seção 1.5.1). Entretanto, estudos futuros poderão empregar diferentes protocolos de treinamento para testar a robustez da ausência de participação do PLC na evocação remota.

Por fim, conforme discutido na Introdução (seção 1.6.1), o muscimol apresenta difusão relativamente limitada no tecido encefálico. Embora, neste estudo, a extensão dessa difusão não tenha sido avaliada diretamente e não tenham sido realizados experimentos de curva de dose ou de diferentes volumes de infusão, a interpretação dos resultados foi baseada em evidências da literatura, nas quais a mesma abordagem farmacológica produz efeitos dependentes da estrutura encefálica e do intervalo de retenção investigados (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; SOTRES-BAYON *et al.*, 2012; STERN *et al.*, 2013; DO-MONTE; QUIÑONES-LARACUENTE; QUIRK, 2015; HAUBRICH *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; CRESTANI *et al.*, 2018; TINTORELLI *et al.*, 2020). Assim, a ausência de efeito observada em determinados tempos é compatível com uma participação diferencial dessas regiões na consolidação sistêmica. Ainda assim, estudos futuros empregando diferentes doses e volumes de infusão poderão contribuir para refinar essa interpretação.

6.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, os resultados deste trabalho indicam que o PLC desempenha um papel na consolidação sistêmica da memória de medo condicionado ao contexto substancialmente distinto daquele observado em regiões vizinhas, em particular o ACC – uma das áreas de maior interesse no estudo da consolidação sistêmica devido ao seu recrutamento durante a evocação de memórias remotas e ao prejuízo dessa evocação após sua inibição, fenômenos demonstrados tanto por nosso laboratório quanto por outros grupos de pesquisa. De forma inesperada, o PLC apresentou um padrão de resposta mais próximo ao do hipocampo do que ao de sua vizinhança cortical imediata, o que contrasta com a expectativa inicial baseada exclusivamente em sua posição anatômica. Entretanto, esse achado é coerente com a literatura que descreve o PLC como mediador da expressão da resposta de medo por meio de conexões com a amígdala (VIDAL-GONZALEZ *et al.*, 2006; QUIÑONES-LARACUENTE; VEGA-MEDINA; QUIRK, 2021), sendo esta resposta comportamental a mesma utilizada no paradigma de CFC como medida de evocação da memória. Essa convergência levanta a possibilidade de que o efeito inicialmente interpretado

como relacionado à evocação mnemônica reflita, ao menos em parte, à modulação da expressão do medo.

Essa hipótese foi diretamente testada por meio de uma tarefa não aversiva de OL, permitindo dissociar componentes mnêmicos de possíveis efeitos sobre a expressão de medo. Em conjunto, os dados obtidos sugerem que o efeito observado no PLC pode mascarar, ou ao menos enviesar, uma interpretação puramente mnemônica, sendo mais compatível com um papel predominante na modulação da expressão do medo em determinadas condições experimentais. Nesse contexto, os resultados suportam duas implicações principais. Primeiro, não se pode assumir que todas as regiões neocorticais envolvidas na evocação de memórias consolidadas sistemicamente contribuam de forma equivalente ou homogênea para esse processo, uma vez que o PLC apresentou um perfil marcadamente distinto das demais áreas anteriormente caracterizadas (DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2012; HAUBRICH *et al.*, 2016; QUILLFELDT, 2019). Trata-se da divergência mais pronunciada observada até o momento entre as regiões investigadas pelo LPBNC. Anteriormente, o córtex entorrinal, já havia apresentado um padrão diferenciado, exibindo um perfil intermediário entre hipocampo e ACC (QUILLFELDT, 2019), em contraste com a expectativa de maior similaridade funcional entre essas regiões, reforçando a ideia de um gradiente funcional ao longo das estruturas envolvidas na consolidação sistêmica e a importância dos estudos conduzidos pelo nosso laboratório para compreender essa heterogeneidade funcional.

Segundo, embora diversas regiões encefálicas participem simultaneamente de múltiplas funções cognitivas, possivelmente por meio de populações neuronais parcialmente sobrepostas, nossos dados sugerem que o PLC exerce um papel mais especializado nas fases iniciais da consolidação sistêmica. Nesse período, sua contribuição parece estar mais relacionada à expressão do medo do que à evocação do traço mnêmico propriamente dito, especialmente durante os primeiros dias ou semanas após a aprendizagem. Entretanto, isso não implica que a participação do PLC se restrinja às memórias recentes, uma vez que diversos estudos também sugerem seu envolvimento na evocação de memórias remotas (DENARDO *et al.*, 2019; GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026). Uma possibilidade é que, ao longo da consolidação sistêmica, sua contribuição passe a ocorrer de forma mais distribuída, integrando uma rede cortical mais ampla e compartilhando funções com

outras estruturas. Nesse cenário, o PLC deixaria de exercer um papel tão especializado e passaria a desempenhar funções parcialmente redundantes, tornando sua perda transitória mais passível de compensação por outros circuitos. Em contraste, o ACC parece desempenhar um papel mais central na evocação propriamente dita de memórias remotas. Embora também faça parte de uma rede distribuída, sua contribuição pode ser menos redundante e, portanto, menos suscetível à compensação por outros circuitos. Isso poderia explicar por que a inativação do PLC não alterou o congelamento aos 28 dias, enquanto manipulações do ACC frequentemente produzem déficits robustos na evocação de memórias remotas (HAUBRICH *et al.*, 2016).

Por outro lado, os dados de *western blot* foram menos conclusivos. Assim, caso existam mesmo tais mecanismos compensatórios, eles poderiam envolver outras regiões encefálicas ainda não investigadas. Alternativamente, não excluímos a possibilidade de que o próprio ACC participe desse processo compensatório; contudo, a abordagem empregada – incluindo os marcadores analisados e o momento da coleta do tecido – pode não ter sido suficientemente sensível para detectar tais alterações. Ainda assim, os resultados revelaram a existência de perfis bioquímicos distintos entre as regiões estudadas, reforçando a ideia de que ACC e PLC desempenham papéis funcionais diferentes na consolidação e evocação da memória.

Em síntese, nossos dados sugerem que, na memória recente, o PLC está mais relacionado à expressão do medo – possivelmente por meio de suas interações com a amígdala – do que ao armazenamento ou à evocação do conteúdo mnêmico propriamente dito. Já na memória remota, o PLC parece não desempenhar sequer essa função, o que é consistente com outro tipo de reorganização anatômico-funcional, descrita principalmente pelo grupo de Greg Quirk, na qual seu papel na resposta de medo seria substituído ou compensado por outras áreas encefálicas, possivelmente por meio de circuitos envolvendo o PVT, como sugerido por diversos autores (QUIÑONES-LARACUENTE; VEGA-MEDINA; QUIRK, 2021; GOLBABAEI; JOSSELYN; FRANKLAND, 2026), embora essa hipótese ainda necessite de investigação específica.

Assim, embora a consolidação sistêmica envolva algum grau de reorganização neuroanatômica entre as áreas ativamente responsáveis pela evocação em si dos

traços de memória (os "engramas"), a perda da participação do PLC na expressão do medo, acompanhada de sua aparente compensação por circuitos ainda desconhecidos, pode representar um segundo tipo de reorganização anátomo-funcional: semelhante, mas conceitualmente distinta daquela originalmente descrita pela consolidação sistêmica, que almejávamos observar. Essa interpretação permanece especulativa e precisará ser testada diretamente em estudos futuros, mas é compatível com o conjunto de dados obtidos neste trabalho.

Portanto, nossos achados não chegam a contradizer a literatura prévia, mas indicam que a participação do PLC em tarefas de medo condicionado pode ter sido interpretada sob uma perspectiva excessivamente centrada na memória na maioria dos estudos. Como a manipulação experimental dessa região sempre teve o potencial de afetar simultaneamente a evocação do traço mnêmico e a expressão comportamental do medo que o quantifica (em tarefas aversivas, como o CFC), a distinção entre esses dois processos torna-se problemática, podendo inclusive levar à detecção de "falsos positivos", como parece ter sido o nosso caso.

6.3 PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, pretendemos investigar diferentes intervalos entre a sessão de teste e a eutanásia, bem como padronizar protocolos de imuno-histoquímica, visando otimizar a detecção dos das proteínas c-Fos e ARC e aprimorar a caracterização da atividade neuronal associada à evocação da memória. Essa abordagem também possibilitará investigar subpopulações celulares específicas que compõem os conjuntos neuronais recrutados, aspecto particularmente relevante diante da heterogeneidade dos microcircuitos do PLC. Estudos recentes indicam, por exemplo, que interneurônios que expressam somatostatina constituem uma parcela expressiva do conjunto neuronal ativado pelo medo no PLC e podem promover a desinibição de neurônios principais por meio da inibição de interneurônios que expressam parvalbumina (CUMMINGS; CLEM, 2020; CUMMINGS *et al.*, 2022). Assim, a análise da identidade celular das populações recrutadas poderá fornecer uma compreensão mais precisa da microcircuitaria envolvida na evocação da memória.

De forma complementar, prevemos a inclusão de um grupo *home cage* que fornecerá uma medida basal de expressão desses marcadores, servindo como

referência para a interpretação dos resultados obtidos nos grupos experimentais. Após o refinamento das técnicas, conforme proposto no objetivo específico (c), pretende-se avaliar o conteúdo de proteínas codificadas por IEGs no PLC e no ACC em animais treinados no CFC e testados aos 2 e 45 dias, com possibilidade de replicação do intervalo de 28 dias para melhorar a resolução dos dados.

Adicionalmente, com o objetivo de tornar as análises do teste de campo aberto (seção 4.3.3) mais robustas, pretendemos quantificar o tempo de permanência dos animais nas regiões central e periférica da arena, parâmetros amplamente utilizados na avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade, além da velocidade e distância percorrida. Para isso, o rastreamento da posição dos animais ao longo do teste (*tracking*) e a geração de mapas de calor (*heatmaps*) estão sendo realizados com o auxílio do DeepLabCut, permitindo uma análise comportamental mais detalhada e automatizada (Figura 29).

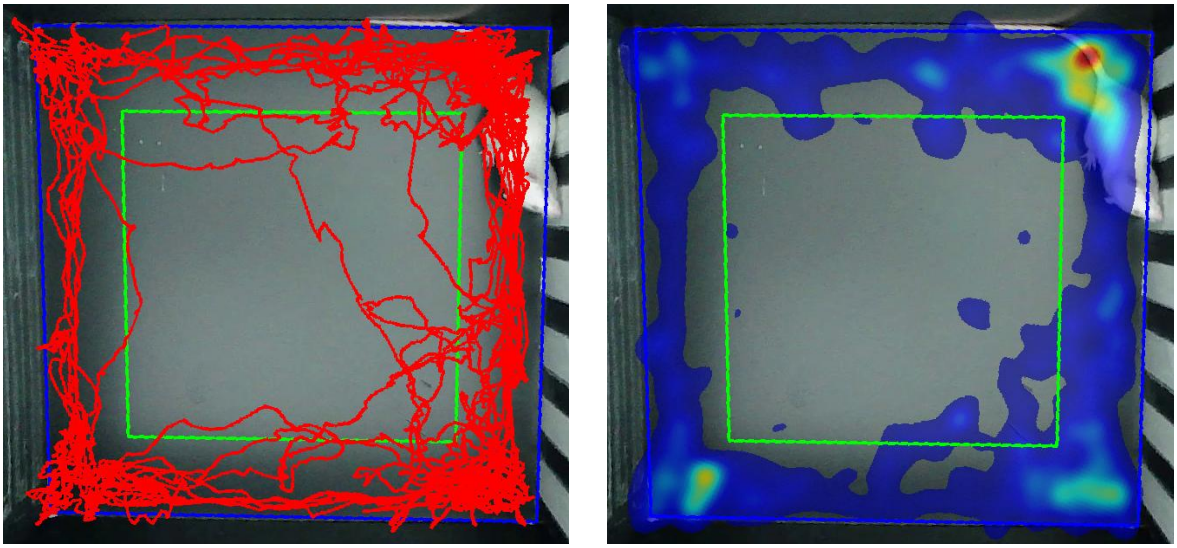

Figura 29 – Avaliação computadorizada de rastreio no campo aberto.

7 CONCLUSÕES

a) No CFC, a infusão de muscimol pré-teste reduziu significativamente o *freezing* aos 2 dias, sugerindo inicialmente que o PLC participa da expressão da memória recente, assim como o hipocampo dorsal, e/ou expressão de componente aversivo da memória. Os animais foram capazes de discriminar o contexto A do contexto B apenas no teste recente (2 dias), entretanto foi observada uma generalização contextual quando a memória foi evocada em períodos mais remotos (28 e 45 dias). Curiosamente, o muscimol não afetou os níveis de *freezing* nos testes de 28 e 45 dias, sugerindo que o PLC não é mais necessário para a evocação do medo em memórias remotas, ou que sua função poderia estar sendo compensada pela atividade de outras estruturas;

b) No teste de OL, os grupos exploraram mais o objeto deslocado em relação ao que manteve posição fixa, indicando evocação intacta da memória espacial. Em conjunto com a ausência de efeito do muscimol sobre a memória remota de medo condicionado, esse resultado sugere que a redução do *freezing* observada no teste recente de CFC reflete a inibição da expressão do medo, e não um déficit de evocação.

c) A quantificação de c-Fos e ARC não revelou evidências de recrutamento compensatório do ACC em resposta à perda transitória de função do PLC durante a evocação da memória remota. Esses resultados sugerem que, após a consolidação sistêmica, a evocação da memória pode depender de uma rede cortical mais distribuída, na qual a participação do PLC não é estritamente necessária. Além disso, eventuais mecanismos compensatórios podem envolver outras regiões ou circuitos neurais não avaliados neste estudo. Adicionalmente, os resultados de *western blot* evidenciaram padrões distintos de correlação bioquímica entre as regiões analisadas, o que sugere que ACC e PLC podem apresentar contribuições funcionais diferenciadas para os processos de consolidação e evocação da memória.

d) A cirurgia estereotáxica em ângulo de 15° não prejudicou a atividade exploratória dos animais no teste do campo aberto. Além disso, essa abordagem mostrou-se superior à cirurgia de 0°, por estar associada a uma menor incidência de obstrução das cânulas, redução do sangramento e menor estresse dos animais durante as infusões. Por fim, os animais apresentaram aprendizado do condicionamento, evidenciado pelo aumento do comportamento de *freezing* durante o teste em comparação ao período pré-treino.

8 REFERÊNCIAS

ABDOU, K.; SHEHATA, M.; CHOKO, K.; NISHIZONO, H. *et al.* Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. **Science**, v. 360, n. 6394, p. 1227-1231, 2018.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. 30873, 2007.

ALLEN, T. A.; NARAYANAN, N. S.; KHOLODAR-SMITH, D. B.; ZHAO, Y. *et al.* Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. **J Neurosci Methods**, v. 171, n. 1, p. 30-38, 2008.

AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Prog Brain Res**, v. 163, p. 3-22, 2007.

ANGLADA-FIGUEROA, D.; QUIRK, G. J. Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 42, p. 9680-9685, 2005.

ANTONIADIS, E. A.; MCDONALD, R. J. J. B. b. r. Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. **Behavioural Brain Research**, v. 108, n. 1, p. 1-19, 2000.

ARAI, M.; OSANAI, H.; SNELL, C. C.; GAWF, K. E. *et al.* Combinative Protein Expression of Immediate Early Genes c-Fos, Arc, and Npas4 Along Aversive and Appetitive Experience-Related Neural Networks. **Hippocampus**, v. 35, n. 5, p. e70030, 2025.

ASOK, A.; KANDEL, E. R.; RAYMAN, J. B. The Neurobiology of Fear Generalization. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 329, 2018.

ASOK, A.; LEROY, F.; RAYMAN, J. B.; KANDEL, E. R. J. T. i. n. Molecular mechanisms of the memory trace. **Trends in neurosciences**, v. 42, n. 1, p. 14-22, 2019.

BARKER, G. R.; BIRD, F.; ALEXANDER, V.; WARBURTON, E. C. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2948-2957, 2007.

BAYLEY, P. J.; SQUIRE, L. R. J. H. Failure to acquire new semantic knowledge in patients with large medial temporal lobe lesions. **Hippocampus**, v. 15, n. 2, p. 273-280, 2005.

BEEMAN, C. L.; BAUER, P. S.; PIERSON, J. L.; QUINN, J. J. J. L. *et al.* Hippocampus and medial prefrontal cortex contributions to trace and contextual fear memory expression over time. **Learning & Memory**, v. 20, n. 6, p. 336-343, 2013.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. J. N.; REVIEWS, B. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565-572, 2011.

BENINGER, R. J.; INGLES, J. L.; MACKENZIE, P. J.; JHAMANDAS, K. *et al.* Muscimol injections into the nucleus basalis magnocellularis of rats: selective impairment of working memory in the double Y-maze. **Brain Research**, v. 597, n. 1, p. 66-73, 1992.

BERGSTROM, H. C. The neurocircuitry of remote cued fear memory. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 71, p. 409-417, 2016.

BERRETTA, S.; PANTAZOPOULOS, H.; CALDERA, M.; PANTAZOPOULOS, P. *et al.* Infralimbic cortex activation increases c-Fos expression in intercalated neurons of the amygdala. **Neuroscience**, v. 132, n. 4, p. 943-953, 2005.

BIAN, X. L.; QIN, C.; CAI, C. Y.; ZHOU, Y. *et al.* Anterior Cingulate Cortex to Ventral Hippocampus Circuit Mediates Contextual Fear Generalization. **The Jornal of Neuroscience**, v. 39, n. 29, p. 5728-5739, 2019.

BITTNER, K. C.; GRIENBERGER, C.; VAIDYA, S. P.; MILSTEIN, A. D. *et al.* Conjunctive input processing drives feature selectivity in hippocampal CA1 neurons. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1133-1142, 2015.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative Psychology**, v. 81, n. 2, p. 281, 1972.

BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behaviors of laboratory and wild Rattus norvegicus. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 2, p. 101, 1986.

BLUM, S.; HEBERT, A. E.; DASH, P. K. A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. **Neuroreport**, v. 17, n. 3, p. 341-344, 2006.

BOTTERILL, J. J.; KHLAIFIA, A.; APPINGS, R.; WILKIN, J. *et al.* Dorsal peduncular cortex activity modulates affective behavior and fear extinction in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 49, n. 6, p. 993-1006, 2024.

BRAMHAM, C. R.; ALME, M. N.; BITTINS, M.; KUIPERS, S. D. *et al.* The Arc of synaptic memory. **Exp Brain Res**, v. 200, n. 2, p. 125-140, 2010.

BULTHUIS, N. E.; QUINTANA, L. I.; STACKMANN, M.; DENNY, C. A. Immediate-early genes Arc and c-Fos show divergent brain-wide expression following contextual fear conditioning. **Communications Biology**, v. 8, n. 1, p. 1452, 2025.

CAIN, D. P.; SAUCIER, D.; HALL, J.; HARGREAVES, E. L. *et al.* Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. v. 110, n. 1, p. 86, 1996.

CAMPOS-CARDOSO, R.; DESA, Z. R.; FITZGERALD, B. L.; MOORE, A. G. *et al.* The mouse dorsal peduncular cortex encodes fear memory. **Cell Rep**, v. 43, n. 4, p. 114097, 2024.

CASSINI, L. F.; SIERRA, R. O.; HAUBRICH, J.; CRESTANI, A. P. *et al.* Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. **Hippocampus**, v. 23, n. 10, p. 931-941, 2013.

CHEN, Y.; WANG, X.; XIAO, B.; LUO, Z. *et al.* Mechanisms and Functions of Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein in Synaptic Plasticity. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 10, p. 5738-5754, 2023.

CHO, J. H.; RENDALL, S. D.; GRAY, J. M. Brain-wide maps of Fos expression during fear learning and recall. **Learning & Memory**, v. 24, n. 4, p. 169-181, 2017.

CHOI, D. C.; MAGUSCHAK, K. A.; YE, K.; JANG, S. W. *et al.* Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. **PNAS**, v. 107, n. 6, p. 2675-2680, 2010.

CHUNG, L. A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. **Dev Reprod**, v. 19, n. 2, p. 61-67, 2015.

CLAES, M.; DE GROEF, L.; MOONS, L. The DREADDful Hurdles and Opportunities of the Chronic Chemogenetic Toolbox. **Cells**, v. 11, n. 7, 2022.

COHEN, N. J.; EICHENBAUM, H. **Memory, amnesia, and the hippocampal system**. MIT press, 1993. 0262531321.

CONTE, R.; LADD, F. V. L.; LADD, A. A. B. L.; MOREIRA, A. L. *et al.* Behavioral and stereological analysis of the prefrontal cortex of rats submitted to chronic alcohol intake. **Behavioural Brain Research**, v. 362, p. 21-27, 2019.

CORCORAN, K. A.; DONNAN, M. D.; TRONSON, N. C.; GUZMÁN, Y. F. *et al.* NMDA receptors in retrosplenial cortex are necessary for retrieval of recent and remote context fear memory. **The Journal of neuroscience**, v. 31, n. 32, p. 11655-11659, 2011.

CORCORAN, K. A.; QUIRK, G. J. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 840-844, 2007.

CORKIN, S. J. N. r. n. What's new with the amnesic patient HM? **Nature reviews neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 153-160, 2002.

CORRÊA, M. d. S.; DOS SANTOS VAZ, B.; GRISANTI, G. D. V.; DE PAIVA, J. P. Q. *et al.* Relationship between footshock intensity, post-training corticosterone release and contextual fear memory specificity over time. **bioRxiv**, p. 643098, 2019.

COWANSAGE, K. K.; SHUMAN, T.; DILLINGHAM, B. C.; CHANG, A. *et al.* Direct reactivation of a coherent neocortical memory of context. **Neuron**, v. 84, n. 2, p. 432-441, 2014.

CRESTANI, A. P.; LOTZ, F. N.; CASAGRANDE, M. A.; POPIK, B. *et al.* Adolescent female rats undergo full systems consolidation of an aversive memory, while males of the same age fail to discriminate contexts. **Behavioral Neuroscience**, v. 136, n. 2, p. 172-181, 2022.

CRESTANI, A. P.; QUILLFELDT, J. A. J. B. N. Can previous learning alter future plasticity mechanisms? **Behavioral Neuroscience**, v. 130, n. 1, p. 1, 2016.

CRESTANI, A. P.; SIERRA, R. O.; MACHADO, A.; HAUBRICH, J. *et al.* Hippocampal plasticity mechanisms mediating experience-dependent learning change over time. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 150, p. 56-63, 2018.

CUMMINGS, K. A.; BAYSHTOK, S.; DONG, T. N.; KENNY, P. J. *et al.* Control of fear by discrete prefrontal GABAergic populations encoding valence-specific information. **Neuron**, v. 110, n. 18, p. 3036-3052.e3035, 2022.

CUMMINGS, K. A.; CLEM, R. L. J. N. n. Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 61-74, 2020.

CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWMAN, K. E. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. *In*: BUCCAFUSCO, J. J. (Ed.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd ed. Boca Raton (FL), 2009. (Frontiers in Neuroscience).

DA SILVA, T. R.; SOHN, J. M. B.; ANDREATINI, R.; STERN, C. A. The role of prelimbic and anterior cingulate cortices in fear memory reconsolidation and persistence depends on the memory age. **Learning & Memory**, v. 27, n. 8, p. 292-300, 2020.

DAMASIO, A. R. J. C. Time-locked multiregional retroactivation: A systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. **Cognition**, v. 33, n. 1-2, p. 25-62, 1989.

DE OLIVEIRA ALVARES, L.; DO-MONTE, F. H. Understanding the dynamic and destiny of memories. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 125, p. 592-607, 2021.

DE OLIVEIRA ALVARES, L.; EINARSSON, E. Ö.; SANTANA, F.; CRESTANI, A. P. *et al.* Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. **Hippocampus**, v. 22, n. 5, p. 1092-1095, 2012.

DE OLIVEIRA ALVARES, L.; PASQUALINI GENRO, B.; DIEHL, F.; MOLINA, V. A. *et al.* Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1648-1655, 2008.

DE OLIVEIRA, L. A.; CRESTANI, A. P.; CASSINI, L.; HAUBRICH, J. *et al.* Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**, v. 244, p. 42-48, 2013.

DENARDO, L. A.; LIU, C. D.; ALLEN, W. E.; ADAMS, E. L. *et al.* Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 460-469, 2019.

DESMEDT, A.; GARCIA, R.; JAFFARD, R. Differential modulation of changes in hippocampal-septal synaptic excitability by the amygdala as a function of either elemental or contextual fear conditioning in mice. **The Journal of neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 480-487, 1998.

DEVALLE, F.; ZOU, L.; CECCHINI, G.; ROXIN, A. Representational drift as the consequence of ongoing memory storage. **Sci Rep**, v. 15, n. 1, p. 27746, 2025.

DIAS, M.; MARQUES-MORGADO, I.; COELHO, J. E.; RUIVO, P. *et al.* Transection of the Superior Sagittal Sinus Enables Bilateral Access to the Rodent Midline Brain Structures. **eNeuro**, v. 8, n. 4, p. ENEURO.0146-0121.2021, 2021.

DIXSAUT, L.; GRAEFF, J. J. I. j. o. m. s. The medial prefrontal cortex and fear memory: dynamics, connectivity, and engrams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12113, 2021.

DIXSAUT, L.; GRÄFF, J. Brain-wide screen of prelimbic cortex inputs reveals a functional shift during early fear memory consolidation. **Elife**, v. 11, 2022.

DO-MONTE, F. H.; QUIÑONES-LARACUENTE, K.; QUIRK, G. J. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. **Nature**, v. 519, n. 7544, p. 460-463, 2015.

DO MONTE, F. H.; QUIRK, G. J.; LI, B.; PENZO, M. A. J. M. p. Retrieving fear memories, as time goes by…. **Mol Psychiatry**, v. 21, n. 8, p. 1027-1036, 2016.

DRISCOLL, L. N.; DUNCKER, L.; HARVEY, C. D. Representational drift: Emerging theories for continual learning and experimental future directions. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 76, p. 102609, 2022.

DUNSMOOR, J. E.; PAZ, R. Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 336-343, 2015.

EDELINE, J. M.; HARS, B.; HENNEVIN, E.; COTILLON, N. Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, n. 1, p. 100-124, 2002.

EICHENBAUM, H. J. N. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 109-120, 2004.

EINARSSON, E.; PORS, J.; NADER, K. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 2, p. 480-487, 2015.

ERIKSEN, M. S.; BRAMHAM, C. R. Molecular physiology of Arc/Arg3.1: The oligomeric state hypothesis of synaptic plasticity. **Acta Physiologica**, v. 236, n. 3, p. e13886, 2022.

FALIAGKAS, L.; RAO-RUIZ, P.; KINDT, M. Emotional memory expression is misleading: delineating transitions between memory processes. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 19, p. 116-122, 2018.

FANSELOW, M. S. Factors governing one-trial contextual conditioning. **Animal Learning & Behavior**, v. 18, n. 3, p. 264-270, 1990.

FANSELOW, M. S.; POULOS, A. M. The neuroscience of mammalian associative learning. **Annu Rev Psychol**, v. 56, p. 207-234, 2005.

FANSELOW, M. S. J. B. b. r. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 110, n. 1-2, p. 73-81, 2000.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; BUCHNER, A.; LANG, A.-G. Statistical power analyses using G* Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. **Behavior Research Methods**, v. 41, n. 4, p. 1149-1160, 2009.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; LANG, A.-G.; BUCHNER, A. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, n. 2, p. 175-191, 2007.

FENTON, G. E.; POLLARD, A. K.; HALLIDAY, D. M.; MASON, R. *et al.* Persistent prelimbic cortex activity contributes to enhanced learned fear expression in females. **Learning & Memory**, v. 21, n. 2, p. 55-60, 2014.

FLORESCO, S. B.; SEAMANS, J. K.; PHILLIPS, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **J Neurosci**, v. 17, n. 5, p. 1880-1890, 1997.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature reviews neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 119-130, 2005.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B.; TALTON, L. E.; KACZMAREK, L. *et al.* The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 881-883, 2004.

FRANKLAND, P. W.; CESTARI, V.; FILIPKOWSKI, R. K.; MCDONALD, R. J. *et al.* The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 4, p. 863-874, 1998.

FRANKLAND, P. W.; JOSSELYN, S. A.; KÖHLER, S. J. N. n. The neurobiological foundation of memory retrieval. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 1576-1585, 2019.

FRANKLAND, P. W.; O'BRIEN, C.; OHNO, M.; KIRKWOOD, A. *et al.* α-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. v. 411, n. 6835, p. 309-313, 2001.

GALLO, M. J. N. p.; IMAGING, m. F. g. t. b. Reversible inactivation of brain circuits in learning and memory research. *In*: **Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging**, 2007. p. 157-173.

GAZARINI, L.; STERN, C. A. J.; BERTOGLIO, L. J. On making (and turning adaptive to) maladaptive aversive memories in laboratory rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 147, p. 105101, 2023.

GENRO, B. P.; DE OLIVEIRA ALVARES, L.; QUILLFELDT, J. A. J. N. o. L.; MEMORY. Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 4, p. 355-360, 2012.

GILBOA, A.; WINOCUR, G.; GRADY, C. L.; HEVENOR, S. J. *et al.* Remembering our past: functional neuroanatomy of recollection of recent and very remote personal events. **Cerebral Cortex**, v. 14, n. 11, p. 1214-1225, 2004.

GOLBABAEI, A.; COELHO, C. A. O.; DE SNOO, M. L.; DE CRISTOFARO, A. *et al.* Neurogenesis-dependent transformation of hippocampal memory traces during systems consolidation. **Current Biology**, v. 35, n. 20, p. 4959-4969.e4954, 2025.

GOLBABAEI, A.; JOSSELYN, S. A.; FRANKLAND, P. W. PV-dependent reorganization of prelimbic cortex sub-engrams during systems consolidation. **Neuron**, v. 114, n. 1, p. 142-158.e146, 2026.

GOOSENS, K. A.; MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. **Learning & Memory**, v. 8, n. 3, p. 148-155, 2001.

GOSHEN, I.; BRODSKY, M.; PRAKASH, R.; WALLACE, J. *et al.* Dynamics of retrieval strategies for remote memories. **Cell and Tissue Research**, v. 147, n. 3, p. 678-689, 2011.

GREEN, T. A.; BARACZ, S. J.; EVERETT, N. A.; ROBINSON, K. J. *et al.* Differential effects of GABAA receptor activation in the prelimbic and orbitofrontal cortices on anxiety. v. 237, n. 11, p. 3237-3247, 2020.

GUTHRIE, E. R. J. P. r. Conditioning as a principle of learning. **Psychological Review**, v. 37, n. 5, p. 412, 1930.

HADZIBEGOVIC, S.; ZHU, L.; GINGER, M.; GUEIDÃO COSTA, M. *et al.* Early intrinsic excitability plasticity of neocortical engram neurons defines memory formation and precision. **Nature Communications**, v. 17, n. 1, p. 291, 2025.

HALLOCK, H. L.; QUILLIAN, H. M. t.; MAYNARD, K. R.; MAI, Y. *et al.* Molecularly Defined Hippocampal Inputs Regulate Population Dynamics in the Prelimbic Cortex to Suppress Context Fear Memory Retrieval. **Biol Psychiatry**, v. 88, n. 7, p. 554-565, 2020.

HAN, D. H.; PARK, P.; CHOI, D. I.; BLISS, T. V. P. *et al.* The essence of the engram: Cellular or synaptic? **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 125, p. 122-135, 2022.

HAN, J.-H.; KUSHNER, S. A.; YIU, A. P.; HSIANG, H.-L. *et al.* Selective erasure of a fear memory. v. 323, n. 5920, p. 1492-1496, 2009.

HAUBRICH, J.; CASSINI, L. F.; DIEHL, F.; SANTANA, F. *et al.* Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. **Hippocampus**, v. 26, n. 7, p. 924-932, 2016.

HE, J.; YAMADA, K.; NABESHIMA, T. A Role of Fos Expression in the CA3 Region of the Hippocampus in Spatial Memory Formation in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 259-268, 2002.

HEBB, D. O. **The organization of behavior: A neuropsychological theory**. Psychology press, 2005. 1410612406.

HEIDBREDER, C. A.; GROENEWEGEN, H. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 6, p. 555-579, 2003.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, F.; RODRÍGUEZ-LANDA, J. F.; PUGA-OLGUÍN, A.; GERMÁN-PONCIANO, L. J. *et al.* Analysis of activity and motor coordination in rats undergoing stereotactic surgery and implantation of a cannula into the dorsal hippocampus. **Neurologia**, v. 32, n. 9, p. 579-586, 2017.

HERRY, C.; CIOCCHI, S.; SENN, V.; DEMMOU, L. *et al.* Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 600-606, 2008.

HERRY, C.; MONS, N. Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 3, p. 781-790, 2004.

HIKOSAKA, O.; WURTZ, R. H. J. J. o. n. Modification of saccadic eye movements by GABA-related substances. I. Effect of muscimol and bicuculline in monkey superior colliculus. **J Neurophysiol**, v. 53, n. 1, p. 266-291, 1985.

HOK, V.; SAVE, E.; LENCK-SANTINI, P.; POUCET, B. Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 12, p. 4602-4607, 2005.

HOLT, W.; MAREN, S. Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 20, p. 9054-9062, 1999.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain Struct Funct**, v. 212, n. 2, p. 149-179, 2007.

IVASHKINA, O. I.; TOROPOVA, K. A.; IVANOV, A. A.; CHEKHOV, S. A. *et al.* Waves of c-Fos and Arc Proteins Expression in Neuronal Populations of the Hippocampus in Response to a Single Episode of New Experience. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 160, n. 6, p. 729-732, 2016.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 3 ed. Artmed Editora, 2018. 8582714920.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.

JONES, B.; GROENEWEGEN, H.; WITTER, M. J. N. Intrinsic connections of the cingulate cortex in the rat suggest the existence of multiple functionally segregated networks. **Neuroscience**, v. 133, n. 1, p. 193-207, 2005.

JOSSELYN, S. A.; KÖHLER, S.; FRANKLAND, P. W. Finding the engram. **Nature reviews neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 521-534, 2015.

JOSSELYN, S. A.; TONEGAWA, S. J. S. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. **Science**, v. 367, n. 6473, p. eaaw4325, 2020.

KANDEL, E. R. **Principles of Neural Science**. McGraw Hill, 2021.

KHAN, Z. U.; CARRETERO-REY, M.; DE LEÓN-LÓPEZ, C. A. M.; NAVARRO-LOBATO, I. Memory-Associated Immediate Early Genes: Roles in Synaptic Function, Memory Processes, and Neurological Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 62, n. 12, p. 15885-15915, 2025.

KIM, E. J.; KIM, N.; KIM, H. T.; CHOI, J.-S. The prelimbic cortex is critical for context-dependent fear expression. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. Volume 7 - 2013, 2013. Original Research.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, n. 5057, p. 675-677, 1992.

KIM, S.; KIM, H.; UM, J. W. Synapse development organized by neuronal activity-regulated immediate-early genes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 4, p. 1-7, 2018.

KINNAVANE, L.; AMIN, E.; OLARTE-SÁNCHEZ, C. M.; AGGLETON, J. P. Detecting and discriminating novel objects: The impact of perirhinal cortex disconnection on hippocampal activity patterns. **Hippocampus**, v. 26, n. 11, p. 1393-1413, 2016.

KITAMURA, T.; OGAWA, S. K.; ROY, D. S.; OKUYAMA, T. *et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science**, v. 356, n. 6333, p. 73-78, 2017.

KLINE, R. B. **Beyond significance testing: Statistics reform in the behavioral sciences**. 2 ed. American Psychological Association, 2013.

KORB, E.; FINKBEINER, S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 11, p. 591-598, 2011.

KORBMACHER, M.; AZEVEDO, F.; PENNINGTON, C. R.; HARTMANN, H. *et al.* The replication crisis has led to positive structural, procedural, and community changes. **Communications Psychology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2023.

KOVÁCS, K. J. Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**, v. 33, n. 4, p. 287-297, 1998.

KVEIM, V. A.; SALM, L.; ULMER, T.; LAHR, M. *et al.* Divergent recruitment of developmentally defined neuronal ensembles supports memory dynamics. **Science**, v. 385, n. 6710, p. eadk0997, 2024.

LACROIX, L.; SPINELLI, S.; HEIDBREDER, C. A.; FELDON, J. J. B. n. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 6, p. 1119, 2000.

LANDES, R. D. How cage effects can hurt statistical analyses of completely randomized designs. **Laboratory animals**, v. 58, n. 5, p. 476-480, 2024.

LEDOUX, J. E. J. A. r. o. n. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.

LEE, J.-H.; KIM, W. B.; PARK, E. H.; CHO, J.-H. Neocortical synaptic engrams for remote contextual memories. **Nature Neuroscience**, v. 26, n. 2, p. 259-273, 2023.

LENARTOWICZ, A.; MCINTOSH, A. R. J. J. o. c. n. The role of anterior cingulate cortex in working memory is shaped by functional connectivity. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 1026-1042, 2005.

LESBURGUÈRES, E.; GOBBO, O. L.; ALAUX-CANTIN, S.; HAMBUCKEN, A. *et al.* Early Tagging of Cortical Networks Is Required for the Formation of Enduring Associative Memory. **Science**, v. 331, n. 6019, p. 924-928, 2011.

LI, S.; ZHANG, J.; LI, J.; HU, Y. *et al.* Optogenetics and chemogenetics: key tools for modulating neural circuits in rodent models of depression. **Frontiers in Neural Circuits**, v. Volume 19 - 2025, 2025. Review.

LISSEK, S. Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned overgeneralization. **Depress Anxiety**, v. 29, n. 4, p. 257-263, 2012.

LISSNER, L. J.; WARTCHOW, K. M.; TONIAZZO, A. P.; GONÇALVES, C. A. *et al.* Object recognition and Morris water maze to detect cognitive impairment from mild hippocampal damage in rats: A reflection based on the literature and experience. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 210, p. 173273, 2021.

LONERGAN, M. E.; GAFFORD, G. M.; JAROME, T. J.; HELMSTETTER, F. J. Time-Dependent Expression of Arc and Zif268 after Acquisition of Fear Conditioning. **Neural Plasticity**, v. 2010, n. 1, p. 139891, 2010.

LOTZ, F. N.; GUERRA, K. T. K.; CRESTANI, A. P.; QUILLFELDT, J. A. J. L. *et al.* Multiple context discrimination in adult rats: sex variability and dynamics of time-dependent generalization of an aversive memory. **Learning & Memory**, v. 32, n. 5-6, p. a054081, 2025.

LUFT, J. G.; POPIK, B.; GONÇALVES, D. A.; CRUZ, F. C. *et al.* Distinct engrams control fear and extinction memory. v. 34, n. 5, p. 230-240, 2024.

LYNCH, J.; CULLEN, P. K.; JASNOW, A. M.; RICCIO, D. C. Sex differences in the generalization of fear as a function of retention intervals. **Learning & Memory**, v. 20, n. 11, p. 628-632, 2013.

LYNCH, J. F.; DEJANOVIC, D.; WINIECKI, P.; MULVANY, J. *et al.* Activation of ERβ modulates fear generalization through an effect on memory retrieval. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 421-429, 2014.

LYNCH, J. F.; VANDERHOOF, T.; WINIECKI, P.; LATSKO, M. S. *et al.* Aromatized testosterone attenuates contextual generalization of fear in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 84, p. 127-135, 2016.

MAHLER, S. V.; ASTON-JONES, G. CNO Evil? Considerations for the Use of DREADDs in Behavioral Neuroscience. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 5, p. 934-936, 2018.

MALNOU, C. E.; SALEM, T.; BROCKLY, F.; WODRICH, H. *et al.* Heterodimerization with Jun Family Members Regulates c-Fos Nucleocytoplasmic Traffic *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 31046-31059, 2007.

MAREK, R.; STROBEL, C.; BREDY, T. W.; SAH, P. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. **J Physiol**, v. 591, n. 10, p. 2381-2391, 2013.

MAREK, R.; SUN, Y.; SAH, P. J. P. Neural circuits for a top-down control of fear and extinction. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 236, p. 313-320, 2019.

MAREK, R.; XU, L.; SULLIVAN, R. K. P.; SAH, P. Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 654-658, 2018.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 897-931, 2001.

MAREN, S.; HOBIN, J. A. Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. **Learning & Memory**, v. 14, n. 4, p. 318-324, 2007.

MAREN, S.; QUIRK, G. J. J. N. r. n. Neuronal signalling of fear memory. **Nature reviews neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 844-852, 2004.

MARR, D. A theory for cerebral neocortex. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 176, n. 1043, p. 161-234, 1970.

MARR, D. Simple memory: a theory for archicortex. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 262, n. 841, p. 23-81, 1971.

MARTIN, J.; GHEZ, C. J. E. b. r. Differential impairments in reaching and grasping produced by local inactivation within the forelimb representation of the motor cortex in the cat. **Exp Brain Res**, v. 94, n. 3, p. 429-443, 1993.

MARTIN, J. H. Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 127, n. 2, p. 160-164, 1991.

MARTIN, J. H.; GHEZ, C. Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. **J Neurosci Methods**, v. 86, n. 2, p. 145-159, 1999.

MAU, W.; HASSELMO, M. E.; CAI, D. J. The brain in motion: How ensemble fluidity drives memory-updating and flexibility. **Elife**, v. 9, p. e63550, 2020.

MAVIEL, T.; DURKIN, T. P.; MENZAGHI, F.; BONTEMPI, B. J. S. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. **Science**, v. 305, n. 5680, p. 96-99, 2004.

MAYFORD, M.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 6, 2012.

MCCLELLAND, J. L.; MCNAUGHTON, B. L.; O'REILLY, R. C. 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**, v. 102, n. 3, p. 419, 1995.

MCGAUGH, J. L. J. S. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.

MCGINTY, G.; FOX, R.; BEN-EZRA, M.; CLOITRE, M. *et al.* Sex and age differences in ICD-11 PTSD and complex PTSD: An analysis of four general population samples. **European Psychiatry**, v. 64, n. 1, p. e66, 2021.

MINATOHARA, K.; AKIYOSHI, M.; OKUNO, H. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. **Front Mol Neurosci**, v. Volume 8 - 2015, 2016. Review.

MISANE, I.; KRUIS, A.; PIENEMAN, A. W.; ÖGREN, S. O. *et al.* GABAA receptor activation in the CA1 area of the dorsal hippocampus impairs consolidation of conditioned contextual fear in C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**, v. 238, p. 160-169, 2013.

MOLINA, P.; BELDA, X.; BERIAIN, S.; SERRANO, S. *et al.* Dynamics of stress-induced c-fos expression in the rat prelimbic cortex: lessons from intronic and mature RNA and protein analyses. **Neurobiol Stress**, v. 36, p. 100729, 2025.

MORGAN, J. I.; CURRAN, T. J. A. r. o. n. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annual review of neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 421-451, 1991.

MORRIS, R. G.; MOSER, E. I.; RIEDEL, G.; MARTIN, S. *et al.* Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 358, n. 1432, p. 773-786, 2003.

MUKHERJEE, A.; CARONI, P. Infralimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2727, 2018.

MYRUM, C.; MORENO-CASTILLA, P.; RAPP, P. R. 'Arc'-hitecture of normal cognitive aging. **Ageing Research Reviews**, v. 80, p. 101678, 2022.

NADEL, L.; MOSCOVITCH, M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 7, n. 2, p. 217-227, 1997.

NAGAHARA, A. H.; BRIONI, J. D.; MCGAUGH, J. L. J. P. Effects of intraseptal infusion of muscimol on inhibitory avoidance and spatial learning: Differential effects of pretraining and posttraining administration. v. 20, n. 3, p. 198-204, 1992.

NAGAHARA, A. H.; MCGAUGH, J. L. Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. **Brain Research**, v. 591, n. 1, p. 54-61, 1992.

NEISSER, U. E.; WINOGRAD, E. E., 1988, **Remembering reconsidered: Ecological and traditional approaches to the study of memory**. Cambridge University Press.

NELSON, A. J.; COOPER, M. T.; THUR, K. E.; MARSDEN, C. A. *et al.* The effect of catecholaminergic depletion within the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex on recognition memory for recency, location, and objects. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 3, p. 396-403, 2011.

NICOLL, R. A. J. n. A brief history of long-term potentiation. **Neuron**, v. 93, n. 2, p. 281-290, 2017.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, 1971.

OKUDA, S.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 3, p. 853-858, 2004.

OLSEN, G. M.; OHARA, S.; IIJIMA, T.; WITTER, M. P. Parahippocampal and retrosplenial connections of rat posterior parietal cortex. **Hippocampus**, v. 27, n. 4, p. 335-358, 2017.

ORSINI, C. A.; YAN, C.; MAREN, S. Ensemble coding of context-dependent fear memory in the amygdala. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 199, 2013.

OTHMAN, M. Z.; HASSAN, Z.; CHE HAS, A. T. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. **Exp Anim**, v. 71, n. 3, p. 264-280, 2022.

PARÉ, D.; QUIRK, G. J.; LEDOUX, J. E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **J Neurophysiol**, v. 92, n. 1, p. 1-9, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Elsevier, 2006. 0080475159.

PEARCE, J. M. A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning. **Psychological Review**, v. 94, n. 1, p. 61-73, 1987.

PEDRAZA, L. K.; SIERRA, R. O.; BOOS, F. Z.; HAUBRICH, J. *et al.* The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. **Hippocampus**, v. 26, n. 3, p. 362-371, 2016.

PETTIT, N. L.; YAP, E.-L.; GREENBERG, M. E.; HARVEY, C. D. J. N. Fos ensembles encode and shape stable spatial maps in the hippocampus. **Nature**, v. 609, n. 7926, p. 327-334, 2022.

PEVZNER, A.; GUZOWSKI, J. F. J. L.; MEMORY. Immediate-early gene transcriptional activation in hippocampus CA1 and CA3 does not accurately reflect rapid, pattern completion-based retrieval of context memory. **Learning & Memory**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2015.

PLATH, N.; OHANA, O.; DAMMERMANN, B.; ERRINGTON, M. L. *et al.* Arc/Arg3. 1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. **Neuron**, v. 52, n. 3, p. 437-444, 2006.

POLLACK, G. A.; BEZEK, J. L.; LEE, S. H.; SCARLATA, M. J. *et al.* Cued fear memory generalization increases over time. **Learning & Memory**, v. 25, n. 7, p. 298-308, 2018.

QUILLFELDT, J. A. Behavioral methods to study learning and memory in rats. *In*: **Rodent model as tools in ethical biomedical research**: Springer, 2016. p. 271-311.

QUILLFELDT, J. A.; ZANATTA, M. S.; SCHMITZ, P. K.; QUEVEDO, J. *et al.* Different Brain Areas Are Involved in Memory Expression at Different Times from Training. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 66, n. 2, p. 97-101, 1996.

QUILLFELDT, J. A. J. F. i. s. n. Temporal flexibility of systems consolidation and the synaptic occupancy/reset theory (SORT): cues about the nature of the engram. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 11, p. 1, 2019.

QUINN, J. J.; MA, Q. D.; TINSLEY, M. R.; KOCH, C. *et al.* Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learning & Memory**, v. 15, n. 5, p. 368-372, 2008.

QUIÑONES-LARACUENTE, K.; VEGA-MEDINA, A.; QUIRK, G. J. Time-Dependent Recruitment of Prelimbic Prefrontal Circuits for Retrieval of Fear Memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. Volume 15 - 2021, 2021. Original Research.

QUIRK, G. J.; LIKHTIK, E.; PELLETIER, J. G.; PARÉ, D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8800-8807, 2003.

RAJASETHUPATHY, P.; SANKARAN, S.; MARSHEL, J. H.; KIM, C. K. *et al.* Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 653-659, 2015.

REMPEL-CLOWER, N. L.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. G. J. J. o. N. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. **Journal of neuroscience**, v. 16, n. 16, p. 5233-5255, 1996.

RIBOT, T. Les maladies de la mémoire. 2005.

RICHARDS, B. A.; FRANKLAND, P. W. The Persistence and Transience of Memory. **Neuron**, v. 94, n. 6, p. 1071-1084, 2017.

RODRÍGUEZ-BERDINI, L.; CAPUTTO, B. L. Lipid Metabolism in Neurons: A Brief Story of a Novel c-Fos-Dependent Mechanism for the Regulation of Their Synthesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 198, 2019.

RODRÍGUEZ-BERDINI, L.; FERRERO, G. O.; BUSTOS PLONKA, F.; CARDOZO GIZZI, A. M. *et al.* The moonlighting protein c-Fos activates lipid synthesis in neurons, an activity that is critical for cellular differentiation and cortical development. **J Biol Chem**, v. 295, n. 26, p. 8808-8818, 2020.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. J. B. n. Memory modulation. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 6, p. 797, 2011.

ROST, B. R.; WIETEK, J.; YIZHAR, O.; SCHMITZ, D. Optogenetics at the presynapse. **Nature Neuroscience**, v. 25, n. 8, p. 984-998, 2022.

ROY, D. S.; PARK, Y. G.; KIM, M. E.; ZHANG, Y. *et al.* Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1799, 2022.

ROYER, S.; MARTINA, M.; PARÉ, D. An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. **The Journal of neuroscience**, v. 19, n. 23, p. 10575-10583, 1999.

RUDY, J. W. **The neurobiology of learning and memory**. Sinauer Associates, 2008. 0878936696.

SACHSER, R. M.; SANTANA, F.; CRESTANI, A. P.; LUNARDI, P. *et al.* Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca2+ channels, and calcineurin. **Sci Rep**, v. 6, p. 22771, 2016.

SANDI, C.; LOSCERTALES, M.; GUAZA, C. J. E. j. o. n. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 637-642, 1997.

SANTOS, T. B.; KRAMER-SOARES, J. C.; FAVARO, V. M.; OLIVEIRA, M. G. M. Involvement of the prelimbic cortex in contextual fear conditioning with temporal and spatial discontinuity. **Neurobiology of learning and memory,**, v. 144, p. 1-10, 2017.

SCHARF, M. T.; WOO, N. H.; LATTAL, K. M.; YOUNG, J. Z. *et al.* Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. **J Neurophysiol**, v. 87, n. 6, p. 2770-2777, 2002.

SCHECHTMAN, E.; LAUFER, O.; PAZ, R. Negative valence widens generalization of learning. **The Journal of neuroscience**, v. 30, n. 31, p. 10460-10464, 2010.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11, 1957.

SEKERES, M. J.; WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M. J. N. l. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. **Neuroscience Letters**, v. 680, p. 39-53, 2018.

SEMON, R. W. **Die Mneme als erhaltendes Prinzip im Wechsel des organischen Geschehens**. Wilhelm Engelmann, 1911.

SENN, V.; WOLFF, S. B.; HERRY, C.; GRENIER, F. *et al.* Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 428-437, 2014.

SHARMA, P.; PIENAAR, I. S. Chapter 24 - The Use of DREADDs for Dissecting the Contribution of Cellular and Neural Circuit Mechanisms in Models of Neurodegenerative Disease. *In*: GERLAI, R. T. (Ed.). **Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research**. San Diego: Academic Press, 2018. p. 565-596.

SHEPHERD, J. D.; RUMBAUGH, G.; WU, J.; CHOWDHURY, S. *et al.* Arc/Arg3. 1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. **Neuron**, v. 52, n. 3, p. 475-484, 2006.

SHIMIZU, T.; MINAMI, C.; MITANI, A. Effect of electrical stimulation of the infralimbic and prelimbic cortices on anxiolytic-like behavior of rats during the elevated plus-maze test, with particular reference to multiunit recording of the behavior-associated neural activity. **Behavioural Brain Research**, v. 353, p. 168-175, 2018.

SIBAROV, D. A.; TSYTSAREV, V.; VOLNOVA, A.; VAGANOVA, A. N. *et al.* Arc protein, a remnant of ancient retrovirus, forms virus-like particles, which are abundantly generated by neurons during epileptic seizures, and affects epileptic susceptibility in rodent models. **Frontiers in neurology**, v. Volume 14 - 2023, 2023. Review.

SILVA, B. A.; BURNS, A. M.; GRÄFF, J. A cFos activation map of remote fear memory attenuation. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 369-381, 2019.

SMITH, D. M.; YANG, Y. Y.; SUBRAMANIAN, D. L.; MILLER, A. M. P. *et al.* The limbic memory circuit and the neural basis of contextual memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 187, p. 107557, 2022.

SMOAK, M. A.; GALVAN, K. J.; CALVO, D. E.; POWERS, R. E. *et al.* Prelimbic Cortex Activity Predicts Anxiety-Like Behavior in the Elevated Plus Maze. **bioRxiv**, 2024.

SOTOCINA, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H. *et al.* The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Molecular pain**, v. 7, p. 1744-8069-1747-1755, 2011.

SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 231-235, 2010.

SOTRES-BAYON, F.; SIERRA-MERCADO, D.; PARDILLA-DELGADO, E.; QUIRK, G. J. Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. **Neuron**, v. 76, n. 4, p. 804-812, 2012.

SQUIRE, L. R.; ALVAREZ, P. J. C. o. i. n. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 169-177, 1995.

SQUIRE, L. R.; GENZEL, L.; WIXTED, J. T.; MORRIS, R. G. Memory consolidation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 8, p. a021766, 2015.

SQUIRE, L. R. J. P. r. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological Review**, v. 99, n. 2, p. 195, 1992.

STERN, C. A.; GAZARINI, L.; VANVOSSEN, A. C.; HAMES, M. S. *et al.* Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. **Learning & Memory**, v. 21, n. 1, p. 14-20, 2013.

SUNG, Y.; KAANG, B.-K. The Three Musketeers in the Medial Prefrontal Cortex: Subregion-specific Structural and Functional Plasticity Underlying Fear Memory Stages. **Experimental Neurobiology**, v. 31, n. 4, p. 221-231, 2022.

SUTHERLAND, R.; GIBB, R.; KOLB, B. J. B. b. r. The hippocampus makes a significant contribution to experience-dependent neocortical plasticity. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 1, p. 121-124, 2010.

TAKEHARA-NISHIUCHI, K. Entorhinal cortex and consolidated memory. **Neurosci Res**, v. 84, p. 27-33, 2014.

TAKEHARA, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y. Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 30, p. 9897-9905, 2003.

TENG, S. W.; WANG, X. R.; DU, B. W.; CHEN, X. L. *et al.* Altered fear engram encoding underlying conditioned versus unconditioned stimulus-initiated memory updating. **Science Advances**, v. 9, n. 23, p. eadf0284, 2023.

TEYLER, T. J.; DISCENNA, P. G. J. B. n. The hippocampal memory indexing theory. **Behavioral Neuroscience**, v. 100 2, p. 147-154, 1986.

TEYLER, T. J.; RUDY, J. W. J. H. The hippocampal indexing theory and episodic memory: updating the index. **Hippocampus**, v. 17, n. 12, p. 1158-1169, 2007.

TEZANOS, P.; TREJO, J. L. Why are threatening experiences remembered so well? Insights into memory strengthening from protocols of gradual aversive learning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 174, p. 106145, 2025.

THOMAS, C. M. P.; BOUTON, M. E.; GREEN, J. T. Prelimbic cortex inactivation prevents ABA renewal based on stress state. **Behavioral Neuroscience**, v. 137, n. 6, p. 373-379, 2023.

TINTORELLI, R.; BUDRIESI, P.; VILLAR, M. E.; MARCHAL, P. *et al.* Spatial-memory formation after spaced learning involves ERKs1/2 activation through a behavioral-tagging process. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 98, 2020.

TONEGAWA, S.; MORRISSEY, M. D.; KITAMURA, T. J. N. R. N. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. **Nature reviews neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 485-498, 2018.

TOTAH, N. K.; KIM, Y. B.; HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. J. J. o. N. Anterior cingulate neurons represent errors and preparatory attention within the same behavioral sequence. **Neuroscience**, v. 29, n. 20, p. 6418-6426, 2009.

TWINING, R. C.; LEPAK, K.; KIRRY, A. J.; GILMARTIN, M. R. Ventral Hippocampal Input to the Prelimbic Cortex Dissociates the Context from the Cue Association in Trace Fear Memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 16, p. 3217-3230, 2020.

VAIDYA, A. R.; PUJARA, M. S.; PETRIDES, M.; MURRAY, E. A. *et al.* Lesion Studies in Contemporary Neuroscience. **Trends Cogn Sci**, v. 23, n. 8, p. 653-671, 2019.

VAN AERDE, K. I.; HEISTEK, T. S.; MANSVELDER, H. D. Prelimbic and infralimbic prefrontal cortex interact during fast network oscillations. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2725, 2008.

VAZDARJANOVA, A.; RAMIREZ-AMAYA, V.; INSEL, N.; PLUMMER, T. K. *et al.* Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein

kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. **J Comp Neurol**, v. 498, n. 3, p. 317-329, 2006.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, 2004.

VIDAL-GONZALEZ, I.; VIDAL-GONZALEZ, B.; RAUCH, S. L.; QUIRK, G. J. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learn Mem**, v. 13, n. 6, p. 728-733, 2006.

VIEIRA, P. A.; KORZUS, E. CBP-Dependent memory consolidation in the prefrontal cortex supports object-location learning. **Hippocampus**, v. 25, n. 12, p. 1532-1540, 2015.

VINCENT, C. J.; AGUILAR-ALVAREZ, R.; VANDERHOOF, S. O.; MOTT, D. D. *et al.* An amygdala-cortical circuit for encoding generalized fear memories. **Mol Psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 430-443, 2026.

WANG, G.-Q.; CEN, C.; LI, C.; CAO, S. *et al.* Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7660, 2015.

WANG, H.; HU, Y.; TSIEN, J. Z. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 3, p. 123-135, 2006.

WANG, S.-H.; TEIXEIRA, C. M.; WHEELER, A. L.; FRANKLAND, P. W. J. N. n. The precision of remote context memories does not require the hippocampus. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 253-255, 2009.

WANG, T.; YAN, R.; ZHANG, X.; WANG, Z. *et al.* Paraventricular thalamus dynamically modulates aversive memory via tuning prefrontal inhibitory circuitry. **Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 20, p. 3630-3646, 2023.

WEIBLE, A. P. Remembering to attend: The anterior cingulate cortex and remote memory. **Behavioural Brain Research**, v. 245, p. 63-75, 2013.

WHITLOCK, J. R.; HEYNEN, A. J.; SHULER, M. G.; BEAR, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1093-1097, 2006.

WIEGERT, J. S.; MAHN, M.; PRIGGE, M.; PRINTZ, Y. *et al.* Silencing Neurons: Tools, Applications, and Experimental Constraints. **Neuron**, v. 95, n. 3, p. 504-529, 2017.

WILTGEN, B. J.; SILVA, A. Memory for context becomes less specific with time. **Learning & Memory**, v. 14, n. 4, p. 313-317, 2007.

WILTGEN, B. J.; TANAKA, K. Systems consolidation and the content of memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 106, p. 365-371, 2013.

WILTGEN, B. J.; ZHOU, M.; CAI, Y.; BALAJI, J. *et al.* The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. **Current Biology**, v. 20, n. 15, p. 1336-1344, 2010.

WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M.; BONTEMPI, B. Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. **Jornal of Neuropsychologia**, v. 48, n. 8, p. 2339-2356, 2010.

WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M.; SEKERES, M. Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 555-557, 2007.

ZAMBETTI, P. R.; SCHUESSLER, B. P.; LECAMP, B. E.; SHIN, A. *et al.* Ecological analysis of Pavlovian fear conditioning in rats. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 830, 2022.

ZELIKOWSKY, M.; BISSIERE, S.; HAST, T. A.; BENNETT, R. Z. *et al.* Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 24, p. 9938-9943, 2013.

ZELIKOWSKY, M.; HERSMAN, S.; CHAWLA, M. K.; BARNES, C. A. *et al.* Neuronal ensembles in amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear. **The Journal of neuroscience**, v. 34, n. 25, p. 8462-8466, 2014.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. G. J. J. o. n. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **Journal of neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 2950-2967, 1986.