

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

Kétlyn Talise Knak Guerra

CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA E DINÂMICA DA GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS
DE LONGO PRAZO: O PAPEL DO CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL

Porto Alegre

2019

Kétlyn Talise Knak Guerra

CONSOLIDAÇÃO SISTÊMICA E DINÂMICA DA GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS
DE LONGO PRAZO: O PAPEL DO CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Jorge Alberto Quillfeldt

Porto Alegre

2019/2

*“Somos nuestra memoria,
somos ese quimérico museo de formas inconstantes,
ese montón de espejos rotos.”*

“Cambridge”, Jorge Luis Borges

RESUMO

A formação das memórias de longo prazo depende do processo de consolidação. Nas primeiras horas após o aprendizado, ocorre a chamada *consolidação sináptica*, que transforma a memória de curto prazo em *longo prazo*. Conforme passa o tempo, ao longo de semanas – em ratos (ou décadas, em humanos) – ocorre a *consolidação sistêmica*, uma gradual reorganização encefálica para acomodar a memória definitiva. Durante esse processo, muitas memórias passam a depender progressivamente menos do hipocampo (HPC) e cada vez mais de áreas corticais. Conjuntamente a essa corticalização, observa-se o fenômeno da *generalização*, no qual memórias perdem detalhamento, principalmente contextual, conforme se tornam remotas. Isso pode ser inferido quando as memórias tendem a ser evocadas também em contextos similares, neutros ou até mesmo diferentes daquele onde ocorreu o aprendizado. Apesar de estudos concordarem com o requerimento do *córtex entorrinal lateral* (LEC) para evocação de memórias recentes, há menos clareza quanto a sua contribuição às memórias de longo prazo remotas, quando independentes do HPC. Assim, este estudo teve como objetivo principal investigar a participação do LEC na evocação de memórias de longo prazo, sistemicamente consolidadas, assim como avaliar sua precisão. Nossos resultados demonstram que a atividade do HPC dorsal não é necessária para a evocação de uma memória remota (28 dias), e que o LEC é requerido na evocação de memórias recentes (2 dias) e remotas, que passaram pelo processo de consolidação sistêmica – ou seja, independentes do hipocampo. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e muscimol durante o teste no contexto similar ao do treino, aos 28 dias, sugerindo o não envolvimento do LEC na generalização. Contudo, experimentos ainda em andamento estão averiguando a inibição da região aos dois dias, de forma a tornar possível essa comparação. Assim, até o momento, embora não tenha sido observada diferença entre os grupos aos 28 dias, a participação do LEC na precisão ou generalização de memórias remotas, sem o resultado do teste de dois dias, ainda não pode ser concluída. Como perspectiva, além dos grupos experimentais a serem concluídos, pretendemos buscar entender melhor qual a janela de atuação temporal do LEC, investigando sua participação em uma memória ainda mais remota, com 45 dias.

Palavras-chave: memória de longo prazo, consolidação sistêmica, generalização, córtex entorrinal lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Conceituação, etapas e classificações da memória.....	7
1.2. Memórias de curta e de longa duração.....	8
1.3. Múltiplos sistemas de memória.....	9
1.4. Sistema medial temporal hipocampal.....	10
1.5. Consolidação: sináptica e sistêmica (teoria standard e outras).....	11
1.6. Generalização ou precisão de memórias.....	13
1.7. O córtex entorrinal lateral.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1. Animais.....	17
4.2. Procedimentos cirúrgicos.....	17
4.3. Fármacos.....	18
4.4. Procedimentos comportamentais.....	18
4.4.1 Protocolo de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC).....	18
4.4.2 Desenho experimental.....	19
4.5. Histologias.....	20
4.6. Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSSÃO.....	25
6.1. Consolidação sistêmica HPC.....	25
6.2. Participação do LEC durante a evocação de memórias de longo prazo.....	26
6.3. Participação do LEC na generalização.....	27
7. CONCLUSÕES.....	28
8. PERSPECTIVAS.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da memória	8
Figura 2. Classificação de uma memória conforme o tempo de duração e força.....	9
Figura 3. Sistema medial temporal hipocampal	11
Figura 4. Esquema geral do protocolo experimental.....	20
Figura 5. Verificação da consolidação sistêmica.....	22
Figura 6. Contribuição do córtex entorrinal lateral em memórias de longo prazo recentes e remotas	23
Figura 7. Contribuição do LEC na evocação de uma memória remota em contexto similar ao da aquisição	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos experimentos realizados.....	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAC – condicionamento aversivo contextual

HPC – hipocampo

HPCd – hipocampo dorsal

LEC – córtex entorrinal lateral (*‘lateral entorhinal cortex’*)

MTH – medial temporal hipocampal

MTL – lobo temporal medial (*‘medial temporal lobe’*)

NMDA – N-metil D-aspartato

CCA – córtex cingulado anterior

1. INTRODUÇÃO

A retenção de novas informações por organismos biológicos pode ser — e historicamente tem sido — inferida a partir da observação de mudanças comportamentais ocorridas após a vivência de experiências (RUDY, 2014). Os organismos em geral aprendem a evitar estímulos aversivos e buscar ou prolongar os prazerosos ou evolutivamente vantajosos. Desde seres como o nemátodo *Caenorhabditis elegans*, com pouco mais de 300 neurônios no sistema nervoso (WHITE et al., 1986), até nós, *Homo sapiens*, com cerca de 86 bilhões de neurônios apenas no encéfalo (HERCULANO-HOUZEL & LENT, 2005), compartilhamos semelhantes dinâmicas de aprendizado. Por exemplo, enquanto os vermes são capazes de aprender a evitar alimentos contaminados por patógenos (ANDERSON & McMULLAN, 2018), humanos aprendem, a partir da olfação e ao longo da vida — em especial durante a infância —, a determinar quais comidas estão ou não próprias para consumo. Entretanto, uma diferença fundamental é que, devido à relativa simplicidade do *C. elegans*, seu comportamento pode ser fortemente associados a fatores e estímulos físico-químicos e biológicos; por sua vez, o comportamento humano não pode ser explicado senão à luz de uma série de questões mais complexas, envolvendo aspectos ambientais, sociais, culturais, etc.

Essa diferença pode ser parcialmente explicada pois o encéfalo humano, com seu enorme número de células, foi capaz de assumir formatos mais compactos (HERCULANO-HOUZEL, 2009), passando a comportar estruturas detalhadas finamente especializadas, cuja interação permite o desenvolvimento de uma gama muito maior de comportamentos. Entretanto, o encéfalo de diversos outros mamíferos se complexificou de maneira análoga. Nesse sentido, devido à sua maior semelhança conosco, o rato (*Rattus norvegicus domestica*) vem sendo usado como organismo modelo para o entendimento da complexidade do encéfalo. Além de descendermos de um mesmo ancestral, também possuímos em comum mecanismos fisiológicos essenciais, como diversos aspectos do metabolismo, regiões encefálicas, processos fundamentais da memória e até mesmo estratégias comportamentais (QUILLFELDT, 2006). Se, por um lado, o rato dispõe de cerca de 300 milhões de neurônios (HERCULANO-HOUZEL & LENT, 2005), quase 300 vezes menos que o encéfalo humano, por outro esse número representa um milhão de vezes mais células nervosas quando comparado ao nemátodo. Assim, esses roedores tem sido amplamente empregados nos estudos de neurociência comportamental e cognitiva.

1.1. Conceituação, etapas e classificações da memória

Embora seja possível inferir a memória a partir da evocação dos eventos previamente adquiridos, ela não se resume a este processo. Entre o aprender e o recordar, tem-se a formação e a conservação, isto é, a fase de seleção e armazenamento das informações, denominada consolidação. Parte do entendimento sobre esse fenômeno vem do conhecimento comum, já de longa data, de que indivíduos que experienciam eventos de traumatismo craniano muitas vezes esquecem de forma seletiva o que havia ocorrido minutos antes ao incidente (IZQUIERDO, 2011, p.45). Entretanto, foi apenas nos primeiros anos do século XX que o termo consolidação foi cunhado, pelos pesquisadores Müller e Pilzecker, que demonstraram que memórias que são adquiridas sequencialmente, em um curto intervalo, interferem umas nas outras (MÜLLER e PILZECKER apud. LECHNER et al., 1999). Tais observações indicam que o traço mnemônico de um aprendizado não é instantaneamente fixado durante a experiência e, que logo após a aquisição, se iniciam processos bioquímicos que levam algum tempo para ocorrer no encéfalo, necessários à formação de novas memórias. Durante esse intervalo, o armazenamento de informações fica vulnerável, suscetível a modificações qualitativas e quantitativas (McGAUGH, 1966; IZQUIERDO, 1989).

Assim, a memória é um processo não-instantâneo que compreende diferentes fases, que são: *aquisição*, também denominada aprendizado, quando as informações são obtidas através dos sentidos; *consolidação*, estado lábil no qual a memória pode ser armazenada; e *evocação*, que é a expressão ou manifestação do que foi adquirido (IZQUIERDO, 2011, p.11). O ato de evocar ativa o traço mnemônico (“engrama”) formado a partir da experiência, possibilitando que haja modificação do seu conteúdo. Nos estudos de neurobiologia da memória, são conhecidos outros dois mecanismos que podem iniciar-se durante a evocação, conforme o tempo de exposição às *dicas do ambiente* (e outras *condições de contorno – boundary conditions* – do experimento): a *extinção* e a *reconsolidação* (Figura 1). No primeiro processo a evocação ocorre através de estímulos associados a uma memória existente, o que parece gerar uma nova memória associada à original, e que suprime seu conteúdo, alterando a resposta evocada pelo estímulo que formou a primeira memória. Isso não significa que a memória tenha sido permanentemente perdida, como o termo extinção pode erroneamente sugerir. De fato, a primeira memória pode ser evocada novamente se, por exemplo, o indivíduo for apresentado a estímulos semelhantes aos que a formaram (“dica” ou “pista”). Já no caso da reconsolidação há

a atualização do traço original, que pode ser enfraquecido ou aprimorado durante o período de instabilidade, que ocorre nas horas seguintes à evocação (MONFILS et al., 2009).

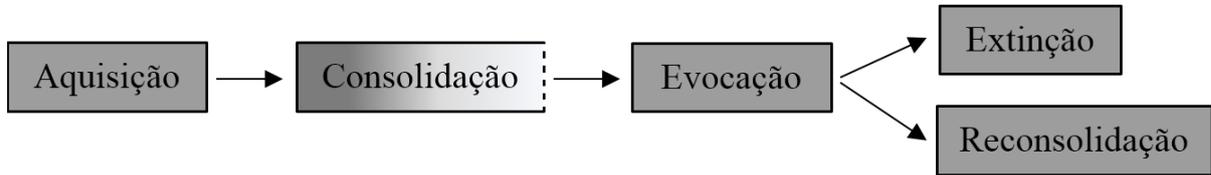


Figura 1. Etapas da memória. Aquisição refere-se ao aprendizado, consolidação são os processos sinápticos ou sistêmicos de armazenamento que ocorrem no encéfalo logo após aquisição. Evocação é a lembrança do que foi adquirido. A partir da evocação pode ocorrer tanto a extinção quanto a reconsolidação da memória.

Também é possível classificar as memórias através de diferentes critérios, sendo geralmente utilizados: função (memória de trabalho ou de referência), conteúdo (procedural/implícita ou declarativa/explicita), tempo de duração (curta duração, longa duração, recente, remota), motivação (apetitiva, de recompensa ou aversiva) e natureza (associativas e não-associativas).

1.2. Memórias de curta e de longa duração

A hipótese de haver uma organização espaço-tempo dependente na formação de memórias foi levantada por William James (1890), quando propôs que deveria existir algum sistema responsável por manter a memória operacional enquanto a formação da memória definitiva não estivesse completa (IZQUIERDO, 2011, p.66). Antes de consolidadas, as memórias são suscetíveis a perturbações, podendo ou não ser armazenadas. Entretanto a capacidade de recordar informações recentemente adquiridas é adaptativa, do ponto de vista evolutivo, e parte essencial do processo de pensamento. Portanto, a hipótese levantada por James tem como objetivo propor uma explicação à aparente independência entre as memórias adquiridas há poucos minutos e as que já duram há horas ou semanas. Essa proposição suscitou outro debate que questionava se as bases moleculares e fisiológicas implicadas nesses mecanismos mnemônicos seriam sequenciais ou paralelas (HEBB DO apud. McGAUGH, 1966). Posteriormente, experimentos foram capazes de bloquear seletivamente memórias em diferentes estágios temporais, evidenciando a existência de mais de um processo em andamento (AGRANOFF BW et al., 1965; IZQUIERDO et al., 1998, 1999; McGAUGH, 1966). Foi

mostrado que a gênese de uma nova memória inicia ao menos dois traços mnemônicos no encéfalo (RUDY, 2014, p.158). O primeiro processo é mantido enquanto a memória definitiva não foi formada: é lábil, transitório e decai rapidamente. Dura desde os primeiros segundos do aprendizado até 6h após, e é denominado *memória de curta duração* ou *curto prazo*. O segundo é mais estável, menos suscetível e decai lentamente. Varia de 6h até semanas ou meses após a aquisição e foi nomeado *memória de longa duração* ou *longo prazo*. Por fim, as memórias duradouras, aquelas que podem ser lembradas desde meses após a aquisição e virtualmente pelo resto da vida, são referidas como *memórias de longa duração remotas* (Figura 2), de modo que as anteriores são ditas *memória de longa duração recentes*.

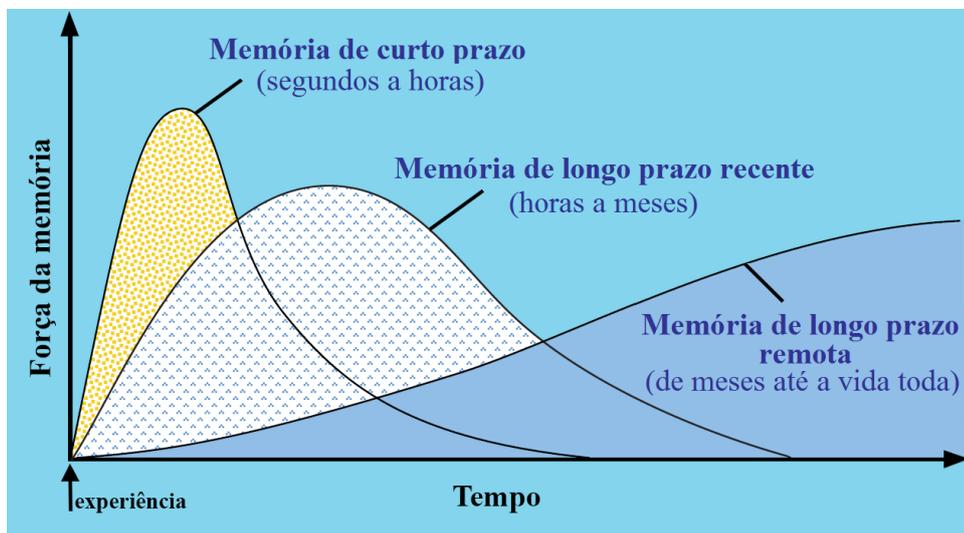


Figura 2. Classificação de uma memória conforme o tempo de duração e força. Modificado e traduzido de McGaugh, 2000.

1.3. Múltiplos sistemas de memória

Relatos clínicos já haviam evidenciado a relação entre o lobo medial temporal (MTL) e a memória (VAN BECHTEREW 1900 apud. SQUIRE et al., 2004), mas poucos foram tão elucidativos quanto o caso do paciente H.M. (SQUIRE, 2009), que se tornou mundialmente conhecido. H.M. (iniciais de Henry Molaison, um cidadão americano nascido em 1926) era portador de um sério caso de epilepsia do lobo temporal. Após inúmeras tentativas de tratamento infrutíferas e com a vida do paciente em risco, recorreu-se a uma agressiva cirurgia para ressecção bilateral do lobo temporal. No procedimento, uma larga porção do seu lobo medial temporal foi retirada, incluindo parte do hipocampo, amígdala, e algumas regiões

adjacentes próximas do neocórtex. O córtex entorrinal foi quase completamente removido, causando uma espécie de desconexão entre o hipocampo e as demais regiões do encéfalo. Apesar do aparente sucesso inicial na recuperação pós-operatória, após algum tempo foi constatado que todas as memórias declarativas (i.e., memórias conscientes, de fatos ou eventos) que Henry tinha de dias anteriores à operação haviam sido esquecidas. Pior do que isso, aparentemente ele perdera a capacidade de formar novas memórias declarativas (SCOVILLE & MILNER, 1957). Testes e exames posteriores confirmaram o prognóstico, entretanto também evidenciaram que Henry permaneceu capaz de aprender novas habilidades motoras, embora ele nunca lembrasse conscientemente de tê-las praticado.

O caso do paciente H.M. foi um marco no entendimento da função do MTL, que posteriormente foi sinalizado como o sistema de memórias episódicas, de onde são extraídos e registrados parte do conteúdo de nossas experiências. Além disso, o caso corroborou com a hipótese da existência de vários sistemas de memória, segundo a qual diferentes informações são armazenadas em diferentes regiões do encéfalo, de acordo com o conteúdo (e.g., uma para memórias declarativas e outras para não-declarativas) (SQUIRE, 2004). Desde então, outros trabalhos apontaram a importância do lobo temporal medial na codificação de memórias declarativas (SQUIRE et al., 2004, BARENSE, 2005) e pesquisas conduzidas nos anos seguintes elencaram o hipocampo, especificamente sua região CA1, como a principal na formação desse tipo de memória.

1.4. Sistema medial temporal hipocampal

A formação do traço da memória inclui a associação de informações espaciais e temporais fornecidas durante uma experiência. Quando o conteúdo é recuperado, conscientemente lembramos do episódio e é possível falar sobre ele. O trabalho de Lavenex e Amaral (2000) descreveu um sistema neural localizado no MTL que suporta memórias episódicas e se organiza de forma hierárquica (Figura 3). Ele inicia com a entrada de informações sensoriais que vêm de diferentes regiões do neocórtex e que seguem para níveis mais altos do sistema neural, até atingirem o hipocampo. Em cada etapa, as informações são integradas até chegar no HPC, de forma que lá se encontram muito comprimidas e abstratas. O circuito é um ciclo no qual parte do conteúdo que sai do hipocampo volta para áreas de menor hierarquia, que antes levavam a informação para o hipocampo. Esse circuito é denominado sistema medial temporal hipocampal (MTH) e inclui, além do hipocampo, também o subículo

e regiões adjacentes como os córtices entorrinal, parahipocampal e perirrinal como parte do sistema que sustenta as memórias declarativas. Porém, a existência desse sistema para evocação de eventos cotidianos não explica porque deixamos de lembrar de muitas de nossas experiências, enquanto outras perduram para toda a vida. Qual o destino das memórias conforme envelhecem? E qual o papel do sistema MTH nas memórias de longo prazo? Algumas das hipóteses e teorias levantadas para responder essas questões são abordadas a seguir.

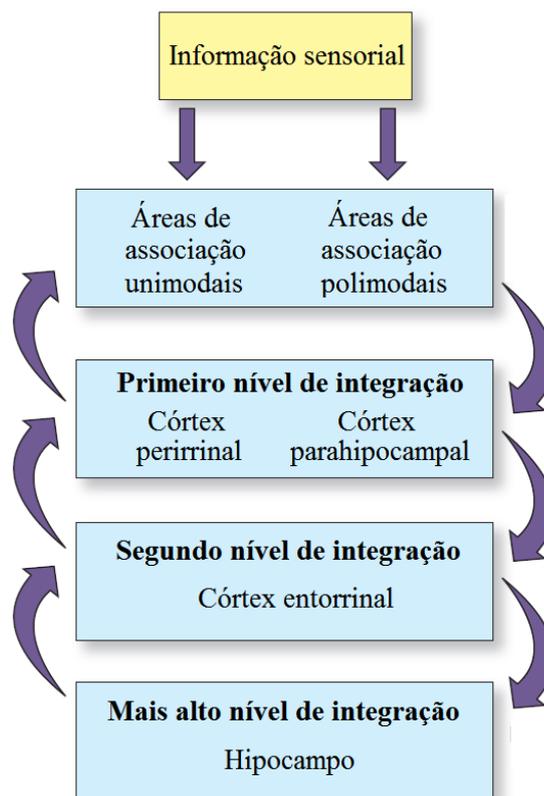


Figura 3. Sistema medial temporal hipocampal. Esquema da organização hierárquica do fluxo de informações de áreas associativas (unimodais e polimodais) do neocórtex para o MTL, descrito por Lavenex e Amaral (2000). Modificado e traduzido de Rudy (2014).

1.5. Consolidação: sináptica e sistêmica (teoria standard e outras)

Atualmente é consenso que o fenômeno da consolidação da memória é dependente do tempo (McGAUGH, 2000) e geralmente é referido mediante dois processos: *consolidação sináptica* e *consolidação sistêmica* (DUDAI, 2004; MORRIS, 2006).

A consolidação sináptica (ou celular) ocorre nas horas seguintes ao aprendizado. Nela, cascatas de sinalização intracelular resultam em alterações nas células e em redes locais. Grande

parte das descobertas sobre os processos biológicos envolvidos na consolidação sináptica foi obtida principalmente no hipocampo, utilizando a tarefa de esquivas inibitória (GOLD, 1986, IGAZ et al, 2002, IZQUIERDO 2006). Atualmente, são conhecidos alguns dos mecanismos que modulam a formação da memória, por exemplo os que requerem ativação de receptores de glutamato NMDA, metabotrópicos e AMPA em CA1. Também foi descrita a necessidade de quatro principais grupos de proteínas kinases (CaMKII, PKC, PKA e ERKs), que determinam a fosforilação e ativação de muitas outras enzimas (BARRIA et al. 1997, ROBERSON et al, 1999).

Já a *consolidação sistêmica* é mais prolongada, levando semanas até décadas em humanos. Nela, com o passar do tempo, as memórias passam por uma reorganização encefálica gradual, na qual se observa diminuição do envolvimento do hipocampo para evocação e aumento do engajamento do neocórtex. (FRANKLAND, 2005; SQUIRE, 1995; SQUIRE, 2004, QUILLFELDT et al., 1996). Esse fenômeno ocorre para grande parte das memórias, mas não é universal, como já foi demonstrado que memórias espaciais e autobiográficas sempre dependerão da atividade hipocampal (MARTIN et al., 2005, ADDIS et al, 2004).

Tem sido aceito que a consolidação sistêmica influencia na precisão da memória, ocorrendo paralelamente à sua generalização, além de ter sua dinâmica temporal modulada por outros fatores, como o aumento de glicocorticóides relacionados ao estresse (PEDRAZA et al., 2015). Pelo menos três teorias, sucintamente descritas a seguir, tem como objetivo explicar como se estabelecem e se recuperam, ao nível de sistemas, as memórias de longa duração, que são menos suscetíveis a perturbações.

Na *teoria standard da consolidação sistêmica*, elaborada por David Marr (1971), é proposto que a consolidação se inicia com a interação do sistema MTH, mais precisamente do hipocampo, com regiões corticais, que mantém a coerência do engrama até que, com o passar do tempo, mecanismos intrínsecos do córtex o estabeleçam mais definitivamente. Assim, o hipocampo teria um papel temporário na retenção da memória, participando do acesso rápido e armazenamento daquelas recém formadas, enquanto as memórias mais antigas seriam suportadas pelas regiões corticais, independentemente do hipocampo, porém de acesso mais lento. A teoria, contudo, prediz que danos ao sistema MTH afetariam apenas as memórias recentes, não prejudicando a evocação de memórias antigas, o que só ocorre no caso de danos parciais ao HPC. Quando a lesão é total, ambas memórias, recentes e remotas, são prejudicadas.

A *teoria dos múltiplos traços*, de autoria de Nadel e Moscovitch (1997) busca elucidar como danos parciais no hipocampo poderiam separar memórias antigas de novas. Segundo ela, o traço mnemônico também se origina tanto no HPC quanto em regiões corticais, mas memórias

antigas tendem a ter maior número de acessos e a reativação das memórias geraria novos traços (ou “índices”) no hipocampo, facilitando a recuperação de memórias remotas. Assim, danos parciais no HPC poderiam corromper alguns dos índices de acesso — mas não todos que foram criados para uma memória remota, tornando-a mais resistente.

A *teoria da transformação do traço*, mais recente, considera que não apenas o tempo, mas também a representação neural da consolidação da experiência é modificada, alterando de forma correspondente a natureza da memória. Assim, diferente da teoria dos múltiplos traços, dependendo das condições limites em que as memórias são reativadas (i.e., se em condições mais ou menos semelhantes à que as memórias foram formadas), a evocação faz com que episódios similares disputam a dominância, ou seja, traços recentes, mais precisos e independentes do hipocampo, competem com traços remotos, menos precisos e corticalizados (SEKERES, MOSCOVITCH, WINOCUR, 2017). Com isso, é possível compreender porque memórias mais remotas, apesar de melhor estabelecidas, também são menos específicas, menos rica em detalhes e mais gerais.

1.6. Generalização ou precisão de memórias

A generalização de memórias é fenômeno qualitativo no qual as memórias perdem detalhes que a compõe; com o tempo, as memórias evocadas ficam menos específicas (precisas) e com menos qualidade, tornando-se mais vagas e esquemáticas. Geralmente, é aceito que o processo de generalização decorre do processo de corticalização como consequência da consolidação sistêmica, pois quando reativadas, as memórias voltam a exibir tanto precisão quanto dependência hipocampal (DE OLIVEIRA ALVARES, 2011).

Apesar de possuir relevância do ponto de vista adaptativo, considerando um animal em um ambiente cheio de riscos, a generalização exacerbada do medo (por exemplo, aquela que se manifesta mesmo em locais seguros) é sintomática de transtornos como o de estresse pós traumático (TEPT) e o transtorno de ansiedade generalizada (TAG). Isso tem levantado a questão de qual o papel específico do HPC na mediação da expressão de memórias discriminatórias detalhadas, e se áreas relacionadas, como o sistema MTH, participam da sustentação do traço e da acuidade de discriminação ao longo de diferentes intervalos de tempo.

1.7. O córtex entorrinal lateral

O córtex entorrinal, localizado no lobo medial temporal, possui conexões tanto com o hipocampo quanto com o neocórtex, formando uma espécie de ‘ponte’ entre essas duas áreas já implicadas no armazenamento e evocação de memórias (LAVENEX & AMARAL, 2000). É considerado o segundo nível de processamento das informações que circulam no sistema MTH e, anatomicamente, é dividido em duas regiões: medial e lateral. A percepção de tempo e, em algum grau, o sistema de navegação são relacionados ao córtex entorrinal lateral (LEC) (TSAO et al, 2018). Filogeneticamente, o entorrinal é classificado como anterior ao neocórtex (com seis camadas celulares) e posterior ao hipocampo (arquicórtex, com três camadas), uma vez tem complexidade intermediária, com cinco camadas neuronais (FILIMONOFF apud. FISCHL et al., 2009). Além disso, LEC, hipocampo e amígdala estão localizados no MTL, ou seja, são necessários à formação de memórias episódicas. Não por acaso, essas regiões constituem as três primeiras áreas acometidas na doença de Alzheimer (HYMAN BT, 1990).

Existem divergências na literatura sobre o requerimento do córtex entorrinal lateral na evocação das memórias de longo prazo remotas consolidadas sistemicamente (i.e, independentes do hipocampo). Entretanto, há concordância sobre a sua participação na evocação de memórias recentes (TAKEHARA-NISHIUCHI, K. 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho consiste em uma das etapas iniciais de um projeto mais abrangente do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto tem como objetivo investigar a participação de dez diferentes regiões do córtex cerebral relacionadas com o processamento de memórias episódicas e declarativas. Com base em resultados anteriores do grupo, hipotetizamos que a participação de diferentes áreas corticais pode estar sujeita a dinâmicas temporais distintas na consolidação sistêmica (desde qual momento, e até quando a estrutura é requerida para a evocação). Para o HPC, e algumas áreas neocorticais como o córtex cingulado anterior (HAUBRICH et al, 2016) e o córtex parietal posterior (QUILLFELDT et al., 1996), este perfil temporal é relativamente bem conhecido. Já quanto ao LEC, apesar de representar uma estrutura importante no processamento de memórias declarativas, atuando como uma ponte entre as regiões do hipocampo e do neocórtex, ainda existem divergências na literatura científica sobre a sua participação nas memórias de longo prazo remotas que já independem do HPC. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estabelecer o perfil temporal da consolidação sistêmica no LEC e a qualidade (i.e., nível de generalização) da memória consolidada.

3. OBJETIVOS

Caracterizar o perfil temporal de participação do córtex entorrinal lateral na evocação e na generalização de memórias de longo prazo, recentes e remotas, obtidas através da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto, por meio da inibição farmacológica dessa estrutura encefálica.

3.1. Objetivos específicos

1. Verificar a ocorrência da consolidação sistêmica através da inibição do HPC com muscimol, para uma memória de longo prazo recente (dois dias após a aquisição) e remota (28 dias após aquisição);
2. Verificar a participação do LEC, através de sua inibição farmacológica temporária com muscimol, na sustentação de memórias de longo prazo aos 2, 28 e 45 dias após a aquisição;
3. Verificar participação do LEC na qualidade discriminativa (i.e, nível de detalhamento) de memórias de longo prazo através de sua inibição farmacológica temporária com muscimol, nos intervalos de 2 e 28 dias após a aquisição.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram empregados ratos *Wistar* machos, com idade entre 60 e 90 dias (peso entre 250 e 450g) oriundos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, obtidos sob aprovação do Projeto UFRGS de número 35969. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação do Departamento de Biofísica, em área climatizada (22° à 26°C, umidade constante) e com ciclo luminoso constante durante todo o ano (12h de claro / 12 horas de escuro, luzes acesas das 7 às 19h). Acondicionados em gaiolas de plexiglass de dimensões 41 x 34 x 16 cm, com grade alta de 5,0 cm acima da borda (conforme legislação vigente) e maravalha seca e limpa, trocada a cada dois dias.

4.2. Procedimentos cirúrgicos

Cada animal foi anestesiado e cuidadosamente posicionado no aparelho estereotáxico (Fabricação: David Kopf, modelo 1404) tendo a superfície do crânio exposta mediante incisão sagital com bisturi. Com emprego de uma broca odontológica foi realizada a craniotomia nos locais correspondentes a estrutura alvo. As medidas dos eixos (AP: ântero-posterior; LL: latero-lateral; DV: dorso-ventral) são tomadas utilizando como ponto inicial de referência o bregma do crânio (ponto 0, 0, 0 nas coordenadas cartesianas); sempre com inclinação da cabeça de -0,33 cm) para correta introdução das cânulas. A coordenada dorso-ventral final da cânula fica 1 milímetro acima da área de interesse, para que no teste uma agulha mais fina ("mizzy", de calibre 30) e 1 mm mais comprida, atinja a estrutura de interesse e entregue o fármaco na região, minimizando lesões locais e evitando que a droga suba por capilaridade no espaço entre a cânula e a mizzy. As coordenadas do córtex entorrinal lateral (AP: - 0,7; LL: +/- 0,5; DV: - 0,84) e do hipocampo (AP: - 0,4 ; LL: +/- 0,3; DV: - 0,16) foram obtidas a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986), de acordo com a faixa de peso dos animais e corrigidas conforme as variações na forma e nas dimensões do crânio e cérebro das diferentes linhagens criadas. As cânulas intracerebrais de aço inoxidável foram fixadas no crânio com acrílico dentário.

4.3. Fármacos

Pré cirurgia, como anestésico geral, foi administrado via intraperitoneal (i.p.) a mistura de Cetamina e Xilazina, na proporção 7:3, doses de 140 mg/Kg e 12 mg/Kg, respectivamente. Para analgesia pós cirúrgica, nos três primeiros dias os animais receberam, via subcutânea, Meloxicam (2mg/kg/24h), analgésico e anti-inflamatório não esteróide.

Para inibição reversível da estrutura de interesse, antes do teste é realizada a infusão intracerebral bilateral utilizando 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ do fármaco muscimol, agonista seletivo dos receptores GABA_A e parcial dos receptores GABA_C (Majchrzak, 2000). Como veículo das infusões locais, no grupo controle, foi utilizado o tampão fosfato salino (PBS).

4.4. Procedimentos comportamentais

4.4.1 Protocolo de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC)

A tarefa comportamental foi efetuada em uma caixa de condicionamento automatizada de dimensões 22 x 22 x 32,5 cm (L x C x A), paredes listradas e chão gradeado, por onde pode ser aplicada uma diferença de potencial, gerando uma corrente elétrica de 0,1 a 1,0 mA, conforme protocolo. A caixa contém uma luz led branca e câmera na parte superior, ligada a um notebook, pelo qual é possível fazer a visualização dos animais e programação do tempo e ações dos protocolos através de um software, trata-se do contexto A. Uma segunda caixa, com dimensões 25 x 25 x 25, chão gradeado, luz led branca lateral e paredes bege lisa, foi usada como contexto similar, denominada contexto B.

Na sessão de condicionamento (treino) os animais são colocados na caixa de condicionamento A e após 3 min, recebem 2 choques de 0,5 mA com dois segundos de duração e intervalo de 30 segundos entre eles, permanecendo mais cinco segundos antes de serem retirados e retornarem a suas caixas de habituação.

Na sessão de teste, os animais recebem fármaco ou veículo quinze minutos antes de serem expostos a caixa em que foram treinados (contexto A) ou a uma caixa similar (contexto B). Após colocados, permanecem na caixa durante 5 minutos, tempo no qual é realizado o registro comportamental, onde se quantifica o tempo do comportamento defensivo de

congelamento (*freezing*, em inglês), tomado como índice de retenção da memória da experiência vivenciada no local.

A sessão de reteste consiste em expor novamente os animais a caixa de mesmos parâmetros do teste, porém 4 horas após ele ter ocorrido. Dessa forma, avalia-se o comportamento sem a intervenção do efeito do fármaco.

4.4.2 Desenho experimental

Experimento 1: Para demonstrar a ocorrência da consolidação sistêmica, i.e. independência do hipocampo na evocação de memórias de longo prazo, os animais foram treinados no protocolo de CAC e testados 2 e 28 dias após o treino no mesmo contexto (contexto A). Sete dias antes do teste os animais foram operados para a implantação de cânulas na região do hipocampo dorsal (HPCd), procedimento necessário para inibição da estrutura alvo através infusão do fármaco (ou veículo, sem inibição, para os controles). Quatro horas após as sessões de teste foi realizado o reteste.

Experimento 2: Para verificar a participação do córtex entorrinal lateral em memórias de longo prazo os animais foram treinados no protocolo de CAC e testados nos intervalos de 2 e 28 dias após o treino no mesmo contexto (contexto A). Sete dias antes do teste os animais foram operados para a implantação de cânulas na região do LEC, procedimento necessário para inibição temporária e reversível da estrutura alvo através infusão do fármaco (ou veículo, sem inibição, para os controles). Quatro horas após as sessões de teste foi feito o reteste.

Experimento 3: Para verificar a participação do córtex entorrinal lateral na generalização de memórias de longo prazo, os animais foram treinados no protocolo de CAC e testados 28 dias após o treino. Sete dias antes do teste, foi realizada a cirurgia para implantação de cânulas na região de interesse. O teste foi executado em um contexto diferente, porém similar ao treino (contexto B). Quatro horas após as sessões de teste foi feito o reteste.

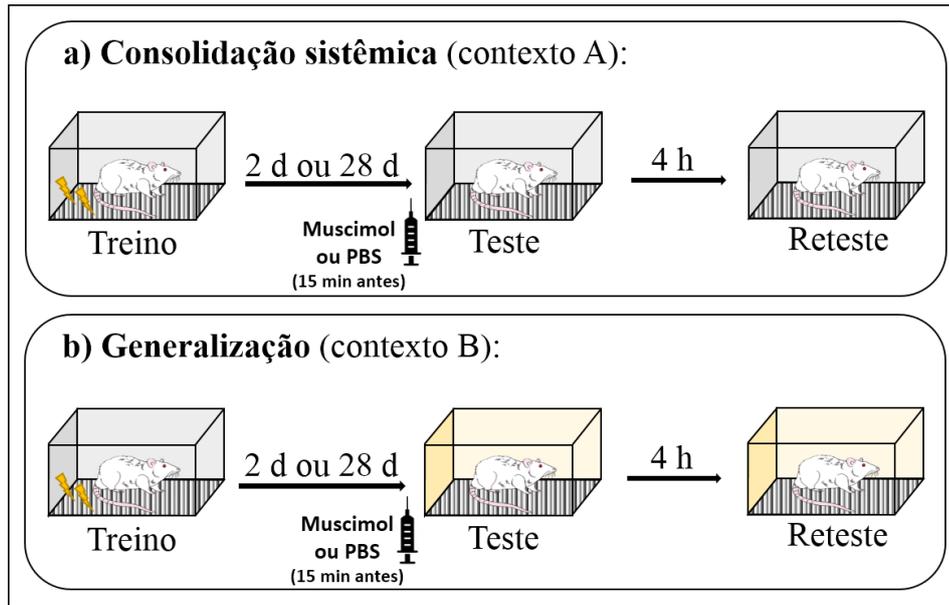


Figura 4. Esquema geral do protocolo experimental. **(a)** Nos experimentos de consolidação sistêmica, todas as etapas do protocolo são realizadas na mesma caixa de condicionamento do teste. **(b)** Já nos experimentos de generalização foi avaliada a retenção da memória em um contexto diferente ao do treino, porém similar. O desenho dos contextos em que foram realizados os experimentos apresentado neste protocolo é esquemático, melhores descrições são apresentadas acima.

4.5. Histologias

Para verificar o correto posicionamento das cânulas intracerebrais no HPCd e no LEC, foram recolhidas amostras de tecido das respectivas regiões. As amostras foram fatiadas, com auxílio do criostato, em cortes coronais de 50 μm , preparadas em lâminas gelatinizadas e coradas com Nissl.

4.6. Análise estatística

Como análise estatística preliminar, foi utilizado o teste T para amostras independentes. Nos experimentos subsequentes, planeja-se testar de 10 a 12 animais (GENRO et al.,2012) por grupo, possibilitando uma ANOVA com $\alpha = 0,05$ e poder estatístico de 0,9.

5. RESULTADOS

Na tabela a seguir são sumarizados as informações relativas aos experimentos realizados e, posteriormente, são apresentados os resultados obtidos nos ensaios.

Tabela 1. Resumo dos experimentos realizados. São apresentados os tempos utilizados (2d para o teste de memórias recentes ou 28d para memórias remotas), contextos (treino ou similar), estruturas avaliadas (hipocampo ou córtex entorrinal lateral) e número amostral por grupos de tratamento (PBS ou muscimol).

Teste – tempo após aquisição	Contexto	Estrutura	Número amostral	
			PBS	Muscimol
2 dias	A	HPC	6	7
28 dias	A	HPC	8	6
2 dias	A	LEC	14	9
28 dias	A	LEC	8	8
28 dias	B	LEC	8	9

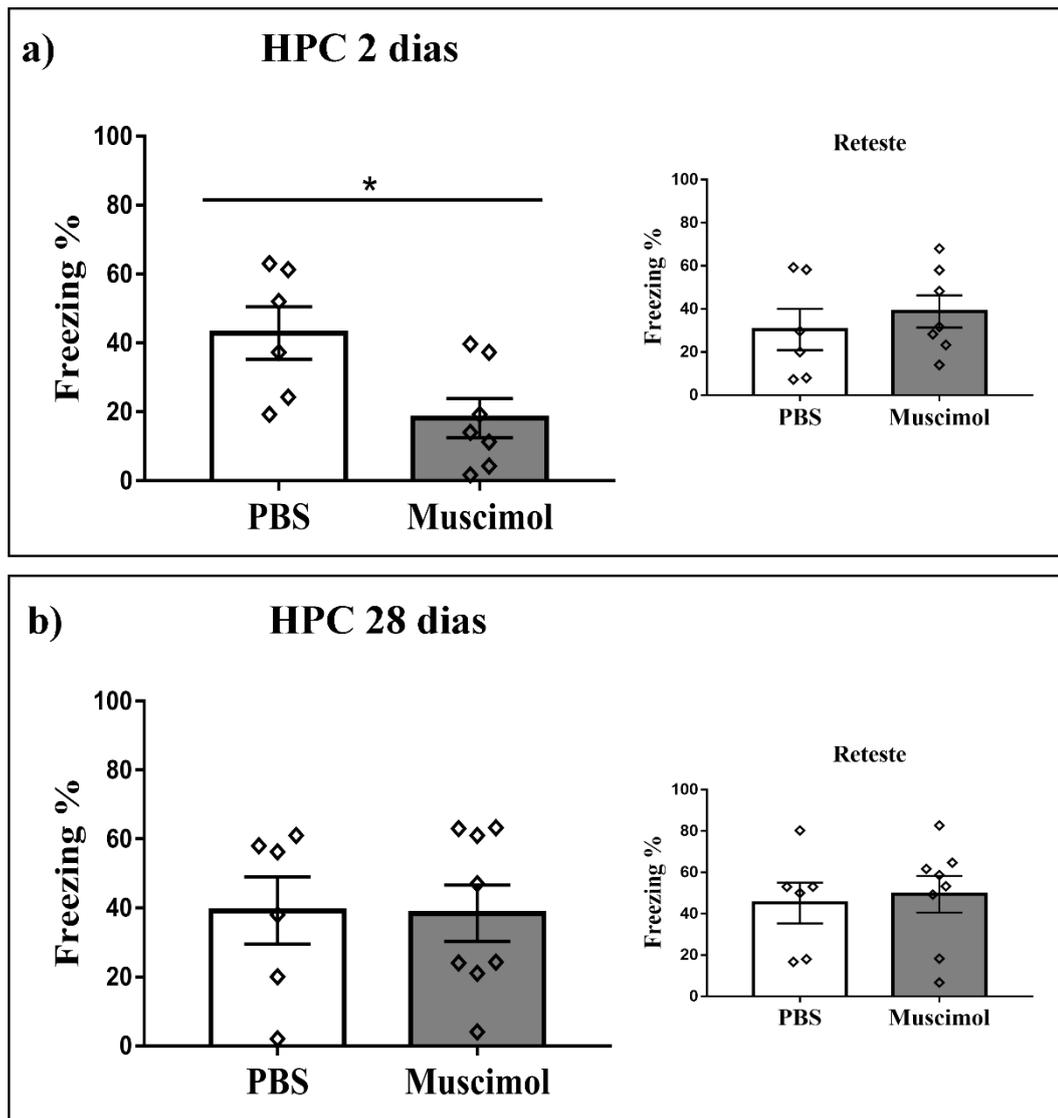


Figura 5. Verificação da consolidação sistêmica. Todos os animais passaram pelo protocolo de CAC e tiveram mensurados o nível de retenção da memória aversiva a partir do tempo de congelamento (freezing) durante o teste e reteste realizados aos 2 dias (a) ou 28 dias (b) após o treino. Quinze minutos antes do teste foram separados em dois grupos e receberam a infusão de PBS (branco) ou muscimol (cinza) na região do hipocampo. Quatro horas após o teste os animais foram retestados para avaliação da retenção da memória do treino sem o efeito do fármaco. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PBS e muscimol no teste de memória de 2 dias ($T_{11} = 2,632$; $p = 0,0233$) mas não para uma de 28 dias ($T_{12} = 0,06043$; $p = 0,9528$), indicando a necessidade do hipocampo na evocação de memórias de longo prazo recentes e sua independência em memórias de longo prazo remotas. No reteste, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos PBS e muscimol em 2 dias ($T_{11} = 0,6992$; $p = 0,4989$) ou 28 dias ($T_{12} = 0,3188$; $p = 0,7554$). Dados são expressos em média \pm SEM. * Representa $p < 0,05$.

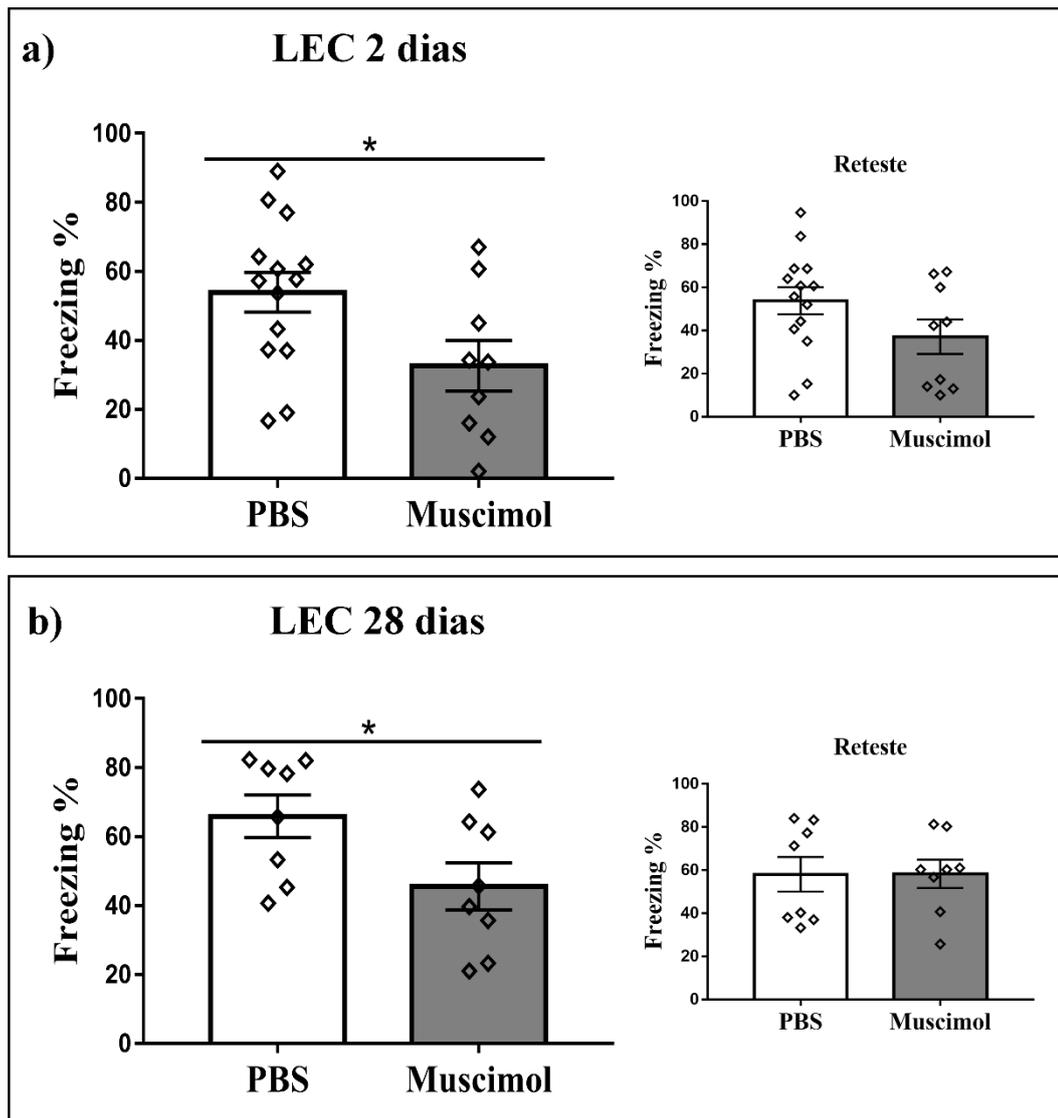


Figura 6. Contribuição do córtex entorrinal lateral em memórias de longo prazo recentes e remotas. Os animais passaram pelo protocolo de CAC e foram testados e retestados aos 2 dias **(a)** ou 28 dias **(b)** após o treino, no mesmo contexto, denominado A. Quinze minutos antes do teste foram separados em dois grupos e receberam a infusão de PBS ou muscimol na região do córtex entorrinal lateral. Quatro horas após o teste, sem o efeito do fármaco os animais foram retestados. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PBS e muscimol no teste de uma memória de 2 dias ($T_{21} = 2,299$; $p = 0,0319$) e também para uma de 28 dias ($T_{14} = 2,217$; $p = 0,0437$). Ambos os grupos não diferiram significativamente nos retestes de dois ($T_{21} = 1,648$; $p = 0,1143$) e 28 ($T_{14} = 0,0202$; $p = 0,9842$) dias. Dados são expressos em média \pm SEM. * Representa $p < 0,05$.

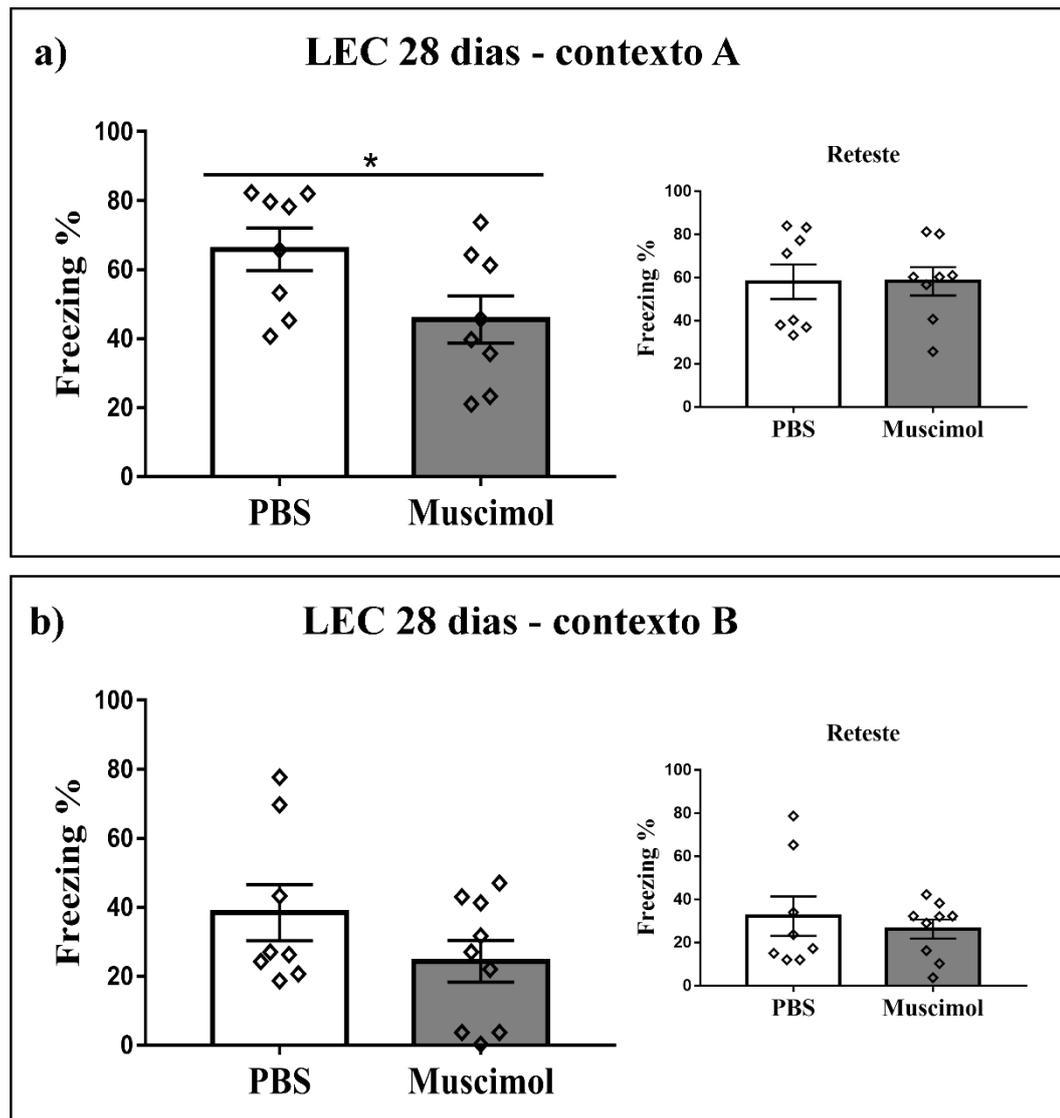


Figura 7. Contribuição do LEC na evocação de uma memória remota em contexto similar ao da aquisição. **(a)** Resultado do teste com a inativação do entorrinal aos 28 dias no mesmo contexto do treino – repetido da Figura 6b a fim de comparação com o contexto alternativo, exibido abaixo (Figura 7b). **(b)** Os animais passaram pelo protocolo de CAC e foram testados e retestados em ou 28 dias após o treino, em um contexto alternativo, denominado B. Quinze minutos antes do teste foram separados em dois grupos para infusão de PBS ou muscimol na região do LEC. Quatro horas após foi feito o reteste. Não foi encontrada diferença significativa quando comparados grupos com ou sem a inibição do LEC ($T_{15} = 1,403$; $p = 0,1809$). Os grupos também não diferiram no reteste ($T_{15} = 0,6104$; $p = 0,5507$). Dados são expressos em média \pm SEM. * Representa $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

6.1. Consolidação sistêmica HPC

Uma vez que a independência do hipocampo na evocação de memórias episódicas de longo prazo remotas (consolidação sistêmica) já está bem estabelecida na literatura científica, testamos sua participação aos dois e 28 dias após o treino para verificação da ocorrência do fenômeno (Figura 5). No teste de dois dias, o bloqueio temporário do hipocampo prejudicou a evocação do medo, demonstrando que o HPC é requerido para sustentação de memórias de longo prazo recentes ($T_{11} = 2,632$; $p = 0,0233$). No reteste, que tem como objetivo avaliar o nível retenção na ausência do efeito do fármaco, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($T_{11} = 0,6992$; $p = 0,4989$). Já aos 28 dias após a aquisição da memória de medo, a re-exposição ao mesmo contexto do aprendizado, com inativação farmacológica do hipocampo, não prejudicou significativamente a evocação dos animais, quando comparados ao grupo controle ($T_{12} = 0,06043$; $p = 0,9528$). O mesmo padrão foi mantido no reteste ($T_{12} = 0,3188$; $p = 0,7554$). Esses resultados indicam que o hipocampo não é mais requerido na evocação de memórias remotas de longo prazo e, portanto, houve a consolidação sistêmica, em concordância com os demais trabalhos de pesquisa semelhantes. Quando foi realizada uma ANOVA de duas vias na verificação estatística dos dados, a significância foi reduzida, possivelmente devido ao baixo número amostral dos grupos (Tabela 1). Pretende-se futuramente aumentar o número amostral para aplicar uma análise estatística mais apropriada e robusta. Embora os resultados obtidos sejam preliminares, outro estudo concluído em nosso laboratório respalda nossas evidências e reforça o consenso de que memórias episódicas de longo prazo remotas dependem menos do HPC e mais do neocórtex para a evocação. Nesse outro estudos, o fenômeno da consolidação sistêmica é observado tanto na região do HPC quanto do CCA (HAUBRICH et al, 2016). Como existem estudos que relacionam a necessidade do HPC para precisão de memórias episódicas, também pretendemos analisar sua participação em memórias episódicas recentes e remotas, aos 2 e 28 dias, utilizando o contexto similar (B).

6.2. Participação do LEC durante a evocação de memórias de longo prazo

Após o estabelecimento da consolidação sistêmica aos 28 dias, os experimentos subsequentes avaliaram a participação do córtex entorrinal lateral em memórias de longo prazo recentes (2 dias) e longo prazo remotas (28 dias) no mesmo contexto do treino (contexto - A) (Figura 6). Aos dois dias, a inibição do LEC prejudicou a evocação da memória de longo prazo recente ($T_{21} = 2,299$; $p = 0,0319$) e não houve diferença entre os tratamentos no reteste ($T_{21} = 1,648$; $p = 0,1143$), o que indica a participação dessa região na sustentação de memórias recentes, também em consenso com a literatura. Já o bloqueio temporário do LEC durante o teste de uma memória remota de longo prazo, aos 28 dias, gerou prejuízo a evocação, indicando também sua participação na sustentação de memórias de longo prazo remotas, já consolidadas e independentes do hipocampo.

Contudo, não foi realizada uma ANOVA pois o número amostral, apesar de suficiente para o experimento de dois dias, é baixo no de 28 dias, e será aumentado nos próximos experimentos. Após este procedimento e confirmada a participação do LEC para memórias com 28 dias utilizando ANOVA, pretendemos investigar um intervalo de tempo maior entre a aquisição e o teste, provavelmente 45 dias, para avaliar se uma memória de longo prazo ainda mais remota segue dependente do córtex entorrinal lateral para ser evocada ou, se em algum momento, o LEC também deixa de participar na sustentação desse traço. Trabalhos utilizando outra tarefa menos aversiva, de esquiva inibitória, indicam a necessidade do LEC na evocação de memórias remotas com 26 e 31 dias, mas não aos 60 dias (QUILLFELDT, 1994, 1996).

É notável que foi observada uma tendência de aumento de freezing comparando o teste aos 2 dias com o teste aos 28 dias, com médias até 21% superiores aos 28 dias, mas que não apresentaram diferença estatística significativa de acordo com o teste T. Isso poderia indicar que a memória recente tem pior qualidade do que a remota, porém uma explicação mais prosaica para esse fenômeno foi elaborada por McAllister e McAllister (1967), que definiram como “incubação” o processo no qual memórias aversivas apresentam espontâneo aumento de intensidade conforme aumenta o tempo desde a apresentação ao último estímulo aversivo (MCALLISTER & MCALLISTER apud. EYSENCK, 1968). Em condições normais, quanto mais longínquo o trauma, maior é a confiança na pressuposição de que não se estará sujeito novamente ao mesmo estímulo aversivo que o causou. É possível que a quebra da expectativa, associada à forte resposta emocional que a ela é associada, seja um dos fatores chave na modulação deste comportamento.

6.3. Participação do LEC na generalização

Em um contexto diferente, porém similar ao do treino (contexto B), não houve diferença significativa entre os grupos no teste ($T_{15} = 1,403$; $p = 0,1809$) nem no reteste ($T_{15} = 0,6104$; $p = 0,5507$) (Figura 7b). Isso pode indicar que o LEC é desnecessário na manutenção de memórias de longo prazo remotas cuja evocação é induzida em um contexto similar ao do treino. Contudo, como este trabalho faz parte de um projeto maior em andamento, o experimento que avaliará a participação do entorrinal em uma memória de longo prazo recente (2 dias) em contexto similar está em andamento. Assim, ainda não é possível afirmar conclusivamente se o entorrinal é necessário na precisão das memórias.

Quando comparados contextos A e B aos 28 dias (Figura 7), é possível observar que há menor expressão da memória aversiva no contexto alternativo, demonstrando a similaridade entre os contextos escolhidos. Em testes piloto realizados anteriormente para a determinação dos ambientes que seriam utilizados, ambos os contextos já haviam sido testados quanto ao grau de similaridade e resultados semelhantes haviam sido obtidos.

7. CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos principais resultados até o momento demonstram que: (1) o hipocampo participa da evocação de memórias episódicas recentes, de 2 dias, mas não remotas, de 28 dias, evidenciando a consolidação sistêmica; (2) o córtex entorrinal lateral parece participar da sustentação da evocação de memórias recentes e remotas, mesmo quando a atividade do HPC não é mais requerida; e (3) em contexto similar ao do treino, não houve diferença significativa entre os grupos muscimol e PBS na evocação de uma memória de longa duração.

8. PERSPECTIVAS

1. Aumentar o número amostral dos experimentos de 2 e 28 dias para o HPC e 28 dias para o entorrinal contextos A e B.
2. Realizar a inativação farmacológica do LEC de uma memória com 2 dias, no contexto similar ao treino (contexto B).
3. Realizar a inativação farmacológica do córtex entorrinal lateral de uma memória com 45 dias para investigar se a estrutura participa de uma memória de longo prazo ainda mais remota ao fechamento da janela de consolidação sistêmica;

REFERÊNCIAS

- ADDIS DR, MOSCOVITCH M, CRAWLEY AP, McANDREWS MP. Recollective qualities modulate hippocampal activation during autobiographical memory retrieval. *Hippocampus*, 14(6), 752–76, 2004.
- AGRANOFF BW, DAVIS RE, BRINK JJ. Memory fixation in the goldfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(3), 788–793, 1965.
- ANDERSON A, McMULLAN R. Neuronal and non-neuronal signals regulate *Caenorhabditis elegans* avoidance of contaminated food. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2018.
- BARENSE MD, BUSSEY TJ, LEE ACH, ROGERS TT, DAVIES RR, SAKSIDA LM, MURRAY EA, GRAHAM KS. Functional Specialization in the Human Medial Temporal Lobe. *Journal of Neuroscience*, 25(44), 10239–10246, 2005.
- BARRIA A, MULLER D, DERKACH V, GRIFFITH LC, SODERLING TR. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CAM-KII during long term potentiation. *Science* 276: 2042-2045, 1997.
- DE OLIVEIRA ALVARES L, EINARSSON EÖ, SANTANA F, CRESTANI AP., HAUBRICH J, CASSINI LF, NADER K, QUILLFELDT JA. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*, 22(5), 1092–1095, 2011.
- DUDAI Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, 55(1), 51–86, 2004.
- EYSENCK HJ. A theory of the incubation of anxiety/fear responses. *Behavior Research and Therapy*, Vol. 6, p. 309 -321, 1968.
- FISCHL B, STEVENS AA, RAJENDRAN N, YEO BTT, GREVE DN, VAN LEEMPUT K, POLIMENI JR, KAKUNOORI S, BUCKNER RL, PACHECO J, SALAT DH, MELCHER J, FROSCHE MP, HYMAN BT, GRANT PE, ROSEN BR, VAN DER KOUWE AJW, WIGGINS GC, WALD LL, AUGUSTINACK JC. Predicting the location of entorhinal cortex from MRI. *Neuroimage*, 47(1), 8-17, 2009.
- FRANKLAND PW, BONTEMPI B. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 119–130, 2005.
- GENRO BP, DE OLIVEIRA ALVARES L, QUILLFELDT JA. Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. *Neurobiol Learn Mem.* 97(4):355-60, 2012.
- GOLD PE. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavior and Neural Biology* 46:87-98, 1986.

HAUBRICH J, CASSINI LF, DIEHL F, SANTANA F, FÜRSTENAU DE OLIVEIRA L, DE OLIVEIRA ALVARES L, QUILLFELDT JA. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus*, 26(7), 924–932, 2016.

HERCULANO-HOUZEL S, LENT R. Isotropic Fractionator: A simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *The Journal of Neuroscience*, EUA, v 25, n 10, p 2518-2521, 2005.

HERCULANO-HOUZEL S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 2009.

HYMAN BT, VAN HOESEN GW, DAMASIO AR. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease. *Neurology*, 1900.

IGAZ LM, VIANNA MRM, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6781–6789, 2002.

IZQUIERDO IA. Different forms of post-training memory processing. *Behavioral and Neural Biology*, 1989.

IZQUIERDO, Iván Antonio - Memória - Editora Artmed, 2011. (livro)

IZQUIERDO I, BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, BONINI JS, MEDINA HJ, CAMMAROTA M. Different molecules cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences* 29: 496-505, 2006.

IZQUIERDO I, MEDINA JH, IZQUIERDO LA, BARROS DM, DE SOUZA MM, & MELLO E SOUZA T. Short- and Long-Term Memory Are Differentially Regulated by Monoaminergic Systems in the Rat Brain. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69, 219-224, 1998.

IZQUIERDO I, MEDINA JH, VIANNA MRM, IZQUIERDO LA, & BARROS DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioral Brain Research*, 103, 1-11, 1999,

LAVENEX P, AMARAL DG. Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity. *Hippocampus*, 10(4), 420–430, 2000.

LECHNER HA, SQUIRE LR, BYRNE JH. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. *Learning & Memory*, 1999.

MARTIN SJ, DE HOZ L, MORRIS RGM. Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia*, 43(4), 609–624, 2005.

McGAUGH JL. Memory--a Century of Consolidation. *Science* Vol. 287, 2000.

McGAUGH JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 1966.

- MONFILS MH, COWANSAGE KK, KLANN E, LEDOUX JE. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. *Science*, 2009.
- MORRIS RGM. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience*, 23(11), 2829–2846, 2006.
- PAXINOS G, & WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1986.
- PEDRAZA LK, SIERRA RO, BOOS FZ, HAUBRICH J, QUILLFELDT JA, DE OLIVEIRA ALVARES L. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*, 26(3), 362–371, 2015.
- QUILLFELDT JA. Behavioral methods to study learning and memory in rats. *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*, 271-311, 2006. (livro)
- QUILLFELDT JA, SCHMITZ PK, WALZ R, BIANCHIN M, ZANATTA MS, MEDINA JH, IZQUIEDO I. CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA reverses the effect. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48(2), 437–440, 1994.
- QUILLFELDT JA, ZANATTA MS, SCHMITZ PK, QUEVEDO J., SCHAEFFER E, LIMA JBD, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Different Brain Areas Are Involved in Memory Expression at Different Times from Training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(2), 97–101, 1996.
- ROBERSON ED, ENGLISH JD, ADAMS JP, SELCHER JC, KONDRATICK C, SWEATT JD. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neuroscience* 19: 4337-4348, 1999.
- RUDY JW. *Neurobiology of Learning and Memory*. University of Colorado, Boulder. Segunda edição. (livro)
- SCOVILLE WB & MILNER B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1957.
- SEKERES MJ, MOSCOVITCH M, WINOCUR G. Mechanisms of Memory Consolidation and Transformation. *Studies in Neuroscience, Psychology and Behavioral Economics*, 17–44, 2017.
- SQUIRE LR, ALVARES P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(2), 169–177, 1995.
- SQUIRE LR. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171–177, 2004.
- SQUIRE LR. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, 61(1), 6–9, 2009.

SQUIRE LR, STARK CEL & CLARK RE. The Medial Temporal Lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 279–306, 2004.

TAKEHARA-NISHIUCHI, K. Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neuroscience Research*, 84, 27–33, 2014.

TSAO A, SUGAR J, LU L, WANG C., KNIERIM JJ, MOSER MB, & MOSER EI. Integrating time from experience in the lateral entorhinal cortex. *Nature*, 2018.

WHITE JG, SOUTHGATE E, THOMSON JN, BRENNER S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1986.