

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

JORDANA GRIEBLER LUFT

**A DINÂMICA DOS ENGRAMAS DURANTE A
CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Porto Alegre

2024

JORDANA GRIEBLER LUFT

**A DINÂMICA DOS ENGRAMAS DURANTE A
CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS:**

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

Orientador: Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Griebler Luft, Jordana
A DINÂMICA DOS ENGRAMAS DURANTE A CONSOLIDAÇÃO,
RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS /
Jordana Griebler Luft. -- 2024.
100 f.
Orientador: Lucas de Oliveira Alvares.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Memória. 2. Engrama . 3. Reconsolidação . 4.
Extinção. 5. Consolidação sistêmica. I. de Oliveira
Alvares, Lucas, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível porque tive a ajuda de diversas pessoas, os quais agradeço imensamente.

Primeiramente quero agradecer aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram como fosse preciso. Agradeço também ao meu irmão, por todo o apoio e incentivo nesta trajetória acadêmica. E também ao meu primo Felipe, pelo incentivo e por, junto com meu irmão, ter tornado muitos dias mais animados através das nossas jogatinas.

Agradeço também ao Lucas, meu orientador, por ter aberto as portas do seu laboratório, por auxiliar em meu desenvolvimento durante toda esta trajetória do doutorado e por confiar em mim para a execução deste grande trabalho. Tens um conhecimento admirável que inspira a todos ao seu redor.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurobiologia da Memória com quem compartilhei tantos dias. Em especial ao Bruno e Nicoli, cuja amizade ultrapassou os dias de laboratório e acabaram se tornando grandes amigos com quem compartilhei (e ainda compartilharei) muitas cervejas e risadas, tornando essa jornada acadêmica mais leve. Agradeço ao Bruno também por todos os ensinamentos e auxílios com experimentos durante o doutorado e com esta tese. À Débora, que me acompanha desde os dias de mestrado, auxiliando em diversos experimentos e perrengues de laboratório. Aos outros colegas, não menos especiais: Angel, Mirelle, Henrique, Paula, e também: Aline, Breno, Lucas M, com quem convivi menos.

Ao professor Fábio Cruz e seus alunos, por terem me recebido em seu laboratório e por auxiliarem com o modelo animal deste trabalho.

Ao professor Rogério Margis e seus alunos pelo auxílio com as várias genotipagens que realizei durante este período.

À Isabel Cristina, mais conhecida como Tina, por todos os cafés e conversas em dias de laboratório. A realização deste projeto não seria possível sem o seu carinho e dedicação aos animais e sem a sua presença para alegrar os dias de laboratório.

À Kelly, minha orientadora da graduação, segunda mãe e mestra Jedi, que inspirou (e ainda inspira) esta jovem Padawan a seguir a carreira acadêmica. Te amo (e tu sabe disso).

À minha grande amiga Thamyrys, que sempre me apoiou e deu forças para continuar, apesar de tantas vezes que pensei em desistir. Saiba que te agradeço imensamente por tudo.

À Graziela por todos os bons momentos, risos, conversas, cafés e hambúrgueres compartilhados, tornando os dias mais leves.

Ao meu Shifu Lauro Telles e todos os irmãos Shaolins que compartilharam muitas noites de treinos e competições comigo.

Aos professores do PPG Neurociências por todo o conhecimento compartilhado.

Aos professores que compõem a banca examinadora pelo tempo dedicado para avaliar esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade e por todo o apoio estrutural e financeiro.

À todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

E, finalmente, mas não menos importante, agradeço a todos os animais que possibilitaram responder as perguntas desse estudo.

*There is no scientific study more vital to man than the study of his own brain.
Our entire view of the universe depends on it.*

Francis Crick

RESUMO

As memórias, armazenadas em células do engrama, são essenciais para a evocação de experiências passadas, sendo sensíveis à modulação após a aquisição e passando por um processo de consolidação, que ocorre tanto em nível celular/sináptico quanto sistêmico/encefálico. Através da manipulação de engramas específicos, temos a possibilidade de compreender melhor a função das diversas estruturas envolvidas na formação e manutenção de memórias aversivas. Além disso, a evocação de uma memória pode desencadear processos como a reconsolidação ou extinção. Sugere-se que o engrama original de uma memória seja reativado durante a reconsolidação para que essas informações possam ser atualizadas, no entanto, ainda existem debates em relação à natureza de memórias de extinção: um novo engrama é criado ou ocorrem modificações no engrama original de medo? Neste estudo, utilizamos o método Daun02, em ratos Wistar c-Fos-lacZ para induzir a apoptose de neurônios fortemente ativos, a fim de examinar se um novo engrama emerge como resultado de uma reativação curta ou longa, ou se esses processos dependem de modificações no engrama original localizado na amígdala basolateral (BLA) e córtex infralímbico (IL). Também avaliamos o papel de neurônios do córtex pré-límbico (PL) recrutados durante a consolidação para a evocação de memórias recentes e remotas. Ao eliminar neurônios ativos durante a consolidação e reativação, observamos impactos significativos na memória aversiva, destacando a importância do engrama da BLA nesses processos. Embora não tenhamos conseguido observar qualquer impacto após a remoção de neurônios ativos durante o teste de uma memória previamente extinta na BLA, a remoção do engrama de extinção do IL reativou a memória aversiva que havia sido suprimida pela memória de extinção. Assim, demonstramos que o córtex IL desempenha um papel crucial na rede envolvida na extinção de memórias, e perturbar essa conexão específica é suficiente para prejudicar essa memória. Além disso, nosso estudo indica que as memórias de extinção dependem da formação de um novo engrama, apoiando a teoria de que as memórias de extinção dependem da formação de uma nova memória, enquanto que a reconsolidação reativa o mesmo traço da memória. Observamos também que após o condicionamento aversivo, o engrama do córtex PL é dispensável para a evocação de memórias recentes, mas crucial para a evocação de memórias contextuais remotas. Os neurônios que constituem esse engrama são alocados durante a aquisição, e sua eliminação prejudica a evocação após a consolidação sistêmica. Este estudo enriquece a compreensão da dinâmica do engrama de diversas estruturas em diferentes processos da memória.

ABSTRACT

Memories, stored in engram cells, are essential for recalling past experiences, being sensitive to modulation post-acquisition, and undergoing a consolidation process, which occurs at both cellular/synaptic and systemic/brain levels. Through the manipulation of specific engrams, we can better understand the function of various structures involved in the formation and maintenance of aversive memories. Additionally, memory recall can trigger processes such as reconsolidation or extinction. It is suggested that the original engram of memory is reactivated during reconsolidation so that information can be updated; however, there are still debates regarding the nature of extinction memories: is a new engram created, or are modifications made to the original fear engram? In this study, we used the Daun02 method, which employs c-Fos-lacZ Wistar rats to induce apoptosis of strongly active neurons, to examine whether a new engram emerges as a result of short or long reactivation, or if these processes depend on modifications to the original engram located in the basolateral amygdala (BLA) and infralimbic cortex (IL). We also evaluated the role of pre-limbic cortex (PL) neurons recruited during consolidation for the recall of recent and remote memories. By eliminating active neurons during consolidation and reactivation, we observed significant impacts on aversive memory, highlighting the importance of the BLA engram in these processes. Although we did not observe any impact after removing active neurons during the test of a previously extinct memory in the BLA, removal of the extinction engram from the IL reactivated the aversive memory that had been suppressed. Thus, we demonstrate that the IL cortex plays a crucial role in the network involved in memory extinction, and disrupting this specific connection is sufficient to impair this memory. Furthermore, our study indicates that extinction memories depend on the formation of a new engram, supporting the theory that extinction memories rely on the formation of a new memory, while reconsolidation reactivates the same memory trace. We also observed that after aversive conditioning, the PL cortex engram is dispensable for recalling recent memories but crucial for recalling remote contextual memories. The neurons comprising this engram are allocated during memory acquisition, and their elimination impairs recall after systemic consolidation. This study enriches the understanding of engram dynamics in various structures involved in different memory processes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática do modelo <i>Standard</i> da Consolidação Sistêmica..... | 16 |
| Figura 2: Representação esquemática da Teoria dos Múltiplos Traços | 17 |
| Figura 3: Principais regiões encefálicas implicadas na consolidação de memórias aversivas. | 25 |
| Figura 4: Representação do circuito gerado por uma memória aversiva..... | 26 |
| Figura 5: Representação do circuito gerado por uma memória de extinção..... | 29 |
| Figura 6: Representação esquemática da localização da formação hipocampal em humanos e roedores | 31 |
| Figura 7: Modelo animal utilizado neste estudo..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------|--|
| AMG | Amígdala |
| Arc | Gene de expressão imediata |
| BA | Núcleo basal da amígdala basolateral |
| BLA | Núcleo basolateral da amígdala |
| BM | Núcleo basomedial da amígdala |
| CA | Corno de Amon |
| CAC | Condicionamento aversivo ao contexto |
| CAT | Condicionamento aversivo ao tom |
| CB1 | Receptores canabinoídeos do tipo CB1 |
| CE | Córtex entorrinal |
| CeA | Núcleo central da amígdala |
| CeL | Núcleo lateral da amígdala central |
| CeM | Núcleo medial da amígdala central |
| c-Fos | Gene de expressão imediata |
| c-Fos-lacZ | Ratos geneticamente modificados que expressam o gene LacZ tendo como promotor a sequência codificante de c-Fos |
| CPF | Córtex pré-frontal |
| CPFm | Córtex pré-frontal medial |
| CR | Colaterais recorrentes |
| CREB | Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico |
| CS | Estímulo condicionado – do inglês <i>conditioned stimulus</i> |
| Daun02 | Pró-droga que é convertida em Daunorrubicina |
| E | Neurônios ativados durante a extinção localizados na amígdala |
| Egr1 | Gene de expressão imediata |
| ERK1/2 | Enzima quinase regulada por sinal extracelular 1/2 |
| FM | Fibras musgosas |
| GABAérgico | Neurônio que libera o neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) |
| GD | Giro denteado |
| HPC | Hipocampo |
| IEGs | Genes de expressão imediata - do inglês <i>immediate early genes</i> |

| | |
|--------------|--|
| IL | Córtex infra límbico |
| IP3R | Receptor de inositol trifosfato |
| ITC | Neurônios intercalares da amígdala |
| LA | Núcleo lateral da amígdala basolateral |
| LIMK | Proteína cinase LIM |
| LTD | Depressão de longa duração - do inglês <i>long-term depression</i> |
| LTP | Potenciação de longa duração - do inglês <i>long-term potentiation</i> |
| M | Neurônios ativados durante a situações de medo localizados na amígdala |
| NMDA | Receptor de glutamato do tipo N-metil D-Aspartato |
| Npas4 | Gene de expressão imediata |
| pCAG-LacZ | Linhagem de rato que expressa β -gal constitutivamente sob o promotor pCAG |
| PL | Córtex pré-límbico |
| SUB | Subículo |
| US | Estímulo incondicionado - do inglês <i>unconditioned stimulus</i> |
| VP | Via Perforante |
| Z-VAD-FMK | N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl cetona, droga inibidora de caspases |
| β -gal | β -galactosidase |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1. | MEMÓRIA..... | 12 |
| 1.1.1. | <i>Consolidação.....</i> | <i>14</i> |
| 1.1.2. | <i>Evocação</i> | <i>17</i> |
| 1.1.3. | <i>Reconsolidação</i> | <i>18</i> |
| 1.1.4. | <i>Extinção.....</i> | <i>19</i> |
| 1.1.5. | <i>Reconsolidação vs. extinção.....</i> | <i>20</i> |
| 1.2. | ENGRAMA..... | 22 |
| 1.3. | ESTRUTURAS ENVOLVIDAS..... | 24 |
| 1.3.1. | <i>Amígdala</i> | <i>25</i> |
| 1.3.2. | <i>Córtex pré-frontal medial.....</i> | <i>27</i> |
| 1.3.3. | <i>Hipocampo</i> | <i>30</i> |
| 1.4. | MODELO DE ESTUDO: MÉTODO DAUN02 EM RATOS C-FOS-LACZ | 32 |
| 2. | OBJETIVOS | 35 |
| | OBJETIVO GERAL | 35 |
| | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 35 |
| 3. | RESULTADOS | 37 |
| 3.1. | CAPÍTULO I..... | 38 |
| | DISTINCT ENGRAMS CONTROL FEAR AND EXTINCTION MEMORY..... | 39 |
| 3.2. | CAPÍTULO II..... | 58 |
| | ROLE OF PRELIMBIC NEURONAL ENGRAMS IN LONG-TERM FEAR MEMORY CONSOLIDATION..... | 59 |
| 4. | DISCUSSÃO GERAL..... | 71 |
| 5. | CONCLUSÕES | 79 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |
| | APÊNDICES | 95 |
| | ANEXO..... | 100 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEMÓRIA

A memória pode ser definida como uma alteração de comportamento baseada em uma experiência prévia que persiste além do estímulo ambiental que a produziu (Kukushkin; Carew, 2017). A busca pela compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de aprendizagem e memória está entre os principais objetivos da neurociência contemporânea. Estes fenômenos, embora frequentemente tratados como entidades observáveis, são, na verdade, conceitos teóricos que buscam explicar a influência da experiência no comportamento humano (Rudy, 2014). Em 1987 Larry Squire teve grande influência na definição destes conceitos, destacando que o aprendizado é o processo pelo qual novas informações são adquiridas, enquanto que a memória se refere à persistência desse aprendizado em um estado em que possa ser acessado posteriormente (Squire, 1987).

Através da memória conseguimos transmitir informações através do tempo. Portanto, recordar de algo, faz com que sejamos capazes de nos transportar através do tempo e reviver eventos e experiências passadas (Richards; Frankland, 2017). Acredita-se que as memórias sejam codificadas em nosso cérebro através de modificações físicas, pelo fortalecimento das conexões sinápticas entre os neurônios envolvidos na formação e manutenção dessa memória (Josselyn; Köhler; Frankland, 2015). Sendo assim, em um nível neuronal, sugere-se que ao recordarmos de algo o estado de nosso cérebro representa um estado correspondente ao do evento recordado, reativando os padrões de atividade neuronal ativos no momento da codificação dessa informação (Jung *et al.*, 2023).

Os primeiros estudos na área da memória foram conduzidos por psicólogos que examinaram a relação entre experiência e comportamento (Ebbinghaus, 1913). Ebbinghaus, por exemplo, investigou fatores como o número de repetições de uma lista de sílabas durante a fase de memorização e o intervalo entre a aprendizagem e a fase de teste, explorando os impactos desses elementos no aprendizado e na retenção da memória. Esses estudos foram fundamentais para identificar fenômenos e estabelecer conceitos que serviram de base para as pesquisas neurobiológicas atuais (Takehara-Nishiuchi, 2021). Contudo, as pesquisas modernas buscam compreender como as experiências influenciam o comportamento por meio de análises moleculares e celulares, que elucidam as alterações nos sistemas encefálicos e identificam as regiões envolvidas no processamento e manutenção de memórias (Josselyn; Köhler; Frankland, 2015; Kitamura *et al.*, 2017; Richards; Frankland, 2017).

Os estudos de Pavlov em 1927 foram fundamentais para o entendimento da memória, pois seus experimentos utilizando o aprendizado associativo possibilitaram estudar as diferentes fases da memória tanto em modelos animais quanto em seres humanos (Hawkins; Byrne, 2015; Pavlov, 1927; Pearce; Bouton, 2001). Sua metodologia era baseada na associação de um estímulo neutro, como o toque de um sino (chamado de estímulo condicionado – CS, do inglês *conditioned stimulus*), pareado com um evento de significado biológico, como a comida (chamado de estímulo incondicionado – US, do inglês *unconditioned stimulus*). Após várias apresentações do CS pareado com o US, os animais aprendem a associar e responder ao CS mesmo na ausência do US (Rudy, 2014). Atualmente, o condicionamento aversivo, ao tom ou ao contexto, é uma das tarefas comportamentais mais utilizadas para estudar os processos mnemônicos, no qual o comportamento de congelamento (*freezing*) do animal é mensurado e quantificado como resposta de medo, atuando como um indicador do aprendizado e da memória (Kandel *et al.*, 2021).

Os processos mnemônicos são sustentados por mudanças na força das sinapses, e, acredita-se, que as sinapses sejam o local central onde as informações são armazenadas no encéfalo (Richards; Frankland, 2017). O mecanismo pelo qual as mudanças na força sináptica podem ocorrer foi proposto pela primeira vez por Hebb, (1949) ficando conhecido como 'regra de Hebb'. Resumidamente, os neurônios que disparam juntos, se conectam juntos. Atualmente, sabe-se que sinapses podem alterar sua estrutura e função, fortalecendo ou enfraquecendo-se ao longo do tempo de maneira dependente da atividade. Essa capacidade é conhecida como plasticidade sináptica e é considerada a base dos processos de aprendizagem e memória (Bocchio; Nabavi; Capogna, 2017; Nabavi *et al.*, 2014).

Os modelos celulares clássicos da plasticidade sináptica envolvem dois fenômenos conhecidos como potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) e depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*). Enquanto os mecanismos de LTD correspondem a um enfraquecimento da força sináptica, a LTP é um aumento duradouro na força sináptica que ocorre em resposta a uma breve estimulação de alta frequência (Bocchio; Nabavi; Capogna, 2017). Tanto a LTP, quanto a LTD estão intrinsecamente ligadas à formação, persistência, manutenção e flexibilidade da memória (Izquierdo *et al.*, 2008; Monfils; Teskey, 2004; Nabavi *et al.*, 2014; Stacho; Manahan-Vaughan, 2022). A indução da LTP desencadeia cascatas celulares e moleculares que

podem resultar no aumento da densidade e volume dos espinhos dendríticos, bem como dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos. Em contrapartida, a LTD está associada à redução do número desses receptores e possivelmente uma diminuição dos espinhos dendríticos. Os espinhos dendríticos, considerados pontos-chave da plasticidade, sustentam a LTP e LTD no sistema nervoso de mamíferos (Frank *et al.*, 2018; Maiti; Manna; McDonald, 2015).

A formação de uma memória não é um processo instantâneo, pois requer inúmeras modificações celulares e moleculares, que resultam em alterações nas conexões sinápticas dos neurônios envolvidos e que se refletem no comportamento dos indivíduos. Logo, a memória pode ser dividida em diferentes fases ou processos, tais como consolidação, evocação, reconsolidação e extinção (De Oliveira Alvares; Do-Monte, 2021; Guskjolen; Cembrowski, 2023). Esses serão discutidos em mais detalhes a seguir.

1.1.1. Consolidação

A transformação de informações em memórias de longa duração não ocorre instantaneamente e seu mecanismo ainda não está bem elucidado. Sabe-se que logo após a aquisição as memórias encontram-se lábeis e sensíveis a modulação, portanto, podem ser fortalecidas, alteradas ou apagadas (Pedraza *et al.*, 2016). Gradualmente, as memórias adquirem uma forma mais estável e duradoura e esse processo é chamado de consolidação. O termo “consolidação” é comumente utilizado em referência a dois níveis desse processo, o nível celular/sináptico e o nível sistêmico/encefálico (Dudai, 2004).

A consolidação sináptica faz referência às transformações que ocorrem em nível sináptico para manter as informações no circuito neural, ou seja, no conjunto de neurônios que codifica a memória (engrama). O estímulo inicial da informação a ser consolidada inicia-se com uma série de eventos celulares e moleculares, que incluem a ativação de cascatas de segundos mensageiros, tráfego de receptores e a síntese de novas proteínas (Dudai, 2004; Dudai; Karni; Born, 2015). Essas etapas são necessárias para que haja a remodelação ou crescimento das conexões sinápticas e, portanto, o armazenamento da memória (Hernandez; Abel, 2008; Herry; Johansen, 2014). A consolidação sináptica geralmente é finalizada até poucas horas após o seu início e torna a memória resistente a modificações e perturbações (Dudai; Karni; Born, 2015). Conforme apontado por Casagrande *et al.*, (2018), o período necessário para a consolidação sináptica de uma memória aversiva pode depender tanto da intensidade do estímulo inicial, quanto da novidade da experiência aprendida. Portanto, eventos de fortes componentes emocionais, bem como a existência de memórias com informações correlacionadas favorecem e

aceleram a consolidação. Dessa maneira, a intensidade de um treino durante uma tarefa aversiva, especialmente treinos de intensidade mais forte, podem acelerar a consolidação da memória, tornando o traço menos sensível a interferências após apenas algumas horas do processo de aquisição (McGaugh, 2000; Pedraza *et al.*, 2016).

Após a consolidação sináptica, algumas memórias podem se tornar mais dependentes de áreas corticais, principalmente memórias oriundas do hipocampo (HPC), desta forma essas memórias poderão ser armazenadas por longos períodos, através de um processo denominado de consolidação sistêmica (Gilboa; Moscovitch, 2021; Moscovitch; Gilboa, 2022; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018). A consolidação sistêmica é descrita como um processo pelo qual memórias, inicialmente dependentes do HPC, são reorganizadas e gradualmente tornam-se mais dependentes do córtex pré-frontal (CPF) para o armazenamento das suas informações e conseqüentemente menos dependentes do HPC. Esta etapa pode durar dias, meses ou até mesmo anos, dependendo do tipo de informação que está sendo consolidada (Frankland; Bontempi, 2005; Squire *et al.*, 2015).

No momento em que vivenciamos uma experiência, várias estruturas encefálicas participam para processar as informações sobre "o que", "quando" e "onde" isso está ocorrendo. O HPC então atua como um centro integrador das informações para formar a memória do evento, mais especificamente contribuindo para as informações contextuais ricas em detalhes (Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018). Porém, com o passar do tempo essas informações serão reorganizadas em áreas corticais responsáveis por sua manutenção a longo prazo (Kitamura *et al.*, 2017). Esse processo de maturação inclui o aumento da densidade de espinhos dendríticos nas células do engrama presentes no CPF. Enquanto isso, o engrama hipocampal formado durante a aquisição torna-se silencioso com o tempo (Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018).

Atualmente, duas principais teorias buscam explicar a consolidação sistêmica, destacando-se o Modelo *Standard* e a Teoria dos Múltiplos Traços (Takehara-Nishiuchi, 2021). O Modelo *Standard* da Consolidação Sistêmica prediz que, ao longo do tempo, ocorre uma reorganização na conectividade entre o HPC e o córtex, com as conexões HPC-córtex sendo progressivamente enfraquecidas e as conexões córtex-córtex sendo fortalecidas (Figura 1). Logo, nessa perspectiva, o papel do HPC é transitório no armazenamento de informações, enquanto o córtex atua tanto como sendo o destino final, ou seja, o armazenando o traço mnemônico, quanto sendo responsável pela evocação da memória (Frankland; Bontempi, 2005).

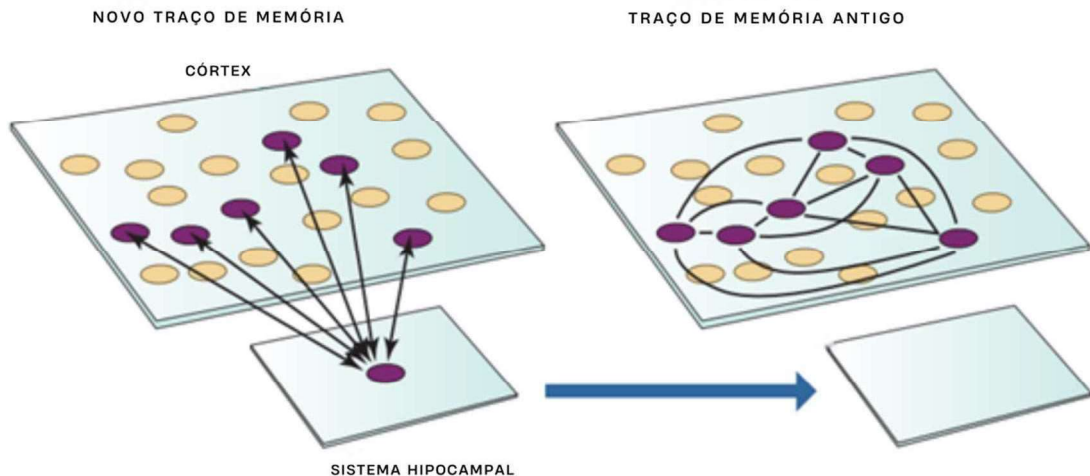


Figura 1: Representação esquemática do modelo *Standard* da consolidação sistêmica. Inicialmente a memória consiste em representações corticais fracamente conectadas (círculos roxos) da experiência, mantidas juntas por conexões temporárias do sistema hipocampal. Memórias recentes requerem a atividade do sistema hipocampal para a evocação. À medida que a memória envelhece, processos intrínsecos resultam no fortalecimento das conexões entre as representações corticais, portanto a memória agora pode ser evocada sem a necessidade do hipocampo. Adaptado de Rudy (2014).

Por outro lado, de acordo com a Teoria dos Múltiplos Traços, o circuito HPC-córtex interage continuamente desde a aquisição da memória até sua evocação (Figura 2). No entanto, o HPC seria responsável por sustentar informações precisas e ricas em detalhes, principalmente contextuais (Winocur; Moscovitch; Sekeres, 2007), enquanto o córtex sustentaria uma versão mais genérica da memória (Pedraza *et al.*, 2016). Estudos conduzidos por De Oliveira Alvares e colaboradores (2013) indicam que a dinâmica da consolidação sistêmica pode ser alterada por meio de sessões de reativações da memória, resultando em uma maior dependência do HPC e, conseqüentemente, em uma memória mais detalhada, impedindo a generalização da memória comumente presente na consolidação sistêmica (De Oliveira Alvares *et al.*, 2013). Em concordância com esses achados, Jasnów *et al.*, (2017) sugerem que o processo de consolidação sistêmica permite a generalização da memória, caracterizada pela perda da precisão e dos detalhes presentes na memória original.

Dependendo da circunstância, manter uma memória de forma mais generalizada pode permitir com que uma ameaça seja identificada de forma mais rápida. No entanto, estudos demonstram que memórias que possuem um forte componente emocional, formadas durante experiências muito estressantes ou traumáticas, podem acelerar o processo de consolidação sistêmica e levar a formação de memórias menos precisas que acabam se tornando patológicas, como observado no transtorno do estresse pós-traumático (Pedraza *et*

al., 2016, Kessler *et al.*, 2017).

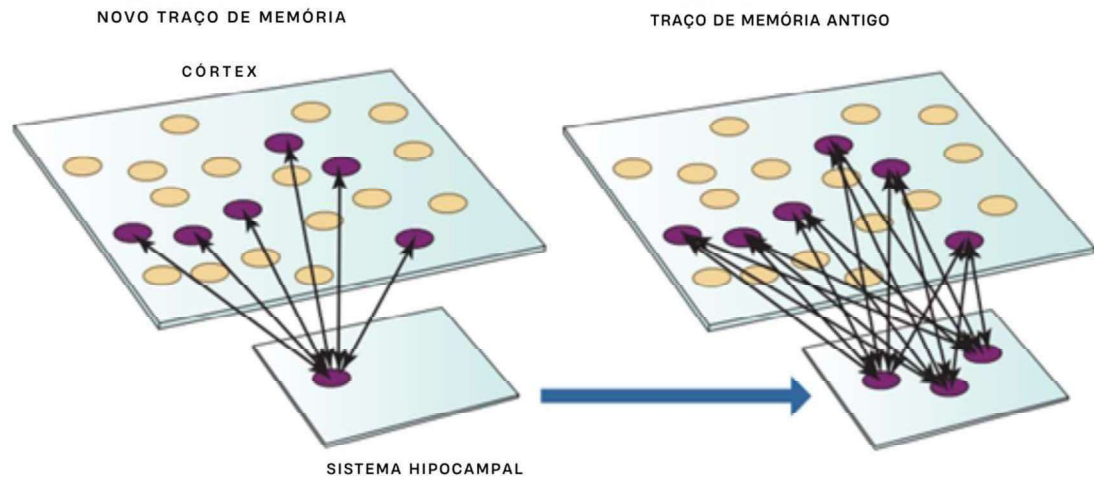


Figura 2: Representação esquemática da Teoria dos Múltiplos Traços. Memórias de longa duração ainda são dependentes da atividade do HPC, no entanto são mais resistentes a intervenções, pois essas foram reativadas mais vezes e, a cada reativação novos traços são criados no HPC. Adaptado de Rudy (2014).

No processo de consolidação sistêmica, não ocorre uma transferência direta da memória do HPC para as estruturas corticais. Na verdade, durante o processo de aprendizagem, as informações já são codificadas tanto em estruturas corticais, quanto no HPC (Kitamura *et al.*, 2017). Sendo assim, mudanças corticais graduais se iniciam durante a aquisição da informação e vão maturando o engrama cortical com o passar do tempo, formando uma memória de longo prazo estável que pode ser independente da atividade hipocampal para a sua evocação, porém mais generalizada, perdendo a precisão de suas informações (De Oliveira Alvares *et al.*, 2011; Squire *et al.*, 2015; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018).

1.1.2. Evocação

Memórias são evocadas quando informações sobre o tempo, lugar ou contexto da experiência em que foram formadas são apresentados (Kandel *et al.*, 2021; Squire, 2004). A evocação de memórias também é um processo ativo e dinâmico, que requer tanto a síntese, quanto a degradação de proteínas, tráfego de receptores glutamatérgicos (Hong *et al.*, 2013; Lopez *et al.*, 2015; Torquatto *et al.*, 2019; Redondo *et al.*, 2020), além da reestruturação do citoesqueleto e dos espinhos dendríticos (Lunardi *et al.*, 2018; Popik *et al.*, 2018).

Para que uma memória seja evocada, inicialmente os neurônios precisam passar por um processo de *tagging*, uma forma de marcação molecular que permite que estes passem pelas alterações de plasticidade necessárias, aumentando assim a sua excitabilidade basal

(Yiu *et al.*, 2014). Esse processo de *tagging* ocorre em neurônios que farão parte do engrama de uma memória e permite que essas informações sejam consolidadas e evocadas futuramente (Fan *et al.*, 2022; Lesburguères *et al.*, 2011).

A reativação de neurônios alocados durante a aquisição da memória é crucial para a persistência dessas informações. Para que essas memórias sejam consolidadas sistemicamente, é necessário que os neurônios específicos ativados durante a codificação sejam ativados (Tanaka *et al.*, 2014). Caso essa reativação seja impedida durante a evocação da memória, a recuperação dessas informações é comprometida (Denny *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2014). A ativação desses neurônios, mesmo que de forma artificial, é suficiente para induzir a evocação das informações (Liu *et al.*, 2012; Ramirez *et al.*, 2013, 2015; Trouche *et al.*, 2016; Yiu *et al.*, 2014). Além disso, a evocação de uma memória pode resultar em alguns processos clássicos, denominados reconsolidação e extinção (De Oliveira Alvares; Do-Monte, 2021; Guskjolen; Cembrowski, 2023; Suzuki *et al.*, 2004).

1.1.3. Reconsolidação

É dito que, após o período de consolidação, a memória se torna estável e resistente a modulações. No entanto, acreditar que essas memórias são permanentemente inflexíveis implicaria na ausência de alterações ou atualizações. Portanto, para que possamos nos adaptar ao ambiente em constante mudança em que vivemos, é necessário que as nossas memórias também sejam capazes de se flexibilizar (Lee; Nader; Schiller, 2017). Nos anos 2000 o trabalho publicado por Nader e colegas demonstrou que a reativação da memória pode desencadear um período lábil e suscetível a intervenções, indicando que as memórias consolidadas não são armazenadas de forma fixa e permanente, mas podem retornar a um estado passível de atualizações (Nader; Schafe; Ledoux, 2000).

Sendo assim, a evocação de uma memória pode torná-la novamente instável, processo denominado de desestabilização, permitindo que o traço original seja reescrito tanto em termos de intensidade quanto de conteúdo (De Oliveira Alvares *et al.*, 2013; Popik *et al.*, 2020). É sabido que um elemento crucial para desencadear a reconsolidação é a introdução de novas informações durante a reativação (Morris *et al.*, 2006; Sinclair; Barense, 2018), ou seja, o princípio do erro de predição. Este princípio refere-se à discrepância entre o que é antecipado com base em experiências prévias e os eventos reais. Uma relação entre expectativa e realidade (Popik *et al.*, 2020; Sevenster; Beckers; Kindt, 2013).

Podemos também observar que a reconsolidação apresenta características específicas conhecidas como condições limitantes (*boundary conditions*), sendo dois fatores principais que limitam esse processo: a idade da memória aversiva e a intensidade do treino (Lee; Nader; Schiller, 2017). Assim, memórias de forte componente emocional, são menos suscetíveis, ou até mesmo imunes, aos mecanismos da reconsolidação. Em modelos animais as *boundary conditions* podem ser observadas durante a aplicação de protocolos mais intensos de condicionamento aversivo, ou seja, utilizando treinos mais fortes (Wang; De Oliveira Alvares; Nader, 2009). Da mesma forma, a idade das memórias também dificulta a desestabilização do traço mnemônico, sendo que memórias mais antigas são menos suscetíveis à interferências durante a reconsolidação (Frankland *et al.*, 2006; Milekic; Alberini, 2002).

1.1.4. Extinção

A formação de uma memória de extinção também pode ser desencadeada após a evocação da memória. Esse processo mnemônico é caracterizado pela formação de uma nova memória neutra que inibe o traço original de medo sem apagá-lo (Furini; Myskiw; Izquierdo, 2014). Entretanto, a inibição da memória original é transitória, assim a expressão do medo eventualmente retorna. Experimentalmente, a exposição prolongada ou repetida do CS sem a apresentação do US pode levar a uma diminuição gradual da resposta condicionada, acarretando no processo de extinção. Curiosamente, embora a reconsolidação e a extinção sejam mecanismos bem diferentes, ambos podem ser desencadeados por um evento semelhante, a apresentação do CS sem o US. Em diferentes condições de exposição ao CS (exposição breve ou prolongada), observa-se a dominância de um ou outro processo, pois tanto a reconsolidação quanto a extinção poderão ser iniciadas (Merlo *et al.*, 2014; Pedreira; Maldonado, 2003). O aumento gradual no tempo ou número de apresentações do CS sem o US resulta em um decréscimo progressivo na resposta de medo dos animais, com os receptores do tipo NMDA demonstrando um importante papel na transição entre o processo de reconsolidação e extinção (Merlo *et al.*, 2014).

Além disso, ao contrário da reconsolidação, pesquisas sugerem que as memórias de extinção envolvam a formação de um novo conjunto de neurônios responsáveis por suprimir a memória original (Khalaf; Gräff, 2019; Lacagnina *et al.*, 2019; Zhang; Kim; Tonegawa, 2020). Essa noção é respaldada pela evidência da recorrência do medo, induzida por renovação (*renewal*), reinstalação (*reinstatement*) ou recuperação espontânea (*spontaneous recovery*) (Lee; Kaang, 2023). Acredita-se que a redução na resposta de medo

durante a extinção seja regulada pela atividade do núcleo central da amígdala (CeA) e sua conectividade bidirecional com o córtex pré-frontal medial (CPFm) e o núcleo basolateral da amígdala (BLA) (Bocchio; Nabavi; Capogna, 2017; Lee; Kaang, 2023). De fato, diversos estudos demonstram a participação de engramas específicos da amígdala (AMG) para a formação, manutenção e expressão de memórias de extinção (Herry *et al.*, 2008; Lay *et al.*, 2022; Zhang; Kim; Tonegawa, 2020).

Outra teoria que poderia explicar a formação de memórias de extinção é o princípio de *unlearning* ou desaprendizagem, que prediz que a extinção ocorre através do enfraquecimento das conexões previamente estabelecidas entre o CS e o US (Choi *et al.*, 2021; Hong *et al.*, 2009; Lai; Adler; Gan, 2018). Portanto, durante a formação de uma memória sinapses pertencentes a esse circuito estariam sendo potenciadas, enquanto que a extinção dessa memória levaria a depotenciação desses neurônios (Kim *et al.*, 2007). Entretanto, alguns estudos apresentaram evidências conflitantes sobre os mecanismos de *unlearning* a nível sináptico (Herry; Johansen, 2014; Lacagnina *et al.*, 2019; Zhang; Kim; Tonegawa, 2020).

A natureza do engrama de memória de extinção, seja envolvendo uma nova aprendizagem ou um *unlearning*, continua sendo um tópico complexo e altamente debatido na área da memória (De Oliveira Alvares; Do-Monte, 2021; Lee; Kaang, 2023). Diferentes estudos têm apresentado perspectivas contrastantes, sendo que alguns defendem a ideia de que a extinção representa um processo de nova aprendizagem, outros propõem que a extinção pode envolver um *unlearning* ou a reorganização de circuitos neurais existentes associados à memória de medo (Clem; Schiller, 2016). É possível que o real mecanismo por trás da formação de memória de extinção seja influenciado por diversos fatores, como a intensidade da memória de medo e o protocolo utilizado durante a extinção (por exemplo, duração da sessão ou exposição espaçada versus concentrada). Dependendo desses fatores, cada mecanismo pode operar simultaneamente ou sequencialmente para alcançar uma extinção bem-sucedida (An *et al.*, 2017).

1.1.5. Reconsolidação vs. extinção

A evocação de uma memória associativa por meio da exposição ao CS pode desencadear tanto a manutenção, a inibição quanto o reforço das memórias armazenadas, dependendo do número ou extensão das apresentações do estímulo. Sendo que, uma breve apresentação do CS leva à reconsolidação da memória e à manutenção da resposta condicionada (Pedreira; Pérez-Cuesta; Maldonado, 2004; Sevenster; Beckers; Kindt, 2013).

Por outro lado, longas ou repetidas apresentações do CS durante a reexposição leva a uma extinção e a inibição da resposta condicionada (Merlo *et al.*, 2014).

Os testes comportamentais também são capazes de caracterizar a extinção e distingui-la da reconsolidação. Durante um teste de *renewal*, quando o CS é apresentado fora do contexto de extinção, ou seja, no mesmo contexto em que ocorreu o treino aversivo, é evidenciado comportamentalmente que a memória de extinção é dependente do contexto e resulta no retorno da memória original (Effting & Kindt, 2007). O teste de *reinstatement*, em que o US é apresentado inesperadamente, sem associação com o CS, serve como gatilho para o retorno da memória de medo (Gogolla et al., 2009). Durante o teste de recuperação espontânea observamos que com o passar do tempo a memória original acaba ressurgindo (Schiller et al., 2010). No caso da reconsolidação, a memória original é reescrita, portanto não retornaria aos mesmos níveis de comportamento de medo em nenhum dos testes mencionados, permitindo distinguir ambos os processos mnemônicos (Popik et al., 2020).

Ambos os processos parecem necessitar a ativação prévia dos receptores de glutamato do tipo n-metil-D-aspartato (NMDA) e da ativação da enzima cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) (Merlo *et al.*, 2014; Merlo; Milton; Everitt, 2018). Porém, estes processos podem ser distinguidos por características regionais e moleculares, visto que os receptores canabinóides do tipo CB1 e a proteína cinase LIM (LIMK) parecem ter ações distintas no HPC durante ambos os processos. Enquanto o sistema endocanabinóide parece determinar o equilíbrio entre os processos de manutenção ou fortalecimento da memória original (reconsolidação) e o estabelecimento de uma nova memória (extinção), a atividade da LIMK parece ser crucial apenas durante a reconsolidação da memória (De Oliveira Alvares *et al.*, 2008; Lunardi *et al.*, 2018). Além disso, durante a reconsolidação e extinção, as memórias são dependentes da atividade da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) em regiões distintas do encéfalo, visto que durante a reconsolidação observa-se uma ativação significativa na expressão gênica mediada por CREB no HPC e AMG, enquanto que durante a extinção essa expressão de CREB é observada na AMG e no CPF (Mamiya *et al.*, 2009).

A reconsolidação e a extinção diferem não só em suas características comportamentais, bioquímicas e anatômicas. Enquanto o HPC e a AMG demonstram ser importantes para ambas as fases, podemos observar que conexões diferenciadas entre a BLA e o CPFm podem contribuir de formas diferentes durante ambos os processos (Baldi; Bucherelli, 2015). Ao identificar grupos neuronais distintos, segregados espacialmente, que reagem de maneira diferente a informações com valências positivas e negativas, observou-

se também que esses grupos neuronais, denominados neurônios de medo e de extinção, estabelecem conexões com regiões específicas do CPFm (Herry *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2016; Namburi *et al.*, 2015). Enquanto a região rostral da BLA se conecta preferencialmente com neurônios do córtex pré-límbico (PL), a região caudal da BLA estabelece conexões com neurônios piramidais do córtex infra límbico (IL) (Manoocheri; Carter, 2022), demonstrando, assim, um papel diferenciado das estruturas do CPFm durante cada um dos processos mnemônicos. Entraremos em mais detalhes sobre as principais estruturas encefálicas e seu papel nos processos mnemônico na seção 1.3.

1.2. ENGRAMA

Todos os processos mnemônicos requerem a atividade de diversas estruturas neuronais, logo a memória reside em engramas distribuídos por todo o encéfalo (Ganella *et al.*, 2018; Kitamura *et al.*, 2017). Portanto, o engrama pode ser visto como a mudança física ocorrida nos neurônios em resposta a uma experiência e que permite que as informações possam ser evocadas posteriormente (Josselyn; Tonegawa, 2020; Semon, 1921).

Podemos caracterizar o engrama como um conjunto de neurônios envolvidos no processo de codificação, manutenção, flexibilização e evocação de uma memória. Sendo assim, o engrama não é exatamente a memória, mas fornece o substrato físico para a mesma (Josselyn; Köhler; Frankland, 2015). Para que componham um engrama, os neurônios devem apresentar algumas propriedades, como estarem ativos durante a codificação da memória, exibir alterações físicas ou químicas persistentes em resposta à aprendizagem, serem reativados durante a evocação da memória e serem necessários ou suficientes para a evocação da memória (Josselyn; Köhler; Frankland, 2015; Josselyn; Tonegawa, 2020).

O compartilhamento de neurônios dentro do engrama é a base da ligação entre as memórias e por mais que informações semelhantes possam ser codificadas em população neuronais sobrepostas, a plasticidade sináptica garante a diferenciação e o armazenamento das memórias de forma individualizada (Abdou *et al.*, 2018; Cassini *et al.*, 2013). Além disso, evidências indicam que a alocação de memórias em neurônios específicos (alocação neuronal) e sinapses (alocação sináptica) dentro de um engrama não ocorre de forma aleatória (Sajikumar; Morris; Korte, 2014; Yiu *et al.*, 2014). Mecanismos específicos, como aumentos na excitabilidade neuronal, *tagging* e captura sináptica, são responsáveis por determinar quais neurônios armazenarão uma memória (Gulmez Karaca; Kupke; Oliveira,

2021; Rashid *et al.*, 2016).

A excitabilidade neuronal desempenha um papel fundamental na determinação das sinapses que serão alocadas pela memória (Rogerson *et al.*, 2014). Em princípio, a preferência no recrutamento de neurônios durante a codificação da memória pode ocorrer devido a propriedades neuronais intrínsecas (Monfils; Teskey, 2004). Ou seja, a excitabilidade celular intrínseca prediz que alguns neurônios estarão mais excitáveis no momento do estímulo e, conseqüentemente, dispararão mais potenciais de ação, sendo um fator determinante para a participação dessas células na formação da memória (Guskjolen; Cembrowski, 2023).

Os mecanismos de alocação sináptica e neuronal trabalham em conjunto para a formação das redes neuronais envolvidas nos processos de memória. A reativação dos padrões de atividade neuronal presentes no momento da codificação de uma informação é tanto necessária quanto suficiente para a persistência da memória (Han *et al.*, 2009; Josselyn; Frankland, 2018). Confirmando a teoria proposta por Hebb, de que neurônios que disparam juntos, se conectam juntos e, portanto, fornecendo a base para a formação do conjunto de células que corresponde ao engrama (Hebb, 1949). Porém, ainda não está claro se a natureza do engrama é celular ou se poderia ser melhor descrita em termos de mudanças na força dos contatos sinápticos feitos pelos neurônios do engrama (Abdou *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2022).

Choi *et al.* (2018) observaram que, apesar de o número de neurônios do engrama permanecer constante em memórias de diferentes intensidades, a conectividade entre as células pré e pós-sinápticas pode ser responsável por codificar a força da memória, visto que memórias de maior componente emocional demonstraram apenas um aumento no volume e diâmetro dos espinhos dendríticos na região do HPC. Portanto, a relação entre a força da memória e a conectividade sináptica pode sugerir que seja a conexão entre as células do engramas a responsável por gerar o substrato sináptico da memória (Choi *et al.*, 2018).

Os espinhos dendríticos, pequenas protuberâncias que surgem do dendrito e recebem a maior parte das conexões sinápticas (Yuste, 2011), exibem várias morfologias de plasticidade estrutural e funcional. Em resposta à modulação específica da atividade neuronal, a LTP gera um *tagging* responsável por capturar as moléculas necessárias apenas nos espinhos selecionadas (Redondo; Morris, 2011). A fim de compreender esses mecanismos, Bosch e colaboradores abordaram a evolução da composição proteica pós-sináptica durante a potenciação de espinhos individuais (Bosch *et al.*, 2014). Os autores demonstraram que várias proteínas são levadas até as sinapses em três fases temporais.

Durante a fase I observamos uma reorganização do citoesqueleto de actina do espinho, enquanto que durante a fase II ocorre a estabilização do citoesqueleto recém-remodelado e a acumulação persistente de cofilina. Já na fase III, há um aumento do espinho dendrítico dependente de síntese proteica da densidade pós-sináptica, uma matriz densa de proteínas localizada abaixo da membrana sináptica (Sheng; Hoogenraad, 2007). Todavia, a identidade molecular dessa marcação e o processo de captura sináptica não estão completamente elucidados.

Apesar do debate em relação a natureza do engrama, celular ou sináptico (para uma revisão mais detalhada ver Han *et al.*, 2022), sabe-se que o engrama pode ser analisado em diferentes níveis, distribuindo-se amplamente por todo o encéfalo e permitindo investigações em diversas escalas de análise. No nível de rede encefálica, um conjunto de regiões pode estar conectado através desse engrama (Malvaez *et al.*, 2019). A nível da população neuronal, subconjuntos de neurônios dentro de uma região encefálica podem estar conectados (Kim *et al.*, 2016). Com a formação de cada engrama, ocorrem alterações em neurônios individuais, como mudanças nos padrões de conectividade (Morrison *et al.*, 2016). Alterações também podem ocorrer em subconjuntos de sinapses, como o fortalecimento sináptico (Abdou *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2018). Em nível nuclear, o engrama pode ser refletido em mudanças transcricionais e epigenéticas (Yiu *et al.*, 2014). Essa diversidade de escalas e níveis de análise oferece uma compreensão abrangente do engrama e seus fundamentos neurobiológicos (Josselyn; Köhler; Frankland, 2015).

O avanço das técnicas genéticas permitiu uma melhor compreensão da relação entre neurônios individuais ativos durante o aprendizado e a memória que eles suportam, pois essas técnicas tornaram possível a marcação e manipulação de conjuntos neuronais (Josselyn; Frankland, 2018). Essas ferramentas genéticas utilizam genes de expressão imediata (IEGs, do inglês *immediate early genes*) (Cruz *et al.*, 2013), que são ativados após a atividade neuronal. Essa atividade leva a expressão rápida de vários IEGs, incluindo c-Fos, Arc, Npas4 e Egr1 (Minatohara; Akiyoshi; Okuno, 2016). Um destes mecanismos é a técnica de inativação por Daun02, que utiliza ratos Wistar transgênicos c-Fos-LacZ para inativar neurônios específicos ativados durante um processo mnemônico (Koya; Margetts-Smith; Hope, 2016). Este modelo será discutido na seção 1.4.

1.3. ESTRUTURAS ENVOLVIDAS

A rede neural responsável por memórias aversivas abrange diversas estruturas encefálicas, com ênfase em três principais: a AMG, associada à valência emocional da

memória; o HPC, atuando como a "porta de entrada" das memórias, sendo relacionado principalmente ao contexto espacial; e o CPF, uma região moduladora da memória (Figura 3).

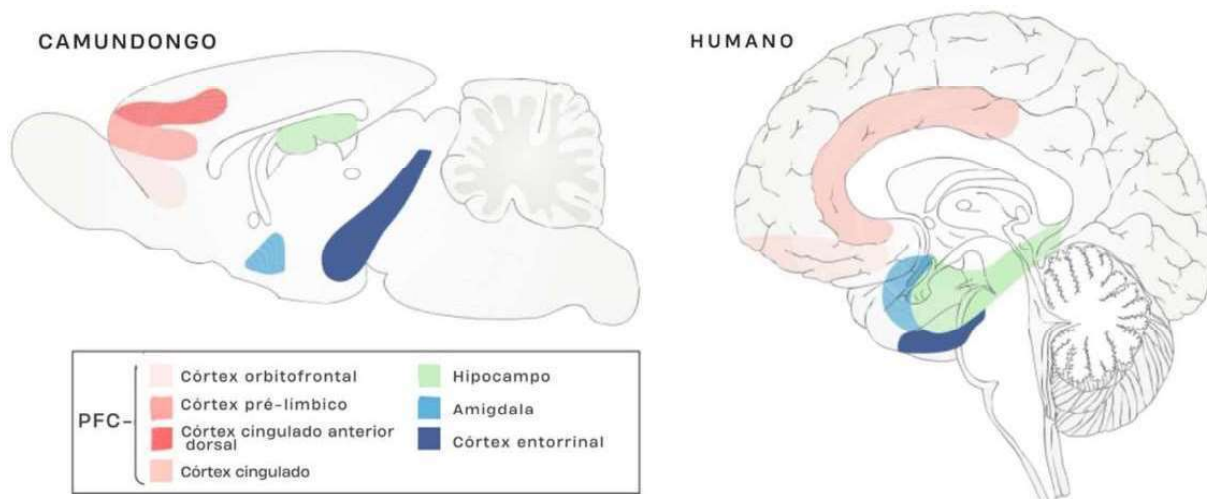


Figura 3: Principais regiões encefálicas implicadas na consolidação de memórias aversivas. Ilustração esquemática de encéfalo de camundongo, e seus equivalentes no encéfalo humano. Estas regiões incluem o CPF, HPC, AMG e córtex entorrinal. (Adaptado de Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018).

1.3.1. Amígdala

A AMG desempenha um papel central nos processos mnemônicos, pois é responsável pelo processamento da valência emocional de diferentes estímulos recebidos (Kim *et al.*, 2016). Estando localizada profundamente no lobo temporal, esta estrutura recebe informações ambientais do tálamo e dos córtices sensoriais, podendo então influenciar uma ampla variedade de processos, desde o controle autônomo e motor até a formação de memória e a neuromodulação (McDonald, 1998; Pape; Pare, 2010). Sabe-se que a AMG está intimamente associada ao comportamento de medo condicionado, pois diversos estudos avaliando lesões e inibições desta estrutura observaram prejuízos no reconhecimento de estímulos aversivos (Blanchard; Blanchard, 1972; Ledoux *et al.*, 1990; Shinohara; Yasoshima, 2019; Tripathi *et al.*, 2017). Dentre os múltiplos interconectados e complexos núcleos que formam esta estrutura podemos destacar a BLA, composta pelos grupos celulares lateral (LA), basal (BA) e basomedial (BM), além do núcleo central da amígdala (CeA), formado pelas subdivisões lateral (CeL) e medial (CeM). A região da BLA é composta principalmente por neurônios glutamatérgicos e interneurônios inibitórios, enquanto que os neurônios do núcleo CeA são predominantemente GABAérgicos (Janak; Tye, 2015).

O núcleo CeA pode ser considerado um centro de comando da expressão de

comportamentos defensivos adaptativos (Yu *et al.*, 2016). Os neurônios deste núcleo se projetam para as regiões do tronco encefálico responsáveis por gerar comportamentos de medo. Em condições normais e não ameaçadoras, as células intercalares da AMG inibem os neurônios de CeA (Amano; Unal; Paré, 2010). No entanto, quando esses neurônios são ativados (despolarizados), acabam ativando neurônios do hipotálamo lateral e da substância cinzenta periaquedutal, desencadeando comportamentos de medo (Cicchi *et al.*, 2010). Sendo assim, para que comportamentos de medo sejam iniciados, é preciso que os neurônios do CeA sejam despolarizados (Figura 4) (Rudy, 2014).

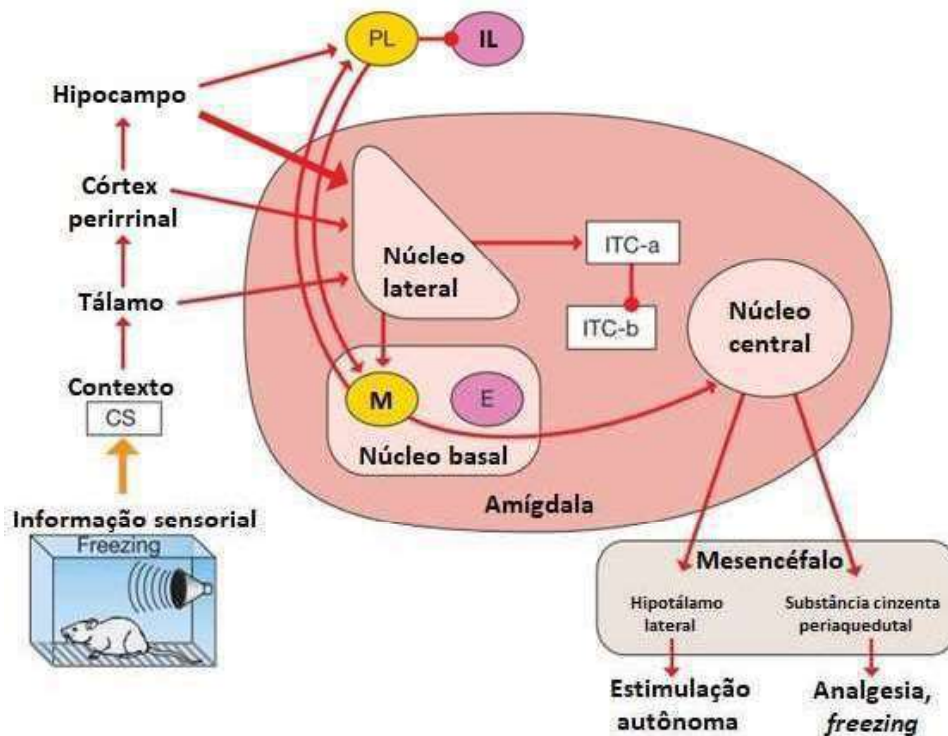


Figura 4: Representação do circuito gerado por uma memória aversiva. Quando ocorre um evento aversivo, as sinapses são fortalecidas, ligando a informação sensorial (contexto e CS) aos neurônios no núcleo lateral da amígdala e no córtex PL. Como consequência, a reativação dessa memória ativará o circuito do medo (em vermelho). A influência inibitória dos neurônios intercalares (ITC) sob os neurônios do núcleo central será removida, enquanto que a atividade excitatória fornecida pelos neurônios de medo e pelos neurônios do PL aumenta. PL = pré-límbico; IL = infra límbico; M = medo; E = extinção. Adaptado de Rudy (2014).

Diversos estudos demonstram que a BLA, mais especificamente a região do LA, é de extrema importância para comportamentos associados ao condicionamento aversivo ao tom (CAT), visto que o LA funciona como um centro de convergência das informações de tom e choque durante o condicionamento. Além disso, a grande maioria dos neurônios excitatórios do LA responde a ambos os estímulos de tom e choque (Goosens; Hobin;

Maren, 2003; Josselyn; Frankland, 2018; Pape; Pare, 2010; Quirk; Repa; Ledoux, 1995). Enquanto isso, no núcleo BA são encontrados grupos de neurônios distintos ativados durante a apresentação de informações aversiva ou durante situações de segurança, como ocorre durante um treino de extinção de medo condicionado (Herry *et al.*, 2008). Foram identificados na BLA grupos de neurônios excitatórios distintos, espacialmente segregados, responsáveis por processar informações de diferentes valências, positivas e negativas. Estes grupos de neurônios também podem ser denominados de neurônios de medo e de extinção, visto que são ativados durante experiências aversivas e não versivas, como no caso de memórias de medo e de extinção, respectivamente (Gore *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Namburi *et al.*, 2015).

Embora grande parte dos neurônios presentes no LA responda aos estímulos do condicionamento aversivo, somente uma pequena parte desses neurônios é alocada para compor o engrama de determinada memória (Josselyn; Frankland, 2018). Este fato se deve ao importante papel que os neurônios inibitórios desempenham na modulação do tamanho dos engramas, distribuindo os neurônios de forma dispersa no engrama com base na excitabilidade neuronal relativa (Kasugai *et al.*, 2019; Morrison *et al.*, 2016).

Neurônios da BLA são recrutados para compor engramas de memórias que possuem componentes emocionais envolvidos (Hammack *et al.*, 2023; Kitamura *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2022). A atividade desta estrutura já foi demonstrada como sendo essencial tanto para os processos de aprendizado de condicionamento aversivo (Roesler *et al.*, 2021) e sua reconsolidação, quanto na formação de memórias de extinção (Björkstrand *et al.*, 2016; Cho; Deisseroth; Bolshakov, 2013; Higginbotham *et al.*, 2021; Laurent; Marchand; Westbrook, 2008; Zubedat; Akirav, 2017). Durante paradigmas como o condicionamento aversivo, a AMG é responsável por enviar as informações do evento aversivo para o CPFm. A região da BLA envia projeções bidirecionais para o CPFm (Senn *et al.*, 2014) e evidências sugerem a existência de uma segregação topográfica nas projeções da BLA para o CPFm, sendo que as projeções mais dorsais que se conectam ao PL codificam as informações aversivas, enquanto que as projeções mais ventrais conectadas ao IL codificam informações relacionadas à memória de extinção (Manoocheri; Carter, 2022).

1.3.2. *Córtex pré-frontal medial*

O CPF desempenha um papel crucial na expressão do medo, atuando como um modulador das memórias aversivas (Giustino; Maren, 2015). Podemos dividir o CPF nas porções dorsal e ventral. Na região dorsal, destacam-se o PL, responsável por promover a

expressão do medo condicionado e o córtex cingulado anterior, que também pode contribuir para a promoção do medo; enquanto que na região ventral o IL, está envolvido no processamento de memórias de extinção e o córtex dorso-peduncular, localizado mais ventralmente ao IL, também está associado à inibição do medo. Dessa forma, as regiões dorsais do CPFm tendem a intensificar a expressão do medo, enquanto que as regiões ventrais exercem um efeito oposto sobre este comportamento, reduzindo a expressão do medo (Le Merre; Ährlund-Richter; Carlén, 2021; Quirk; Mueller, 2008).

Estudos demonstram que a atividade do PL durante a aquisição é necessária para a formação de memórias condicionadas (Di Ciano *et al.*, 2007; Tse *et al.*, 2011). Apesar de algumas evidências demonstrarem que a atividade do PL parece indispensável para a expressão, mas não para a aquisição de memórias aversivas (Corcoran; Quirk, 2007), tem sido observado que durante o processo de aquisição, neurônios são ativados no PL, permanecendo silenciosos até o fim da consolidação sistêmica, momento em que passam a ser responsáveis pela manutenção dessa memória (Denardo *et al.*, 2019; Kitamura *et al.*, 2017).

Os córtices IL e PL exercem um controle bidirecional sobre a expressão do medo. Muitos estudos apontam para uma divergência funcional onde o PL seria responsável por guiar a expressão de respostas defensivas condicionadas enquanto o IL atuaria como um atenuador destas durante a extinção de memórias aversivas (Figura 4) (Le Merre; Ährlund-Richter; Carlén, 2021; Manoocheri; Carter, 2022; Vargas; Lima; Mello-Carpes, 2021). O IL envia projeções para as células intercalares da AMG, que são interneurônios GABAérgicos, que quando ativados diminuem a atividade do núcleo CeA, responsável por evocar respostas defensivas (Figura 5). Portanto, durante a formação de memórias de extinção essas conexões do IL com a AMG auxiliam na supressão de respostas de medo (Quirk; Mueller, 2008; Sierra-Mercado; Padilla-Coreano; Quirk, 2011). Esse mecanismo foi observado não apenas em memórias aversivas recentes, mas também durante à atenuação de memórias remotas (Khalaf; Gräff, 2019; Silva; Burns; Gräff, 2019).

As estruturas como o CPFm, o HPC, a AMG e o núcleo reuniens do tálamo formam um circuito crucial para a regulação de memórias aversivas, incluindo processos como reconsolidação e extinção. Nesse circuito, é sugerido que o CPFm exerça controle sobre as estruturas subcorticais para regular as respostas comportamentais apropriadas (Giustino; Maren, 2015). A importância central do PL na modulação das respostas de medo pode ser observada pelo fato de que os neurônios do PL apresentam uma atividade sustentada, medida ao longo do período de *freezing* em resposta a um estímulo condicionado (Burgos-

Robles; Vidal-Gonzalez; Quirk, 2009), enquanto a atividade dos neurônios da BLA, que envia informações sobre o evento aversivo para o PL, dura apenas poucos milissegundos (Quirk; Repa; Ledoux, 1995). Essas evidências sugerem que as respostas aversivas são iniciadas pela BLA, mas sustentadas pela atividade do PL, que desempenha um papel tanto na codificação quanto na evocação de memórias remotas (Denardo *et al.*, 2019; Dixsaut; Gräff, 2022). Além disso, foi observado que a população neuronal do PL ativada após uma tarefa de condicionamento aversivo foi seletivamente ativada para a evocação da memória deste evento (Cummings *et al.*, 2022; Giannotti *et al.*, 2019).

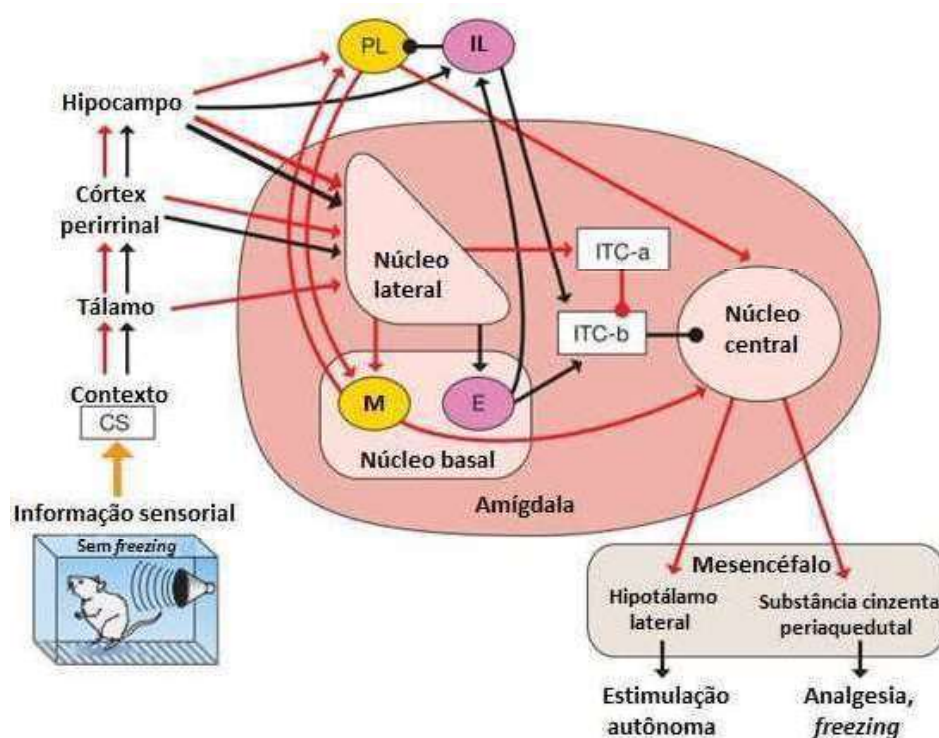


Figura 5: Representação do circuito ativado durante a formação de uma memória de extinção. As setas vermelhas indicam como o condicionamento aversivo organiza o sistema para expressar o medo. As setas pretas indicam como uma memória de extinção modifica o sistema para não expressar medo. O resultado fundamental produzido pelo treino de extinção é alterar as conexões sinápticas que aumentarão o controle inibitório sobre os neurônios no núcleo central da amígdala. Isso é alcançado pelo fortalecimento das sinapses que ligam o estímulo condicionado (CS) aos neurônios de extinção no núcleo basal aos neurônios no IL. Tanto os neurônios de extinção quanto os neurônios do IL projetam-se aos neurônios intercalares (ITC) que inibem os neurônios na amígdala central. O resultado é que o CS agora pode ativar o novo circuito de extinção ou o circuito de medo e impedir que os neurônios na amígdala central se despolarizem e gerem comportamentos de medo. As setas indicam conexões excitatórias; extremidades arredondadas indicam conexões inibitórias. PL = pré-límbico; IL = infra límbico; M = medo; E = extinção. Adaptado de Rudy (2014).

Além de suas conexões diretas com a BLA, o PL também recebe conexões do HPC. A inibição do HPC resulta na redução da atividade de interneurônios inibitórios no PL, promovendo, assim, o aumento da atividade de neurônios piramidais e intensificando a resposta de medo condicionado que já haviam sido extintos (Sotres-Bayon *et al.*, 2012). A relevância das conexões entre o HPC e o CPFm também é evidente durante o processo de

extinção de memórias, onde a inativação do HPC demonstra impacto prejudicial na formação de memórias de extinção (Sierra-Mercado; Padilla-Coreano; Quirk, 2011).

1.3.3. Hipocampo

O HPC destaca-se por ser uma das principais estruturas encefálicas associadas à memória, desempenhando um papel crucial na aquisição, consolidação e nas fases posteriores à evocação do traço mnemônico (Eichenbaum, 2004). Localizado na porção medial do lobo temporal, o hipocampo faz parte do sistema límbico e é composto por duas regiões interconectadas conhecidas como giro denteado (GD) e Corno de Amon (CA), sendo este último subdividido em três partes: CA1, CA2 e CA3 (Figura 6) (Knierim, 2015).

A principal entrada de informações no hipocampo ocorre por meio do córtex entorrinal (CE), direcionando-se aos neurônios granulares na camada molecular do GD, conhecida como via perforante (Jones, 1994). Os axônios desses neurônios granulares formam as fibras musgosas, que se projetam em direção aos neurônios piramidais na região de CA3. Por sua vez, os axônios de CA3 também se conectam aos neurônios piramidais de CA1 e CA2, formando a chamada via colateral de Schaffer. Os axônios de CA1 estendem-se em direção ao complexo subicular e, posteriormente, para as camadas profundas do CE. O circuito compreendendo CE, GD, CA3 e CA1 é tradicionalmente conhecido como via trisináptica (Witter *et al.*, 2000, 2014).

Diversos estudos destacam a significativa contribuição do HPC em tarefas relacionadas a informações contextuais (Berlau; Mcgaugh, 2006; Holland; Bouton, 1999; Lee, 2010). Esse fenômeno é particularmente evidente em modelos animais com lesões hipocámpais, os quais demonstram uma redução significativa no comportamento de congelamento após um treino de condicionamento aversivo ao contexto (CAC). É importante ressaltar que tais prejuízos na memória são notados principalmente quando as lesões são realizadas poucos dias após o treino de CAC. No entanto, após algumas semanas, as lesões deixam de induzir déficits na memória (Anagnostaras; Maren; Fanselow, 1999; Mcgaugh, 1966). Esse fenômeno sugere um papel mais pronunciado do HPC em memórias recentes, enquanto as memórias sistemicamente consolidadas tendem a depender mais das estruturas corticais, embora ainda possam requerer a participação do HPC em fases específicas (De Oliveira Alvares *et al.*, 2011; Squire *et al.*, 2015; Tomaiuolo *et al.*, 2015).

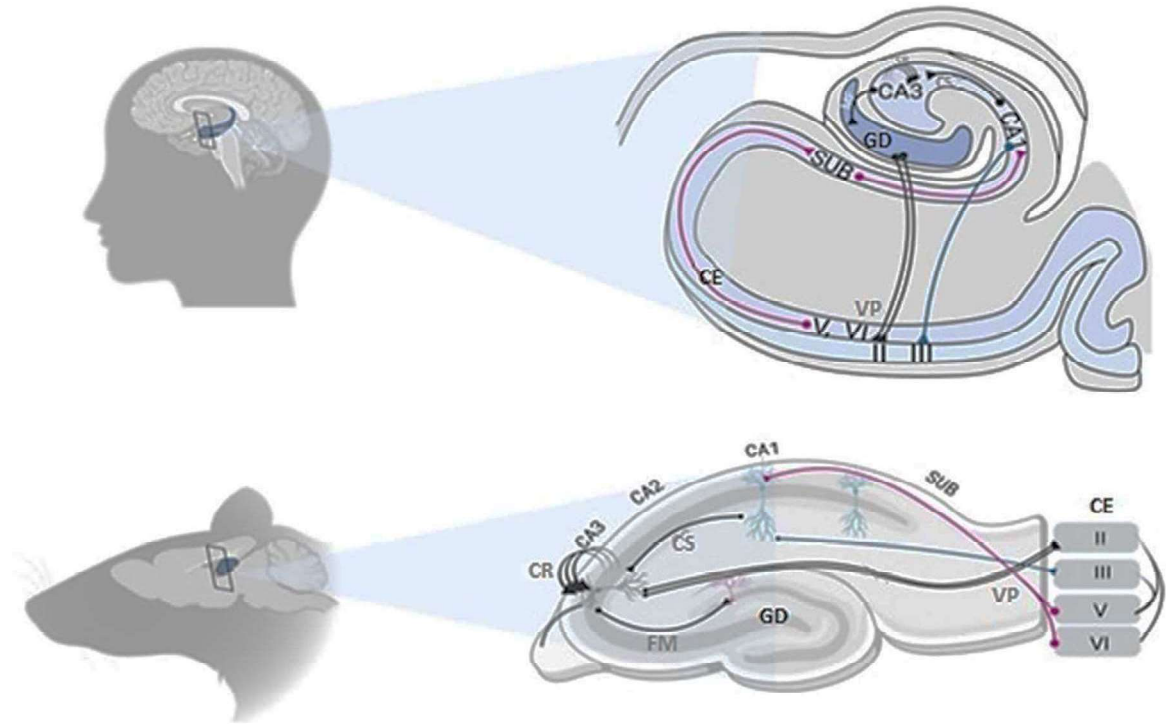


Figura 6: Representação esquemática da localização da formação hipocampal em humanos e roedores. As principais entradas de informações para o hipocampo são provenientes das camadas superficiais do CE. Essas entradas convergem para o CA1 por meio da via trissináptica (GD, CA3 e CA1) e também por meio da via monossináptica, que se conecta diretamente ao CA1 através da camada II do CE. As colaterais recorrentes (CR) do CA3 estabelecem contato com outros neurônios do CA3, formando assim uma rede autoassociativa. A conexão do CA1 com o subículo constitui a principal saída hipocampal, dirigindo-se de volta para as camadas profundas do CE. Abreviações: CA1, CA3: Corno de Amon 1,3; GD: giro denteado; CE: córtex entorrinal; FM: fibras musgosas; VP, via perforante; CS, colateral de Schaffer; CR: colaterais recorrentes; SUB: subículo. Adaptado de Roux; Leger; Freret (2021).

Ao longo de seu eixo longitudinal, o HPC pode ser funcionalmente dividido em partes dorsal, intermediária e ventral (Bannerman *et al.*, 2004). Enquanto a região dorsal de CA1 projeta-se para o subículo e o CE, a região ventral de CA1 tem como alvos o CPFm, o núcleo accumbens e a AMG (Yang; Wang, 2017). Por meio dessas diversas projeções, o HPC é capaz de direcionar seletivamente informações comportamentais para diferentes destinos. Enquanto o HPC ventral está principalmente envolvido em comportamentos afetivos e motivados, a região dorsal do HPC está principalmente associada à navegação espacial e à memória episódica (Ciocchi *et al.*, 2015; O’Keefe; Dostrovsky, 1971).

Tanto em regiões corticais, quanto na AMG e no HPC, foram identificados mecanismos de alocação de memória nos quais os neurônios mais ativos no momento da codificação da experiência desempenham um papel crucial em sua manutenção (Josselyn; Frankland, 2018). Um estudo conduzido por Zaki *et al.* (2022) evidenciou que os neurônios ativos no HPC durante uma sessão de condicionamento aversivo apresentam uma redução na atividade durante a sessão de extinção, sendo reativados após o retorno do medo ao

contexto. A inativação desses neurônios do engrama no HPC foi suficiente para inibir a expressão do medo após o seu retorno. Como resultado, a manipulação seletiva de neurônios que fazem parte do engrama de uma memória possibilita um estudo mais específico sobre a contribuição de determinadas estruturas nas diferentes fases da memória, tendo sido viabilizado após o desenvolvimento de diversas técnicas de manipulação seletiva e a criação de diferentes modelos animais transgênicos, conforme discutido a seguir.

1.4. MODELO DE ESTUDO: MÉTODO DAUN02 EM RATOS C-FOS-LACZ

Até recentemente, não existiam técnicas que possibilitassem o estudo seletivo de um grupo de neurônios sem afetar a atividade de uma grande parte dos neurônios circundantes (Koya; Margetts-Smith; Hope, 2016). No entanto, métodos de manipulação molecular e o desenvolvimento de roedores transgênicos nos últimos anos possibilitaram a identificação de populações específicas de neurônios ativados durante o aprendizado. Isso permitiu a manipulação de engramas específicos de memória (Josselyn; Köhler; Frankland, 2015).

Um método recentemente desenvolvido é o método Daun02. O método Daun02 utiliza ratos transgênicos Wistar c-Fos-lacZ, nos quais a β -galactosidase (β -gal) e o Fos são co-expressos em neurônios fortemente ativados (Cruz *et al.*, 2013, 2014; Cruz; Javier Rubio; Hope, 2015; Lay *et al.*, 2022). O transgene c-Fos-lacZ nos ratos transgênicos contém um promotor c-Fos que controla a transcrição da sequência codificadora lacZ. Quando há atividade neuronal forte e persistente, a expressão de Fos é induzida, levando à ativação do promotor de c-Fos. Consequentemente, a expressão do ácido ribonucleico mensageiro de lacZ e seu produto proteico β -gal também aumentam em neurônios altamente ativos (Cruz; Javier Rubio; Hope, 2015).

Quando os níveis de β -gal estão em seu pico, geralmente 90 minutos após a ativação neuronal, a pró-droga inativadora Daun02 é injetada diretamente em uma área encefálica de interesse. A enzima β -gal catalisa a conversão de Daun02 em daunorrubicina, perturbando assim a função normal desses neurônios e induzindo a apoptose dessas células nervosas (Cruz *et al.*, 2013; Koya *et al.*, 2009; Koya; Margetts-Smith; Hope, 2016; Pfarr *et al.*, 2015). A formação ou reativação de uma memória induz a expressão de c-Fos, resultando, neste modelo animal, na concomitante expressão de β -gal (Figura 7). Portanto, considerando que os mesmos neurônios são utilizados durante a formação e evocação de uma memória, sua eliminação resultaria em uma redução na expressão do comportamento associado a essa memória.

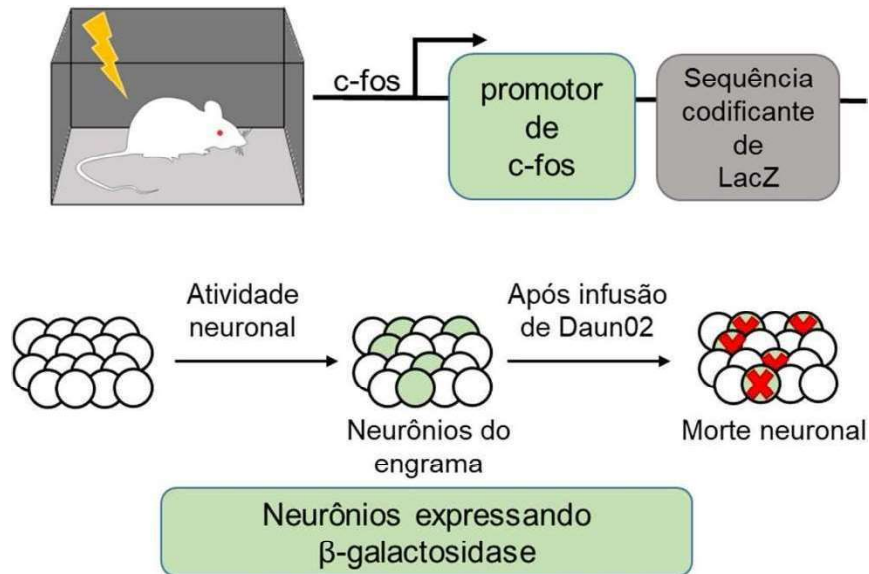


Figura 7: Modelo animal utilizado neste estudo. Os ratos c-Fos-LacZ possuem um transgene contendo o promotor c-Fos, que induz a transcrição da sequência de codificação lacZ, levando à tradução de β -gal em neurônios fortemente ativados. A Daun02 é catalisada por β -gal para o produto ativo daunorrubicina, que induz a apoptose de neurônios previamente ativados.

O modelo animal utilizado neste estudo é validado por vários outros grupos de pesquisa, como Bossert *et al.* (2011), Cruz *et al.* (2014), Koya *et al.* (2009), Lay *et al.* (2022). Discussões sobre se a Daun02 pode ativar diferentes mecanismos para reduzir a excitabilidade ou induzir apoptose, bem como possíveis mecanismos pelos quais a Daun02 perturba a função neuronal, podem ser melhor exploradas em Bashir & Banks (2017) e Koya; Margetts-Smith; Hope (2016). No entanto, de modo geral, as evidências indicam que ela age por meio de morte neuronal via apoptose, visto que a neurodegeneração observada após a infusão de Daun02 em animais transgênicos c-Fos-LacZ foi prevenida pela administração de um inibidor de pan-caspase com propriedades antiapoptóticas (Pfarr *et al.*, 2015).

Um dos poucos pré-requisitos para a utilização de animais c-Fos-lacZ está relacionado com a expressão em níveis suficientes de β -gal nas estruturas encefálicas a serem estudadas. Estudos relacionados a drogas de abuso demonstraram com sucesso a utilização de Daun02 para inativar neurônios no CPFm desses animais (Bossert *et al.*, 2011; Pfarr *et al.*, 2015), onde identificaram a presença de engramas responsáveis pelo controle da ingestão de drogas de abuso nessa importante estrutura. Um estudo recente também utilizou este modelo para avaliar o papel da AMG durante a extinção de memórias (Lay *et al.*, 2022), identificando um papel significativo de engramas da CeA, mas não da BLA. Os estudos descritos acima demonstram que o método Daun02 exibe grande potencial para

investigações acerca do engrama de diferentes estruturas.

Considerando os debates em torno da natureza das memórias de extinção e dos processos de consolidação sistêmica, a utilização do modelo Daun02 em ratos Wistar c-Fos-LacZ oferece a oportunidade de manipular os engramas de memória durante os estágios de consolidação, reconsolidação e extinção. Com isso, levantamos a hipótese de que a eliminação do engrama de extinção resultará no retorno do medo, corroborando a ideia de que as memórias de extinção envolvem a formação de uma nova memória. Em contraste, a eliminação do engrama durante os processos de consolidação e reconsolidação reduzirá a expressão da memória aversiva. Adicionalmente, acredita-se que a eliminação do engrama de uma estrutura cortical, como o córtex pré-límbico, durante a consolidação levará a déficits na expressão do componente contextual dessa memória em um teste de memória remota.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar a dinâmica dos engramas em animais submetidos a tarefas de condicionamento aversivo, abrangendo diferentes processos mnemônicos e avaliando estruturas encefálicas específicas, por meio da técnica Daun02 em ratos da linhagem Wistar c-Fos-LacZ.

Objetivos específicos

Capítulo I

1. Quantificar, por meio da técnica de imunohistoquímica, os níveis de expressão de β -gal após a infusão de Daun02 na BLA de animais c-Fos-LacZ;
2. Avaliar se a eliminação dos neurônios ativos na BLA durante a aquisição de uma memória aversiva é capaz de influenciar a expressão dessa memória em um teste subsequente;
3. Verificar se a eliminação do engrama ativo durante a reconsolidação de uma memória afeta o engrama da memória previamente consolidada na BLA;
4. Avaliar se, após uma sessão de extinção curta, a eliminação do engrama de extinção na BLA afetar a expressão da memória de extinção;
5. Avaliar se, após uma sessão de extinção longa, a eliminação do engrama de extinção na BLA afetar a expressão da memória de extinção;
6. Investigar se a infusão de Daun02 na BLA impacta a capacidade de expressão de medo dos animais;
7. Quantificar, por meio da técnica de imunohistoquímica, os níveis de expressão de β -gal após a infusão de Daun02 no córtex IL de animais c-Fos-LacZ;
8. Avaliar se a eliminação do engrama ativo durante a reconsolidação de uma memória afeta o engrama da memória previamente consolidada no córtex IL;
9. Avaliar se, após uma sessão de extinção longa, a eliminação do engrama de extinção no córtex IL afetar a expressão da memória de extinção;

Capítulo II

10. Avaliar se a eliminação dos neurônios ativos no córtex PL durante a aquisição de uma memória aversiva é capaz de influenciar a expressão dessa memória em um teste de memória recente;
11. Avaliar se a eliminação dos neurônios ativos no córtex PL durante a aquisição de

uma memória aversiva é capaz de influenciar a expressão dessa memória em um teste de memória remota.

3. RESULTADOS

Os resultados deste estudo foram organizados em dois capítulos. O Capítulo I abrangeu os objetivos 1 a 9, conforme apresentado no artigo correspondente. Já o Capítulo II apresenta os resultados relativos aos objetivos 10 e 11.

3.1. CAPÍTULO I

Distinct engrams control fear and extinction memory

Jordana Griebler Luft, Bruno Popik, Débora Gonçalves, Fabio C. Cruz, Lucas de Oliveira Alvares

Manuscrito publicado no periódico *Hippocampus*. DOI: 10.1002/hipo.23601.

Qualis Ciências biológicas II: A2

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Distinct engrams control fear and extinction memory

Jordana Griebler Luft¹  | Bruno Popik¹ | Débora Aguirre Gonçalves¹  |
Fabio Cardoso Cruz² | Lucas de Oliveira Alvares¹¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil²Departamento de Farmacologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil**Correspondence**Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 210, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
Email: lucas.alvares@ufrgs.br**Funding information**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Abstract

Memories are stored in engram cells, which are necessary and sufficient for memory recall. Recalling a memory might undergo reconsolidation or extinction. It has been suggested that the original memory engram is reactivated during reconsolidation so that memory can be updated. Conversely, during extinction training, a new memory is formed that suppresses the original engram. Nonetheless, it is unknown whether extinction creates a new engram or modifies the original fear engram. In this study, we utilized the Daun02 procedure, which uses c-Fos-lacZ rats to induce apoptosis of strongly activated neurons and examine whether a new memory trace emerges as a result of a short or long reactivation, or if these processes rely on modifications within the original engram located in the basolateral amygdala (BLA) and infralimbic (IL) cortex. By eliminating neurons activated during consolidation and reactivation, we observed significant impacts on fear memory, highlighting the importance of the BLA engram in these processes. Although we were unable to show any impact when removing the neurons activated after the test of a previously extinguished memory in the BLA, disrupting the IL extinction engram reactivated the aversive memory that was suppressed by the extinction memory. Thus, we demonstrated that the IL cortex plays a crucial role in the network involved in extinction, and disrupting this specific node alone is sufficient to impair extinction behavior. Additionally, our findings indicate that extinction memories rely on the formation of a new memory, supporting the theory that extinction memories rely on the formation of a new memory, whereas the reconsolidation process reactivates the same original memory trace.

KEYWORDS

basolateral amygdala, infralimbic cortex, new learning, unlearning

1 | INTRODUCTION

Engrams are the enduring biological alterations that occur in specific cells that support particular experiences. More than a century ago, Semon coined the term Engram to refer to the physical trace of memory (Lashley, 1950; Semon, 1921). Since then, researchers have been attempting to find the locus of a specific memory substrate. Memories are formed through the strengthening of synaptic connections between populations of neurons that are active during encoding and stored in specific neuronal engrams in the brain. These engram cells

tend to be active during memory retrieval (Abdou et al., 2018; Jung et al., 2023). Engram cells are both necessary and sufficient for memory recall (Han et al., 2009; Jung et al., 2023; Ramirez et al., 2013; Ressler et al., 2021).

Memory is stored in a widely distributed network of neurons in distinct brain regions (Choi et al., 2018). The lateral nucleus of the amygdala is viewed as the primary site where associations between the conditioned stimulus (CS) and the unconditioned stimulus (US) are formed and stored during fear conditioning (Ciocchi et al., 2010). It has been suggested that a different set of neuronal

3.2. CAPÍTULO II

Role of Prelimbic Neuronal Engrams in Long-Term Fear Memory Consolidation

Jordana Griebler Luft, Bruno Popik, Lucas de Oliveira Alvares

Manuscrito em preparação.

Role of Prelimbic Neuronal Engrams in Long-Term Fear Memory Consolidation

Jordana Griebler Luft¹, Bruno Popik¹, Lucas de Oliveira Alvares^{1*}

¹ Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

*Corresponding author: Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 210, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br

Abstract

Memories undergo consolidation in the brain, with the prelimbic cortex (PL) in the medial prefrontal cortex (mPFC) playing a key role in fear expression post-learning. Establishing a direct link between active cortical neurons during acquisition and their role in remote recall is challenging. Utilizing the Daun02 technique in fear conditioning, we found the PL engram to be dispensable for recent memory but crucial for remote contextual memories recall. Neurons constituting this engram are allocated to the engram during acquisition, and their elimination disrupts recall after systemic consolidation. This study enriches the understanding of PL engram dynamics in memory processes.

Keywords: Prelimbic cortex, systemic consolidation, engram, remote memory.

1. Introduction

Our capacity to retain and later recall information is vital for our survival. Memories are encoded and stored in the brain through a process known as consolidation. This consolidation process can take place at the level of individual neurons, termed synaptic consolidation, occurring within minutes to hours after learning (Casagrande et al., 2018; Josselyn & Tonegawa, 2020). Additionally, consolidation can occur at a network scale, referred to as systems consolidation, which occurs over the course of days to weeks following the initial learning experience (Frankland & Bontempi, 2005; McGaugh, 2015). Systems consolidation, encompassing several brain areas, is essential for the enduring storage of memories (Dixsaut & Gräff, 2022).

The medial prefrontal cortex (mPFC) is a cortical region recognized for its extensive projections to various other brain areas. It plays a pivotal role in numerous brain functions, including cognitive processes, emotional regulation, motivation, and sociability (Xu et al., 2019). Within the mPFC, we can emphasize the prelimbic (PL) and infralimbic (IL) subdivisions, which play distinct roles in regulating the expression and suppression of fear, respectively (Giustino & Maren, 2015).

The PL is believed to be necessary for the expression of conditioned memories after hours or weeks post-learning (Do-Monte et al., 2015). While some studies propose that PL neurons active during memory encoding are essential for memory retrieval, others argue that the circuit undergoes reorganization during memory consolidation (DeNardo et al., 2019; Giannotti et al., 2019; Kitamura et al., 2017). Consequently, establishing a clear relationship between the function of active cortical neurons during memory acquisition and their role in remote memory recall has proven challenging. Hence, the precise timing of the formation of the PL engram and its specific contribution to the retrieval of remote memories remains uncertain. To explore this, we employed the Daun02 technique during fear conditioning to examine the involvement of the PL engram in the recall of both recent and remote fear memories.

2. Material and methods

2.1. *Animals*

We used 24 males and female c-Fos-lacZ transgenic rats weighing 270–350 g at the time of surgery from our breeding colony. Rats were genotyped according to the protocol described by (Koya et al., 2016). Animals that express the c-Fos-LacZ gene are indicated

with “+” while the ones that do not, with “-”. They were housed in plexiglass boxes, with 2-5 animals per cage. Animals were kept on controlled photoperiods (12 h light/12 h dark; lights on at 7:00 a.m.) and temperature (21 ± 2 °C), with regular chow and water available *ad libitum*. All the experiments were performed during the light cycle. Procedures followed the Brazilian ethical guidelines for animal research set by the National Council for the Control of Experimental Animal Research (CONCEA) (CONCEA, 2023).

2.2. *Fear conditioning*

Apparatus: The conditioning chamber (context A) consisted of an illuminated plexiglass box (33 x 22 x 22cm) with a floor grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart. Context chambers had the same dimensions, but context A had black walls, whereas context B was vertically striped in black and white.

Training session: The rats were habituated for 2 days in context B (10 min each day), and 24h later were placed in context A, where they received three 30s presentations of a 5-kHz, 75-dB tone (CS) that co-terminated with a 0.5mA 1s footshock (US) (three tone-footshock pairings). The first CS was presented after 2min into the context, with an interpairing interval of 1min between each tone/footshock. After all behavioral tests, the animals returned to their home cages one minute after the final pairing.

Tone test session: The animals were presented with 3 CSs in context B. The percentage of freezing time during each tone was quantified, and the average of the three tones was used as a fear measure.

Context test session: Animals were put in context B for 5 minutes. The percentage of freezing time was quantified per minute, and the average of the five minutes was used as a fear measure.

2.3. *Behavioral assessment*

Freezing behavior was used as a memory index in the fear conditioning tasks and was registered with a stopwatch in real-time by an experienced observer who was blinded to the experimental group. Freezing was defined as total cessation of all movements except those required for breathing.

2.4. *Stereotaxic surgery and cannula implantation*

Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg) and

xylazine (10 mg/kg) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus. Bilateral guide cannulas were targeted for placement over the Prelimbic Cortex (AP +3.2 mm (from bregma), LL \pm 0.6 mm, DV -1.6 mm). Meloxicam (analgesic and nonsteroidal anti-inflammatory; 1 mg/kg; subcutaneously) was administered 20 min before surgery, as well as once a day for the following two days. Animals were allowed to recover for 5–7 d before the experiment.

2.5. *Drugs and microinfusion*

Daun02 was infused bilaterally into the target structure at a total volume of 0.5 μ L. At the time of infusion, a 27-gauge needle was fitted to a 22-gauge guide cannula. All infusions were administered at a rate of 30 μ L/h for 5 min, and the animals were gently held or restrained by a researcher.

Daun02 was obtained from Sequoia Research Products (www.seqchem.com). Daun02 (2 μ g/0.5 μ L/side) was dissolved in 5% DMSO, 6% Tween 80, and 89% 0.01 M PBS. The vehicle was made of 5% DMSO, 6% Tween 80, and 89% 0.01 M PBS. The Daun02 dose was based on previous studies (Bossert et al., 2011; Koya et al., 2009).

2.6. *Histology*

Euthanasia was conducted after the completion of behavioral experiment. Euthanasia was performed using the decapitation procedure. The brains were removed and fixed with 4% paraformaldehyde. A scalpel was used to obtain cross-sections of the brain, and cannula placement was verified under a light microscope. Animals were included in the analysis only when a blinded experimenter verified that the placement of the cannulas had reached the structure.

2.7. *Daun02 removal of selectively activated neurons*

The Daun02 method uses c-Fos-lacZ transgenic rats, in which β -galactosidase (β -gal) and Fos are co-expressed within strongly activated neurons (Cruz et al., 2013, 2014, 2015; Koya et al., 2016; Lay et al., 2022). The c-Fos-lacZ transgene in transgenic rats contains a c-fos promoter that controls the transcription of the lacZ coding sequence. When there is strong and persistent neural activity, Fos expression is induced, leading to the activation of the c-fos promoter. Consequently, the expression of lacZ mRNA and its protein product β -galactosidase is increased in these highly activated neurons (Cruz et al., 2013). Thus, in strongly activated neurons β -gal converts Daun02 into Daunorubicin,

which disrupts the normal function of these neurons, inducing the apoptosis of those neurons (Pfarr et al., 2015).

2.8. *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using Graph Pad Prism version 8. Protein immunodetection is shown as the percentage of immunoreactive area. Data are expressed as mean \pm SEM, always using the animal as the experimental unit. Statistical tests include two-tailed Student's t-test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. **Results**

Memories are encoded within engram cells, comprising neurons that were active during memory acquisition (Lau et al., 2020). The engram, representing a memory trace, extends across various brain regions (Ganella et al., 2018; Kitamura et al., 2017). Current understanding suggests that within the medial mPFC, engrams are established during memory acquisition but remain quiescent until the memory undergoes complete consolidation (DeNardo et al., 2019). To test the role of PL engram during recent memory recall we used c-Fos-LacZ transgenic rats to tag and manipulate neurons that were active during fear conditioning consolidation. In these rats, the immediate early gene c-Fos promoter stimulates transcription of the lacZ coding sequence, which results in the translation of the protein product β -gal only in highly excited neurons (Cruz et al., 2015) (Figure 1-A).

Ninety minutes after the fear conditioning session, animals received an infusion of Daun02 in the PL region to eliminate neurons activated during training. They were then tested 72 hours later. During the test, high freezing levels were observed in the context, with no significant difference between groups (Student's t-test, $T_8 = 1.049$, $P = 0.3247$) (Fig 1B). On the next day, during test 2 at the tone cue, no significant difference was observed (Student's t-test, $T_8 = 1.047$, $P = 0.3258$) (Fig. 1C). These findings suggest that memory was not yet dependent on the PL neuronal engram, as indicated by the absence of changes in freezing behavior following Daun02 infusion.

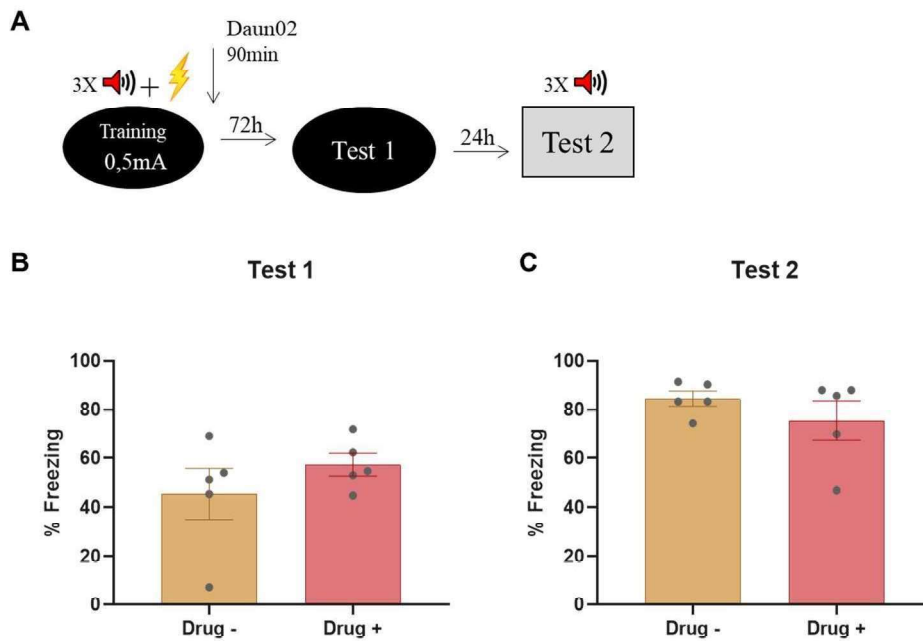
Figure 1

Figure 1: Recent memory retrieval independent of PL engram. **A.** Experimental Design: Following fear conditioning, animals underwent drug infusion and were tested 72 hours later for contextual memory. The subsequent day, auditory memory recall was assessed. **B.** Test 1 Results: Both groups displayed elevated freezing levels, indicating effective recent contextual memory recall. **C.** Test 2 Findings: No significant difference between groups was observed, suggesting that the PL engram is not required for recent auditory memory recall (Drug - $n = 5$; Drug + $n = 5$). Data are presented as mean \pm SEM.

In contrast, when animals received an infusion of Daun02 in the PL region ninety minutes after the fear conditioning session but were tested 30 days later, we observed significant changes in freezing behavior (Figure 2). During the contextual test, Drug - animals exhibited high freezing levels in the context, while Drug +, whose fear engram was erased after Daun02 infusion in the PL cortex post-training, showed statistically less freezing (Student's t -test, $T_{12} = 5.127$, $P = 0.0003$) (Fig 1B). The following day, during test 2 at the tone cue, no statistically significant difference was observed (Student's t -test, $T_{12} = 1.939$, $P = 0.0764$) (Fig. 2C). These findings suggest that the PL engram for contextual memory is allocated during memory formation and is necessary for systemic consolidation.

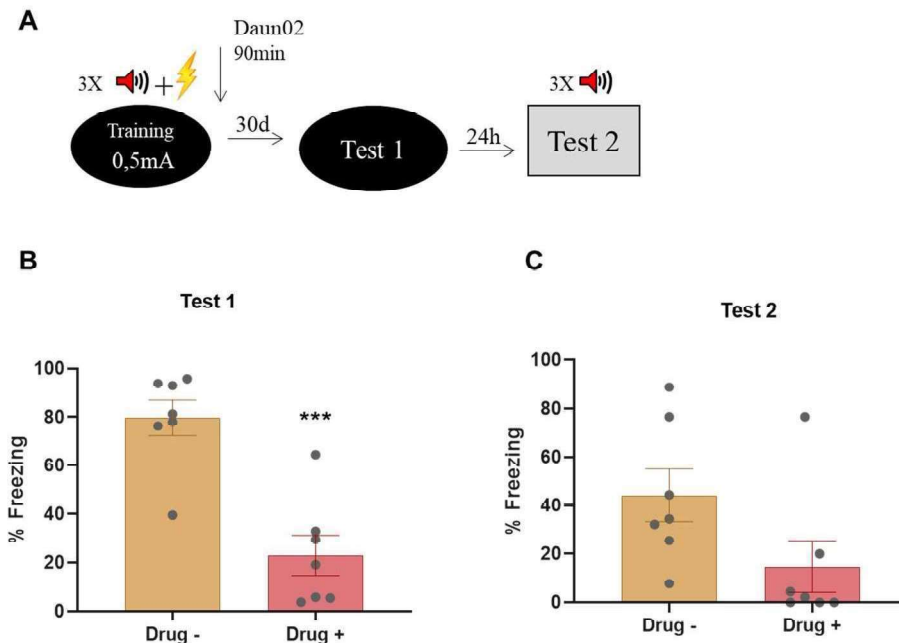
Figure 2

Figure 2: PL contextual engram is formed during memory acquisition. **A.** Following fear conditioning, animals underwent drug infusion and were tested 30 days later to assess contextual memory. The subsequent day, auditory memory recall was examined. **B.** Drug + animals exhibited reduced freezing levels, indicating disruption in the consolidation of contextual memory. **C.** No significant difference between groups was observed during the auditory memory recall test, suggesting that tone information is not dependent on PL systemic consolidation (Drug - n = 7; Drug + n = 7). *** P<0.0005. Data are presented as mean ± SEM.

4. Discussion

In this study, employing the Daun02 technique, we demonstrated that the PL engram is dispensable for the recall of recent memories. However, for the retrieval of contextual memories aged 30 days, the presence of the PL engram becomes crucial. Furthermore, it was observed that the neurons constituting this engram are selected during the memory acquisition process. The elimination of these specific neurons after memory acquisition significantly disrupts memory recall post systemic consolidation.

Contextual information, reliant on hippocampal activity, undergoes systemic consolidation and gradually becomes less dependent on hippocampal activity for recall (de Oliveira Alvares & Do-Monte, 2021). Throughout this process, it is theorized that neocortical regions, such as the PL, assume the responsibility for maintaining the memory. As reliance on the PL increases for recall, the memory also tends to become more generalized (Frankland & Bontempi, 2005). While the time elapsed since encoding plays a crucial role in determining whether the hippocampal or neocortical component of the memory will be expressed during retrieval (in accordance with standard consolidation theory (Squire et al., 2015)), other factors

such as task demands, attention, reactivations, and prior knowledge also significantly influence this dynamic (de Oliveira Alvares et al., 2011; Wang et al., 2012).

Our findings align with the multiple trace theory of memory. As evidenced by our results, recent memory recall does not necessitate the involvement of the PL engram. However, the erasure of the PL engram post-memory acquisition hinders the recall of remote, consolidated contextual memories. Recent findings by Cummings and Clem provide evidence that within the PL, an increase in synaptic efficacy of somatostatin-expressing interneurons is observed after fear conditioning (Cummings & Clem, 2020), also those neurons are selectively activated for fear memory expression (Cummings et al., 2022). Additionally, the study conducted by Dixsaut & Gräff further supports the significance of the PL during memory encoding and its crucial role in remote memory recall (Dixsaut & Gräff, 2022).

The findings of Corcoran and Quirk (Corcoran & Quirk, 2007), demonstrating that PL activity is necessary for the expression but not the encoding of conditioned fear, also support our study. However, within their work, both the tone and context were affected during memory retrieval. Additionally, their test was conducted one day after the conditioning protocol, which could be interpreted as assessing recent memory. Nevertheless, we acknowledge that memory consolidation can be influenced by the strength of training (Casagrande et al., 2018). In their study, the training protocol involved seven tones (30s) co-terminated with footshocks (0.5 s; 0.50mA) or four unsignaled footshocks (1s; 0.8mA), representing a stronger training paradigm compared to our study, which comprised of three (30s) presentations of a tone co-terminated with footshocks (1s; 0.5mA). This difference in the strength of training protocols between our study and that of Corcoran and Quirk may contribute to the variations observed in the results of both studies.

Evidence suggests that the engram formed in the PL is generated during memory encoding, involving inputs from both the hippocampal–entorhinal cortex network and the basolateral amygdala. Following acquisition, the cortical engram undergoes a period of maturation before becoming fully functional. During this maturation phase, hippocampal neurons are responsible for maintaining the memory until the cortical engram becomes fully operational (Kitamura et al., 2017). The study by DeNardo and colleagues also supports the idea that PL activity during learning is essential for establishing the engram of PL neurons that supports remote memory retrieval. However, they suggest that new PL neurons are recruited to the remote memory trace over time after the initial learning. These neurons become increasingly likely to contribute to the behavioral outcomes compared to the neurons initially engaged in the memory formation (DeNardo et al., 2019). This could explain why during our Test 2 (Figure

2C), memory for the conditioning tone was not significantly impaired, although it appeared to be lower than that of the Drug - group.

Altogether, our findings support the multiple trace theory of memory, wherein PL activity is necessary for remote but not recent memory recall. Additionally, we demonstrated that the PL engram is formed by a subset of neurons activated during memory acquisition and is responsible for the recall of remote contextual memories, so eliminating those neurons after fear conditioning disrupts remote memory recall.

Acknowledgments

The authors acknowledge Isabel Cristina Marques for her kind technical assistance.

Author contributions

Jordana Griebler Luft: Methodology, project administration, writing; Bruno Popik: Methodology, writing; Lucas de Oliveira Alvares: Supervision, conceptualization, funding acquisition, writing.

Funding

This work was supported by the Brazilian government agency CAPES.

Competing interests

The authors have nothing to disclose.

References

- Bossert, J. M., Stern, A. L., Theberge, F. R. M., Cifani, C., Koya, E., Hope, B. T., & Shaham, Y. (2011). Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. *Nature Neuroscience*, *14*(4), 420–422. <https://doi.org/10.1038/nn.2758>.Ventral
- Casagrande, M. A., Haubrich, J., Pedraza, L. K., Popik, B., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2018). Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiology of Learning and Memory*, *150*, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.03.002>
- CONCEA. (2023). *Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica*. https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-concea/guia_concea_1ed_animais_ensino_ou_pesquisa_2023.pdf
- Corcoran, K. A., & Quirk, G. J. (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *Journal of Neuroscience*, *27*(4), 840–844. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5327-06.2007>
- Cruz, F. C., Babin, K. R., Leao, R. M., Goldart, E. M., Bossert, J. M., Shaham, Y., & Hope, B. T. (2014). Role of Nucleus Accumbens Shell Neuronal Ensembles in Context-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking. *The Journal of Neuroscience*, *34*(22), 7437–7446. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0238-14.2014>
- Cruz, F. C., Javier Rubio, F., & Hope, B. T. (2015). Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain Research*, *1628*(A), 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.005>
- Cruz, F. C., Koya, E., Guez-Barber, D. H., Bossert, J. M., Lupica, C. R., Shaham, Y., & Hope, B. T. (2013). New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(11), 743–754. <https://doi.org/10.1038/nrn3597>
- Cummings, K. A., Bayshtok, S., Dong, T. N., Kenny, P. J., & Clem, R. L. (2022). Control of fear by discrete prefrontal GABAergic populations encoding valence-specific information. *Neuron*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.004>
- Cummings, K. A., & Clem, R. L. (2020). Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. *Nature Neuroscience*, *23*(1), 61–74. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0552-7>
- de Oliveira Alvares, L., & Do-Monte, F. H. (2021). Understanding the dynamic and destiny of memories. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *125*, 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.009>
- de Oliveira Alvares, L., Einarsson, E. Ö., Santana, F., Crestani, A. P., Haubrich, J., Cassini, L. F., Nader, K., & Quillfeldt, J. A. (2011). Periodically Reactivated Context Memory Retains Its Precision and Dependence on the Hippocampus. *Hippocampus*, *000*, 3–6. <https://doi.org/10.1002/hipo.20983>
- DeNardo, L. A., Liu, C. D., Allen, W. E., Adams, E. L., Friedmann, D., Fu, L., Guenther, C. J., Tessier-Lavigne, M., & Luo, L. (2019). Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nature Neuroscience*, *22*(3), 460–469. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0318-7>

- Dixsaut, L., & Gräff, J. (2022). Brain-wide screen of prelimbic cortex inputs reveals a functional shift during early fear memory consolidation. *ELife*, *11*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.78542>
- Do-Monte, F. H., Quinones-Laracuente, K., & Quirk, G. J. (2015). A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature*, *519*(7544), 460–463. <https://doi.org/10.1038/nature14030>
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(2), 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>
- Ganella, D. E., Nguyen, L. D., Lee-Kardashyan, L., Kim, L. E., Paolini, A. G., & Kim, J. H. (2018). Neurocircuitry of fear extinction in adult and juvenile rats. *Behavioural Brain Research*, *351*(May), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.001>
- Giannotti, G., Heinsbroek, J. A., Yue, A. J., Deisseroth, K., & Peters, J. (2019). Prefrontal cortex neuronal ensembles encoding fear drive fear expression during long-term memory retrieval. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47095-7>
- Giustino, T. F., & Maren, S. (2015). The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*(NOVEMBER), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>
- Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, *367*(6473). <https://doi.org/10.1126/science.aaw4325>
- Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., Redondo, R. L., & Tonegawa, S. (2017). Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, *356*(6333), 73–78. <https://doi.org/10.1126/science.aam6808>
- Koya, E., Golden, S. A., Harvey, B. K., Guez-barber, D. H., Berkow, A., Simmons, D. E., Bossert, J. M., Nair, S. G., Uejima, J. L., Marin, M. T., Mitchell, T. B., Farquhar, D., Ghosh, S. C., Mattson, B. J., & Hope, B. T. (2009). Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. *Nature Neuroscience*, *12*(8), 1069–1073. <https://doi.org/10.1038/nn.2364>
- Koya, E., Margetts-Smith, G., & Hope, B. T. (2016). Daun02 Inactivation of Behaviorally Activated Fos-Expressing Neuronal Ensembles. *Current Protocols in Neuroscience*, *76*(1), 8.36.1-8.36.17. <https://doi.org/10.1002/cpns.2>
- Lau, J. M. H., Rashid, A. J., Jacob, A. D., Frankland, P. W., Schacter, D. L., & Josselyn, S. A. (2020). The role of neuronal excitability, allocation to an engram and memory linking in the behavioral generation of a false memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *174*(August), 107284. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107284>
- Lay, B. P. P., Koya, E., Hope, B. T., Esber, G. R., & Iordanova, M. D. (2022). The Recruitment of a Neuronal Ensemble in the Central Nucleus of the Amygdala During the First Extinction Episode Has Persistent Effects on Extinction Expression. *Biological Psychiatry*, *93*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.07.021>
- McGaugh, J. L. (2015). Consolidating Memories. *Ssrn*. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-014954>
- Pfarr, S., Meinhardt, M. W., Klee, M. L., Hansson, A. C., Vengeliene, V., Scho, K., Bartsch, D., Hope, B. T., Spanagel, R., & Sommer, W. H. (2015). Losing Control: Excessive

- Alcohol Seeking after Selective Inactivation of Cue-Responsive Neurons in the Infralimbic Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 35(30), 10750–10761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0684-15.2015>
- Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(a021766), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021766>
- Wang, S. H., Finnie, P. S. B., Hardt, O., & Nader, K. (2012). Dorsal hippocampus is necessary for novel learning but sufficient for subsequent similar learning. *Hippocampus*, 22(11), 2157–2170. <https://doi.org/10.1002/hipo.22036>
- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological Genomics*, 51(9), 432–442. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00006.2019>

4. DISCUSSÃO GERAL

Nossa capacidade de assimilar e reter informações diárias é de extrema importância para otimizar nossas respostas a eventos futuros. Por meio de nossas memórias, conseguimos adaptar nossas reações a situações atuais, baseando-nos em experiências passadas semelhantes. No entanto, o desenvolvimento de memórias patológicas pode acarretar diversos prejuízos na vida pessoal dos indivíduos afetados, como observado em casos de transtorno do estresse pós-traumático, nos quais os indivíduos acabam consolidando memórias traumáticas persistentes (Kessler *et al.*, 2017). Um entendimento mais aprofundado sobre como as memórias são formadas e mantidas, assim como do papel das estruturas envolvidas nos diferentes processos, torna-se essencial para a criação de estratégias que minimizem essas situações patológicas. Visto que novas ferramentas têm sido desenvolvidas, tornou-se possível a manipulação de regiões e populações neuronais específicas em nosso encéfalo (Josselyn; Köhler; Frankland, 2015). Assim sendo, utilizamos uma técnica que nos permite a manipulação de neurônios específicos para avaliarmos a dinâmica dos engramas de diferentes estruturas durante os processos de consolidação, reconsolidação e extinção de memórias aversivas.

Portanto, em nosso estudo, empregamos o método Daun02, que utiliza ratos Wistar c-Fos-LacZ para marcar e apagar neurônios ativados em momentos específicos de cada protocolo. Inicialmente, com a intenção de validar nosso modelo, verificamos se a remoção do engrama de uma memória recentemente consolidada na BLA era capaz de afetar a sua evocação. Para isso, removemos os neurônios ativos no momento da aquisição de uma memória de CAT (Capítulo I, Figura 1) e observamos que a remoção desses neurônios interfere na evocação da memória aversiva, corroborando as evidências de que os neurônios são alocados a uma memória no momento da sua aquisição e que a eliminação de neurônios que são o substrato da memória resulta em um déficit na evocação das informações relacionadas a ela (Josselyn; Frankland, 2018; Josselyn; Tonegawa, 2020; Lau *et al.*, 2020; Yiu *et al.*, 2014). Logo, validamos o nosso modelo de estudo, comprovando que ele é capaz de manipular o engrama de uma memória aversiva.

Em seguida, decidimos avaliar a dinâmica de neurônios durante o processo de reconsolidação. Com base na literatura, o processo de reconsolidação ocorre nos mesmos neurônios alocados durante a aquisição da memória e interferências durante esse processo podem perturbar a memória original (Dudai, 2004; Nader, 2015; Rodriguez-Ortiz *et al.*, 2008). Observamos que a remoção dos neurônios ativos durante a reconsolidação (após

uma breve reativação), causou uma redução na expressão do medo durante o teste, indicando que ambos os processos (consolidação e reconsolidação) ocorrem no mesmo engrama da BLA (Capítulo I, Figura 2). Assim como o ocorrido durante a consolidação, é possível que tenhamos eliminado os neurônios de medo localizadas na BLA, interferindo na sinalização que leva a expressão de respostas aversivas. Essas descobertas estão em concordância com estudos que sugerem que estratégias baseadas na reconsolidação tendem a ser duradouras, se não permanentes, pois atuam no traço original da memória (Popik *et al.*, 2020).

Por outro lado, inúmeros estudos sugerem que o processo de extinção envolva um novo conjunto de neurônios responsável por suprimir a memória de medo original (hipótese de novo aprendizado ou *new learning*) (Khalaf; Gräff, 2019; Lacagnina *et al.*, 2019; Zhang; Kim; Tonegawa, 2020). Essa ideia é sustentada pelo retorno do medo, que pode ser demonstrada por testes de *renewal*, *reinstatement* e recuperação espontânea do medo (Lee; Kaang, 2023). Entretanto, uma hipótese alternativa prediz que os mecanismos da extinção são baseados na desaprendizagem ou *unlearning*. Com base nisso, alguns estudos têm mostrado que a extinção envolve o enfraquecimento de conexões previamente estabelecida entre o CS eo US, sugerindo que o condicionamento aversivo envolva uma potenciação das conexões sinápticas dos neurônios envolvidos, enquanto que durante a extinção ocorreria uma depotenciação (Choi *et al.*, 2021; Hong *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Lai; Adler; Gan, 2018).

Apesar de a natureza das memórias de extinção permanecer um tópico complexo e ainda debatido no campo da pesquisa de memória, os nossos achados corroboram a hipótese de uma nova aprendizagem. Pois, ao eliminar o engrama de extinção no IL, observamos um aumento nos níveis de *freezing* dos animais, indicando o retorno na expressão da memória aversiva (Capítulo I, Figura 4). Durante o processo de extinção, a ativação do IL resulta na ativação de neurônios intercalares da AMG. Estes neurônios inibitórios acabam inibindo a ativação da CeA, que por sua vez é responsável por sinalizar a expressão de medo. Desta forma a ativação do IL acarreta na redução da expressão do medo (Quirk; Mueller, 2008; Sierra-Mercado; Padilla-Coreano; Quirk, 2011). Assim, demonstramos que após a eliminação do engrama de extinção, observamos um retorno na expressão do medo, porém esse retorno não foi total. Vale ressaltar que o engrama de uma memória se encontra distribuído por inúmeras estruturas encefálicas (Choi *et al.*, 2018). Desta forma, acreditamos que o IL desempenha um papel vital em memórias de extinção, mas que existem mecanismos compensatórios em outras estruturas associadas à extinção do medo que podem

compensar parcialmente o papel desempenhado pelo IL.

Seguindo essa abordagem, também buscamos demonstrar uma dissociação do engrama de extinção na BLA, porém não foi possível apresentar esses efeitos. Para isso, adotamos dois protocolos distintos para induzir a formação de uma memória de extinção. Inicialmente, realizamos uma sessão única de 24 tons (Capítulo I, Figura Suplementar 2), porém os resultados obtidos não foram os esperados. Diante disso, optamos por empregar outro protocolo de extinção, mais intenso, que consistia em três dias de reexposição com 10 CS por dia, uma vez que se sabe que sessões múltiplas podem promover a formação de uma memória de extinção mais robusta (Capítulo I, Figura 2) (Cain; Blouin; Barad, 2003). No entanto, em ambos os protocolos ao eliminar o engrama ativo durante o teste de extinção, não observamos o retorno do medo no teste subsequente.

O circuito gerado pelas memórias de extinção poderia explicar por que, ao eliminarmos o engrama da BLA, o comportamento de medo não retorna, mas ao eliminarmos o engrama da CeA, sim. Isso porque é possível que o engrama de extinção localizado no IL ainda consiga sustentar a memória de extinção mesmo na ausência do engrama de extinção da BLA. Já o engrama da CeA parece ser central para a sinalização da expressão do medo por sua conexão direta com a substância cinzenta periaquedutal. No entanto, Zhang e colaboradores demonstraram que o engrama da memória de extinção é formado e armazenado em uma população neuronal específica da BLA, responsável por processar informações de valência positiva (Zhang; Kim; Tonegawa, 2020) enquanto que Lay *et al.* (2022) observaram que a evocação de memórias de extinção não depende da ativação do engrama da BLA, mas sim do engrama encontrado na CeA. Tais diferenças podem ser explicadas devido às diferentes metodologias utilizadas por cada um dos grupos de pesquisa, pois enquanto Lay e colegas utilizaram o método de Daun02, Zhang e colaboradores inativaram os neurônios através da utilização de técnicas optogenéticas.

Permanece desafiador determinar definitivamente qual mecanismo governa primariamente a extinção de memórias aversivas, pois este processo é influenciado por vários fatores, incluindo a relação entre a força da memória e o protocolo de extinção (ou seja, tempo da sessão de extinção ou se a extinção é espaçada versus agrupada). Dependendo desses fatores, cada mecanismo pode operar simultaneamente ou sequencialmente para alcançar uma extinção bem-sucedida (Lee; Kaang, 2023). No entanto, baseado nas evidências de retorno do medo geradas através dos testes de *renewal*, *reinstatement* e recuperação espontânea do medo, assim como nos resultados observados nesse trabalho, acreditamos que as memórias de extinção sejam formadas através da criação de uma nova

memórias que inibe a atividade da memória original de medo.

Como foi observado que na BLA são encontrados neurônios que codificam tanto a informação aversiva, quanto da memória de extinção (Herry *et al.*, 2008) acreditamos que a presença de ambos os grupos celulares na BLA poderia explicar o fato de não termos conseguido dissociar estes engramas durante nossos experimentos, pois ambos os grupos neuronais podem estar sendo ativados, expressando c-Fos, e, conseqüentemente, sendo apagados durante o processo. Outra hipótese que poderia explicar nosso resultado seria a de que o engrama da BLA não é necessário para a evocação de memórias de extinção. Este achado vai de acordo com os resultados relatados por Lay *et al.* (2022), que observaram que a evocação de memórias de extinção não depende da ativação do engrama da BLA, mas sim do engrama encontrado na CeA.

Demonstramos também que o engrama do PL não é necessário para a evocação de memórias recentes (Capítulo II, Figura 1). No entanto, para a recuperação de memórias contextuais com 30 dias, a atividade do engrama do PL torna-se crucial (Capítulo II, Figura 2). Do mesmo modo, observamos que os neurônios que constituem esse engrama são alocados durante o processo de aquisição da memória. A eliminação desses neurônios após a aquisição da memória perturba significativamente a evocação destas informações após a consolidação sistêmica.

Sabemos que após a aquisição, o engrama cortical passa por um período de maturação antes de se tornar totalmente funcional. Durante essa fase de maturação, os neurônios hipocampais são responsáveis por manter a memória até que o engrama cortical esteja plenamente funcional (Kitamura *et al.*, 2017). Após a consolidação sistêmica, regiões corticais, como o PL, assumem a responsabilidade pela manutenção da memória (Frankland; Bontempi, 2005). A teoria dos múltiplos traços sugere que durante a consolidação sistêmica o engrama hipocampal não é substituído pelo cortical, mas que ambas os engramas estão em contínuo intercâmbio (Goshen *et al.*, 2011; Tonegawa; Morrissey; Kitamura, 2018). De fato, foi demonstrado que a atividade do PL é necessária no momento da aquisição para que os neurônios desta estrutura passem pelo processo de *tagging* e sejam capazes de armazenar essas informações. Silenciar a atividade neuronal durante o período inicial pós-aprendizado prejudica a evocação da memória remota, indicando que a atividade cortical precoce é necessária para a subsequente maturação e estabilização da memória (Lesburguères *et al.*, 2011).

A atividade do PL também se faz necessária no momento da aquisição devido a suas conexões diretas com os neurônios de medo do núcleo basal da BLA. As conexões

recíprocas que ambas as estruturas possuem funcionam com forma de amplificar o sinal aversivo (Rudy, 2014). Uma vez codificado o evento aversivo, se a eliminação do engrama do PL for realizada enquanto outras estruturas podem sustentar essas informações, um efeito compensatório pode ser gerado, como no caso do nosso experimento do Capítulo II, Figura 1, onde nenhum dano é observado, porém quando o PL se torna responsável pela manutenção dessa memória, observamos prejuízos (Capítulo II, Figura 2). Sendo assim, a eliminação do engrama do PL após a aquisição da memória prejudica a evocação de memórias contextuais remotas.

Descobertas recentes evidenciam que neurônios do PL são recrutados após o condicionamento aversivo e são seletivamente ativados para a expressão da memória aversiva (Cummings *et al.*, 2022; Cummings; Clem, 2020). Da mesma forma, Dixsaut e Gräff demonstram o papel essencial do PL durante a codificação da memória e sua atuação na evocação de memórias remotas (Dixsaut; Gräff, 2022).

Vale destacar que foi demonstrado que a atividade do PL é necessária para a expressão, mas não para a codificação do medo condicionado (Corcoran; Quirk, 2007), indo de encontro com os nossos resultados. No entanto, diferentemente dos nossos experimentos, Corcoran e Quirk (2007) demonstraram que tanto o tom quanto o contexto foram afetados durante a evocação da memória. É importante salientar que o protocolo utilizado pelos autores pode ser considerado extremamente forte, pois a duração do choque foi de cinco segundos pareados com sete tons, representando um treino mais intenso em comparação com o nosso (choque de 0,5mA com duração de um segundo e pareado com três tons). Essas diferenças de protocolos podem gerar resultados variáveis. De todo modo, nossos resultados corroboram com a teoria dos múltiplos traços, demonstrando que a ativação do engrama formado no HPC durante o protocolo de CAT se faz necessário para a evocação da memória somente alguns dias após o treino e não mais após várias semanas.

Tendo em vista que o engrama de uma memória pode envolver interações entre populações neuronais de várias regiões cerebrais (Roy *et al.*, 2019) é importante notar que cada estrutura possui um grau de especialização na codificação de informações específicas dentro dessa ampla rede. Sabemos que o HPC desempenha um papel crucial na evocação de componentes espaciais e contextuais das memórias, reativando os padrões de atividade cortical observados durante o aprendizado (Tanaka *et al.*, 2014). Memórias, especialmente aquelas com algum componente contextual, passam pelo processo de consolidação sistêmica. Portanto, enquanto o engrama cortical passa por um período de maturação antes de se tornar totalmente funcional, a memória formada durante uma tarefa de condicionamento aversivo é

mais dependente do HPC e pode ser evocada alguns dias após a aquisição. Com o passar do tempo, ocorre o processo de consolidação sistêmica e é possível observar os prejuízos na evocação da memória, quando as informações contextuais não podem mais ser recuperadas, pois as vias como PL para acessar essas informações já não estão mais disponíveis, uma vez que o engrama foi eliminado durante a consolidação.

Nosso desenho experimental envolve a administração de Daun02 90 minutos após o término do experimento comportamental. Este intervalo de tempo é estrategicamente escolhido para garantir que a expressão de c-Fos esteja em seus níveis mais altos durante a tarefa comportamental, levando a expressão de β -gal. A eficácia do método Daun02 é avaliada três dias após a infusão, permitindo tempo suficiente para que os neurônios que expressam β -gal sejam inativados. Este período de tempo é uma prática padrão baseada em estudos anteriores (Bossert *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2014; Koya *et al.*, 2009; Lay *et al.*, 2022; Pfarr *et al.*, 2015). É importante destacar que nosso protocolo é baseado no modelo descrito e já validado nos estudos citados anteriormente.

Os níveis mais baixos de neurônios β -gal+ (neurônios que expressam β -gal) encontrados durante as Imunohistoquímicas (Capítulo I, Figuras 1 e 3) poderiam ser potencialmente interpretados como uma menor ativação neuronal durante o treino/teste, ao invés de um resultado de eliminação neuronal. De fato, duas hipóteses sobre os mecanismos pelos quais a daunorrubicina atua nos neurônios foram propostas: silenciamento temporário ou, alternativamente, inativação permanente por meio da morte neuronal via apoptose. Para validar a especificidade da inativação por Daun02, Pfarr *et al.* (2015) conduziram um experimento crucial. Neste experimento, a coloração de Fluor Jade-B foi empregada para comparar os resultados entre ratos pCAG-LacZ (linhagem de ratos expressando β -gal constitutivamente sob o promotor pCAG) e ratos c-Fos-LacZ. Foi encontrado um sinal fluorescente robusto em toda a área encefálica dos ratos pCAG-LacZ infundidos, indicando um extenso dano celular após infusões de Daun02, que foi evitado pela co-infusão de Z-VAD-FMK, um inibidor de caspase (proteases capazes de clivar outras proteínas). Em contraste, em ratos c-Fos-LacZ, usando uma quantidade equivalente de Daun02, foi observado um padrão disperso do sinal fluorescente. Esse padrão alinhava-se com a distribuição de células c-Fos+ (células que expressam c-fos) na região, demonstrando a especificidade do método Daun02. Importante destacar que nenhum sinal fluorescente visível foi detectado após a administração de veículo em animais c-Fos-LacZ (Pfarr *et al.*, 2015).

Além do mais, durante o experimento de Pfarr *et al.* (2015), foi observada a co-localização induzida de c-Fos e β -gal em neurônios do córtex pré-frontal medial.

Administrações subsequentes de Daun02 no IL após a sessão resultaram em uma diminuição significativa nas células β -gal+ nesta região. Essa observação fornece evidências de que a transcrição de β -gal depende da ativação de c-Fos. Além do mais, a diminuição subsequente significativa de células β -gal-positivas após as infusões de Daun02 no IL evidenciam o mecanismo de ação do Daun02 por meio da indução de apoptose nos neurônios-alvo.

LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Uma grande dificuldade que impactou consideravelmente a condução deste estudo foi a pandemia do COVID ocorrida entre os anos de 2020 e 2022. Essa crise afetou diretamente nossa capacidade de realizar os experimentos comportamentais, resultando na paralisação da coleta de dados. Após o retorno gradual ao ambiente laboratorial, a produção de novos animais para os experimentos demandou alguns meses até alcançarmos um número amostral adequado, o que implicou que os experimentos mais significativos só puderam ser retomados em 2023, deixando menos de dois anos para o término do prazo para a conclusão deste doutorado. Esse período reduzido para a realização dos experimentos resultou na impossibilidade de conduzir muitos deles, replicar resultados ou explorar os dados conforme planejado.

Além das limitações temporais, também enfrentamos limitações técnicas. A utilização de animais c-Fos-LacZ, que emprega o gene c-fos como promotor para marcar as células a serem eliminadas, pode ter comprometido a especificidade celular e dificultado a diferenciação dos engramas de reconsolidação e extinção na BLA, onde não obtivemos resultados significativos na eliminação do engrama de extinção. Assim, a utilização de técnicas com uma maior especificidade celular poderia gerar resultados mais robustos na busca por essas respostas. O aperfeiçoamento das técnicas de imunohistoquímica e outras estratégias para auxiliar na comprovação do técnica utilizada também poderiam ser úteis para dar força aos resultados.

Portanto, a implementação de técnicas com maior especificidade celular e o aumento do número amostral experimental poderiam fortalecer nossas conclusões, proporcionando uma maior robustez estatística aos resultados. Além disso, a realização de mais experimentos explorando alguns resultados e a adição de alguns controles pode reforçar muitas conclusões alcançadas neste trabalho.

Os resultados obtidos no segundo capítulo deste trabalho, relativos a consolidação de memórias recentes e remotas também precisam ser melhor explorados para a confirmação

dos resultados, para tanto o número amostral precisa ser aumentado. O estudo também se beneficiaria de uma replicação dos experimentos para a confirmação dos resultados, sendo interessante que os mesmos fossem realizados utilizando machos e fêmeas separadamente, pois apesar de os efeitos estressores serem semelhantes em machos e fêmeas (Hassien *et al.*, 2020) é interessante confirmar que não há diferenças comportamentais entre os dois grupos de animais, visto que a expressão de medo entre ambos os sexos pode ser diferente (Gazarini; Stern; Bertoglio, 2023).

5. CONCLUSÕES

Podemos destacar os seguintes achados:

Capítulo I

1. Validamos a eficácia da técnica Daun02 na eliminação de neurônios que expressam β -gal, evidenciada pela quantificação dos níveis dessa enzima na BLA. Os animais do grupo D+ apresentaram redução nos níveis de β -gal em comparação com os grupos V+, enquanto os animais dos grupos D- e V-, como esperado, não expressaram β -gal;
2. A eliminação dos neurônios ativos na BLA durante a aquisição de uma memória aversiva é capaz de eliminar o engrama da memória aversiva;
3. Uma exposição curta ao estímulo condicionado ativa o mesmo engrama de medo previamente consolidado na BLA;
4. Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão da memória após uma sessão curta de extinção na BLA, mesmo após a eliminação do engrama de extinção nos animais;
5. Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão da memória após uma sessão longa de extinção na BLA, mesmo após a eliminação do engrama de extinção nos animais;
6. A infusão de Daun02 na BLA dos animais não impediu a expressão de medo após uma sessão de re-treino realizada após o teste da extinção;
7. A quantificação dos níveis de β -gal no córtex IL demonstrou que os animais do grupo D+ expressam níveis menores de β -gal em comparação com os grupos V+, enquanto os animais dos grupos D- e V-, conforme esperado, não expressaram β -gal;
8. A eliminação de neurônios após a reconsolidação de memórias no córtex IL não afeta o engrama da memória aversiva;
9. A eliminação de neurônios após uma sessão longa de extinção de memórias no córtex IL faz com que a expressão do medo condicionado retorne;

Capítulo II

10. A eliminação dos neurônios ativos no córtex PL durante a aquisição de uma memória aversiva não influencia na expressão da memória durante um teste de memória recente;
11. A eliminação dos neurônios ativos no córtex PL durante a aquisição de uma memória aversiva impede a expressão da informação contextual da memória durante um teste de

memória remota. Além disso, este engrama é formado durante o período de consolidação da memória.

Dessa forma, este estudo fornece detalhes importantes sobre os mecanismos neurais subjacentes às memórias aversivas e de extinção, destacando o complexo equilíbrio desses processos em diferentes estruturas encefálicas. Nossos resultados são relevantes para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas voltadas para a supressão do medo por meio de técnicas que visem suprimir a reconsolidação ou fortalecer a extinção de memórias patológicas, auxiliando na elucidação das estruturas envolvidas em cada processo. Para futuras investigações, recomendamos a utilização de números amostrais maiores e metodologias ainda mais avançadas que possam validar e expandir nossos achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, Kareem *et al.* Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. **Science**, [s. l.], v. 360, n. 6394, p. 1227–1231, 2018.

AMANO, Taiju; UNAL, Cagri T.; PARÉ, Denis. Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 489–494, 2010.

AN, Bobae *et al.* Amount of fear extinction changes its underlying mechanisms. **eLife**, [s. l.], v. 6, p. 1–21, 2017.

ANAGNOSTARAS, Stephan G.; MAREN, Stephen; FANSELOW, Michael S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: Within-subject examination. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 1106–1114, 1999.

BALDI, Elisabetta; BUCHERELLI, Corrado. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 53, p. 160–190, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.003>.

BANNERMAN, D. M. *et al.* Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.

BASHIR, Zafar Iqbal; BANKS, Paul James. Dead or alive? The manipulation of neuronal ensembles and pathways by daunorubicin. **Brain and Neuroscience Advances**, [s. l.], v. 1, p. 239821281772822, 2017.

BERLAU, Daniel J.; MCGAUGH, James L. Enhancement of extinction memory consolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 123–132, 2006.

BJÖRKSTRAND, Johannes *et al.* Disrupting Reconsolidation Attenuates Long-Term Fear Memory in the Human Amygdala and Facilitates Approach Behavior. **Current Biology**, [s. l.], v. 26, n. 19, p. 2690–2695, 2016.

BLANCHARD, D. Caroline; BLANCHARD, Robert J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 281–290, 1972.

BOCCHIO, Marco; NABAVI, Sadegh; CAPOGNA, Marco. Synaptic Plasticity, Engrams, and Network Oscillations in Amygdala Circuits for Storage and Retrieval of Emotional Memories. **Neuron**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 731–743, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.022>.

BOSCH, Miquel *et al.* Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. **Neuron**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 444–459, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>.

BOSSERT, Jennifer M. *et al.* Ventral medial prefrontal cortex neuronal ensembles mediate context-induced relapse to heroin. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 420–422, 2011.

BURGOS-ROBLES, Anthony; VIDAL-GONZALEZ, Ivan; QUIRK, Gregory J. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 26, p. 8474–8482, 2009.

CAIN, Christopher K; BLOUIN, Ashley M; BARAD, Mark. Temporally Massed CS Presentations Generate More Fear Extinction Than Spaced Presentations. [s. l.], v. 29, n. 4, p. 323–333, 2003.

CASAGRANDE, Mirelle A. *et al.* Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 150, p. 42–47, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.03.002>.

CASSINI, Lindsey F. *et al.* Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. **Hippocampus**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 931–941, 2013.

CHO, Jun-hyeong Hyeong; DEISSEROTH, Karl; BOLSHAKOV, Vadim Y. Synaptic encoding of fear extinction in mPFC-amygdala circuits. **Neuron**, [s. l.], v. 80, n. 6, p. 1491–1507, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.025>.

CHOI, Jun Hyeok *et al.* Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. **Science**, [s. l.], v. 360, n. 6387, p. 430–435, 2018.

CHOI, Dong Il *et al.* Synaptic correlates of associative fear memory in the lateral amygdala. **Neuron**, [s. l.], v. 109, n. 17, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.07.003>.

CIOCCHI, Stephane *et al.* Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. **Nature**, [s. l.], v. 468, n. 7321, p. 277–282, 2010.

CIOCCHI, S *et al.* Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons1. Cioocchi, S., Passecker, J., Mikus, N. & Klausberger, T. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. 1., **Science Reports**, [s. l.], v. 1, n. 6234, 2015.

CLEM, Roger L.; SCHILLER, Daniela. New Learning and Unlearning: Strangers or Accomplices in Threat Memory Attenuation?. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 340–351, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2016.03.003>.

CORCORAN, Kevin A.; QUIRK, Gregory J. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 840–844, 2007.

CRUZ, Fabio C. *et al.* New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 743–754, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3597>.

CRUZ, Fabio C. *et al.* Role of Nucleus Accumbens Shell Neuronal Ensembles in Context-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 22, p. 7437–7446, 2014.

CRUZ, Fabio C.; JAVIER RUBIO, F.; HOPE, Bruce T. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. **Brain Research**, [s. l.], v. 1628, n. A, p. 157–173, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.005>.

CUMMINGS, Kirstie A. *et al.* Control of fear by discrete prefrontal GABAergic populations encoding valence-specific information. **Neuron**, [s. l.], p. 1–17, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.004>.

CUMMINGS, Kirstie A.; CLEM, Roger L. Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 61–74, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0552-7>.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al.* OPPOSITE ACTION OF HIPPOCAMPAL CB1 RECEPTORS IN MEMORY RECONSOLIDATION AND EXTINCTION. **Neuroscience**, [s.l.], v. 154, p. 1648–1655, 2008.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al.* Periodically Reactivated Context Memory Retains Its Precision and Dependence on the Hippocampus. **Hippocampus**, [s. l.], v. 000, p. 3–6, 2011.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas *et al.* Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**, [s. l.], v. 244, n. April, p. 42–48, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas; DO-MONTE, Fabricio H. Understanding the dynamic and destiny of memories. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 125, p. 592–607, 2021.

DENARDO, Laura A. *et al.* Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 460–469, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0318-7>.

DENNY, Christine A. *et al.* Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. **Neuron**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 189–201, 2014.

DI CIANO, P. *et al.* Role of the prelimbic cortex in the acquisition, re-acquisition or persistence of responding for a drug-paired conditioned reinforcer. **Neuroscience**, [s. l.], v. 150, n. 2, p. 291–298, 2007.

DIXSAUT, Lucie; GRÄFF, Johannes. Brain-wide screen of prelimbic cortex inputs reveals a functional shift during early fear memory consolidation. **eLife**, [s. l.], v. 11, p. 1–19, 2022.

DUDAI, Yadin. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. **Annu. Rev. Psychol.**, [s. l.], v. 55, p. 51–86, 2004.

DUDAI, Yadin; KARNI, Avi; BORN, Jan. The Consolidation and Transformation of Memory. **NEURON**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 20–32, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>.

EBBINGHAUS, H. **Memory: A contribution to experimental psychology**. [S. l.]:

Teachers College Press., 1913.

EFFTING, M., & KINDT, M. Contextual control of human fear associations in a renewal paradigm. **Behaviour Research and Therapy**, 45(9), 2002–2018, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2007.02.011>

EICHENBAUM, Howard. Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 109–120, 2004.

FAN, Xiaocen *et al.* Noradrenergic signaling mediates cortical early tagging and storage of remote memory. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–15, 2022.

FRANK, Adam C. *et al.* Hotspots of dendritic spine turnover facilitate clustered spine addition and learning and memory. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02751-2>.

FRANKLAND, Paul W. *et al.* Stability of recent and remote contextual fear memory. **Learning and Memory**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 451–457, 2006.

FRANKLAND, Paul W.; BONTEMPI, Bruno. The organization of recent and remote memories. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 119–130, 2005.

FURINI, Cristiane; MYSKIW, Jociane; IZQUIERDO, Ivan. The learning of fear extinction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 47, p. 670–683, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.016>.

GANELLA, Despina E. *et al.* Neurocircuitry of fear extinction in adult and juvenile rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 351, n. May, p. 161–167, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.001>.

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

GIANNOTTI, Giuseppe *et al.* Prefrontal cortex neuronal ensembles encoding fear drive fear expression during long-term memory retrieval. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

GILBOA, Asaf; MOSCOVITCH, Morris. No consolidation without representation: Correspondence between neural and psychological representations in recent and remote memory. **Neuron**, [s. l.], v. 109, n. 14, p. 2239–2255, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.04.025>.

GIUSTINO, Thomas F.; MAREN, Stephen. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. NOVEMBER, p. 1–20, 2015.

GOGOLLA, N., CARONI, P., LÜTHI, A., & HERRY, C. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. **Science**, 325(5945), 1258–1261, 2009. <https://doi.org/10.1126/science.1174146>

GOOSENS, Ki A.; HOBIN, Jennifer A.; MAREN, Stephen. Auditory-Evoked Spike Firing

in the Lateral Amygdala and Pavlovian Fear Conditioning: Mnemonic Code or Fear Bias?. **Neuron**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1013–1022, 2003.

GORE, Felicity *et al.* Neural Representations of Unconditioned Stimuli in Basolateral Amygdala Mediate Innate and Learned Responses. **Cell**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 134–145, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.027>.

GOSHEN, Inbal *et al.* Dynamics of retrieval strategies for remote memories. **Cell**, [s. l.], v. 147, n. 3, p. 678–689, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.033>.

GULMEZ KARACA, Kubra; KUPKE, Janina; OLIVEIRA, Ana M.M. Molecular and cellular mechanisms of engram allocation and maintenance. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 170, n. October 2020, p. 274–282, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.02.019>.

GUSKJOLEN, Axel; CEMBROWSKI, Mark S. Engram neurons: Encoding, consolidation, retrieval, and forgetting of memory. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 3207–3219, 2023.

HAMMACK, Robert J. *et al.* Anterior basolateral amygdala neurons comprise a remote fear memory engram. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 17, n. April, 2023.

HAN, Jin-Hee *et al.* Selective Erasure of a Fear Memory. **Science**, [s. l.], v. 1, n. March, p. 1492–1496, 2009.

HAN, Dae Hee *et al.* The essence of the engram: Cellular or synaptic? **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 125, n. April 2021, p. 122–135, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.05.033>.

HASSIEN, A. M. *et al.* A mouse model of stress-enhanced fear learning demonstrates extinction-sensitive and extinction-resistant effects of footshock stress. **Behavioural Brain Research**, v. 379, n. October 2019, p. 112391, 2020.

HAWKINS, Robert D.; BYRNE, John H. Associative learning in invertebrates. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1–18, 2015.

HEBB, D. O. **The organization of behavior; a neuropsychological theory**. [S. l.]: Wiley, 1949.

HERNANDEZ, Pepe J; ABEL, Ted. The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 89, p. 293–311, 2008.

HERRY, Cyril *et al.* Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. **Nature**, [s. l.], v. 454, n. 7204, p. 600–606, 2008.

HERRY, Cyril; JOHANSEN, Joshua P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1644–1654, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3869>.

HIGGINBOTHAM, Jessica A. *et al.* Basolateral amygdala CB1 receptors gate HPA axis activation and context-cocaine memory strength during reconsolidation.

Neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 1554–1564, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-020-00919-x>.

HOLLAND, Peter C.; BOUTON, Mark E. Hippocampus and context in classical conditioning. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 195–202, 1999.

HONG, I. *et al.* AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 20, p. 8218–8223, 2013. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1305235110>.

HONG, Ingie *et al.* Extinction of cued fear memory involves a distinct form of depotentiation at cortical input synapses onto the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 2089–2099, 2009.

IZQUIERDO, Iván *et al.* The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 115–127, 2008.

JANAK, Patricia H.; TYE, Kay M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, [s. l.], v. 517, n. 7534, p. 284–292, 2015.

JASNOW, Aaron M. *et al.* Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 821–835, 2017.

JONES, Roland S.G. Synaptic and intrinsic properties of neurons of origin of the perforant path in layer II of the rat entorhinal cortex in vitro. **Hippocampus**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 335–353, 1994.

JOSELYN, Sheena A.; FRANKLAND, Paul W. Memory Allocation: Mechanisms and Function. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 41, p. 389–413, 2018.

JOSELYN, Sheena A.; KÖHLER, Stefan; FRANKLAND, Paul W. Finding the engram. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 521–534, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn4000>.

JOSELYN, Sheena A.; TONEGAWA, Susumu. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. **Science**, [s. l.], v. 367, n. 6473, 2020.

JUNG, Jung Hoon *et al.* Examining the engram encoding specificity hypothesis in mice. **Neuron**, [s. l.], v. 111, p. 1–16, 2023. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36990091>.

KANDEL, Eric R. *et al.* **Principles of neural science**. [S. l.: s. n.], 2021. *E-book*. Disponível em: www.mhprofessional.com.

KASUGAI, Yu *et al.* Structural and Functional Remodeling of Amygdala GABAergic Synapses in Associative Fear Learning. **Neuron**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 781–794.e4, 2019.

KESSLER, Ronald C. *et al.* Trauma and PTSD in the WHO World Mental Health Surveys. **European Journal of Psychotraumatology**, [s. l.], v. 8, 2017.

KHALAF, Ossama; GRÄFF, Johannes. Reactivation of Recall-Induced Neurons in the Infralimbic Cortex and the Basolateral Amygdala After Remote Fear Memory Attenuation. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. April, p. 1–8, 2019.

KIM, Jeongyeon *et al.* Amygdala depotentiation and fear extinction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 104, n. 52, p. 20955–20960, 2007.

KIM, Joshua *et al.* Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1636–1646, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4414>.

KITAMURA, Takashi *et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science**, [s. l.], v. 356, n. 6333, p. 73–78, 2017.

KNIERIM, James J. The hippocampus. **Current Biology**, [s. l.], v. 25, n. 23, p. R1116–R1121, 2015.

KOYA, Eisuke *et al.* Targeted disruption of cocaine-activated nucleus accumbens neurons prevents context-specific sensitization. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1069–1073, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2364>.

KOYA, Eisuke; MARGETTS-SMITH, Gabriella; HOPE, Bruce T. Daun02 Inactivation of Behaviorally Activated Fos-Expressing Neuronal Ensembles. **Current Protocols in Neuroscience**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 8.36.1-8.36.17, 2016.

KUKUSHKIN, Nikolay Vadimovich; CAREW, Thomas James. Memory Takes Time. **Neuron**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 259–279, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.029>.

LACAGNINA, Anthony F. *et al.* Distinct hippocampal engrams control extinction and relapse of fear memory. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 22, p. 753–761, 2019. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41593-019-0361-z>.

LAI, Cora Sau Wan; ADLER, Avital; GAN, Wen Biao. Fear extinction reverses dendritic spine formation induced by fear conditioning in the mouse auditory cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 115, n. 37, p. 9306–9311, 2018.

LAU, Jocelyn M.H. *et al.* The role of neuronal excitability, allocation to an engram and memory linking in the behavioral generation of a false memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 174, n. August, p. 107284, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107284>.

LAURENT, Vincent; MARCHAND, Alain R.; WESTBROOK, R. Frederick. The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear. **Learning & memory**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 304–314, 2008.

LAY, Belinda P.P. *et al.* The Recruitment of a Neuronal Ensemble in the Central Nucleus of the Amygdala During the First Extinction Episode Has Persistent Effects on Extinction Expression. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1–9, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2022.07.021>.

LE MERRE, Pierre; ÄHRLUND-RICHTER, Sofie; CARLÉN, Marie. The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. **Neuron**, [s. l.], v. 109, n. 12, p. 1925–1944, 2021.

LEDoux, Joseph E. *et al.* The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1062–1069, 1990.

LEE, Jonathan L C. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 4, n. November, p. 1–10, 2010.

LEE, Ji Hye *et al.* Neocortical synaptic engrams for remote contextual memories. **Nature Neuroscience**, [s. l.], 2022.

LEE, Hoonwon; KAANG, Bong Kiun. How engram mediates learning, extinction, and relapse. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 81, p. 102723, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102723>.

LEE, Jonathan L C; NADER, Karim; SCHILLER, Daniela. An Update on Memory Reconsolidation Updating. **Trends in Cognitive Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 531–545, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2017.04.006>.

LESBURGUÈRES, Edith *et al.* Early Tagging of Cortical Networks of Enduring Associative Memory. **Science**, [s. l.], v. 331, n. February, p. 924–929, 2011.

LIU, Xu *et al.* Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. **Nature**, [s. l.], v. 484, n. 7394, p. 381–385, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11028>.

LOPEZ, Joëlle *et al.* Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 2465–2475, 2015.

LUNARDI, Paula *et al.* Effects of Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 958–967, 2018.

MAITI, Panchanan; MANNA, Jayeeta; MCDONALD, Michael P. Merging advanced technologies with classical methods to uncover dendritic spine dynamics: A hot spot of synaptic plasticity. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 96, p. 1–13, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2015.02.007>.

MALVAEZ, Melissa *et al.* Distinct cortical–amygdala projections drive reward value encoding and retrieval. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 762–769, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0374-7>.

MAMIYA, Nori *et al.* Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 402–413, 2009.

MANOOCHERI, Kasra; CARTER, Adam G. Rostral and caudal basolateral amygdala engage distinct circuits in the prelimbic and infralimbic prefrontal cortex. **eLife**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1–23, 2022.

MCDONALD, Alexander J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 257–332, 1998.

MCGAUGH, James L. Memory - A century of consolidation. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MCGAUGH, James L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. **Science**, [s. l.], v. 153, p. 1351–1358, 1966.

MERLO, E. *et al.* Reconsolidation and Extinction Are Dissociable and Mutually Exclusive Processes: Behavioral and Molecular Evidence. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 2422–2431, 2014.

MERLO, Emiliano; MILTON, Amy L.; EVERITT, Barry J. A Novel Retrieval-Dependent Memory Process Revealed by the Arrest of ERK1/2 Activation in the Basolateral Amygdala. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 38, n. 13, p. 3199–3207, 2018.

MILEKIC, Maria H.; ALBERINI, Cristina M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 521–525, 2002.

MINATOHARA, Keiichiro; AKIYOSHI, Mika; OKUNO, Hiroyuki. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. JAN2016, p. 1–11, 2016.

MONFILS, Marie H.; TESKEY, G. Campbell. Induction of long-term depression is associated with decreased dendritic length and spine density in layers III and V of sensorimotor neocortex. **Synapse**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 114–121, 2004.

MORRIS, Richard G.M. *et al.* Memory Reconsolidation: Sensitivity of Spatial Memory to Inhibition of Protein Synthesis in Dorsal Hippocampus during Encoding and Retrieval. **Neuron**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 479–489, 2006.

MORRISON, Dano J. *et al.* Parvalbumin interneurons constrain the size of the lateral amygdala engram. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 135, p. 91–99, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.07.007>.

MOSCOVITCH, Morris; GILBOA, Asaf. Has the concept of systems consolidation outlived its usefulness? Identification and evaluation of premises underlying systems consolidation. **Faculty Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 33, 2022.

NABAVI, Sadegh *et al.* Engineering a memory with LTD and LTP. **Nature**, [s. l.], v. 511, n. 7509, p. 348–352, 2014.

NADER, Karim. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. a021782, p. 1–16, 2015.

NADER, Karim; SCHAFE, Glenn E.; LEDOUX, Joseph E. The labile nature of consolidation theory. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 1, n. December, p. 216–219,

2000. Disponível em: www.nature.com/reviews/neuro.

NAMBURI, Praneeth *et al.* A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. **Nature**, [s. l.], v. 520, n. 7549, p. 675–678, 2015.

NAMBURI, Praneeth *et al.* A Circuit Mechanism for Differentiating Positive and Negative Associations. **Nature**, [s. l.], v. 520, n. 7549, p. 675–678, 2015.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 171–175, 1971. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915>.

PAPE, Hans-Christian; PARE, Denis. Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. **Physiol Rev.**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 419–463, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex**. [S. l.]: Oxford Univ. Press., 1927.

PEARCE, John M; BOUTON, Mark E. Theories of associative learning. **Annu. Rev. Psychol.**, [s. l.], v. 52, n. 111, p. 39, 2001.

PEDRAZA, Lizeth K. *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**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 362–371, 2016.

PEDREIRA, María Eugenia; MALDONADO, Héctor. Protein Synthesis Subverts Reconsolidation or Extinction. **Neuron**, [s. l.], v. 38, p. 863–869, 2003.

PEDREIRA, María Eugenia; PÉREZ-CUESTA, Luis María; MALDONADO, Héctor. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. **Learning and Memory**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 579–585, 2004.

PFARR, Simone *et al.* Losing Control: Excessive Alcohol Seeking after Selective Inactivation of Cue-Responsive Neurons in the Infralimbic Cortex. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 30, p. 10750–10761, 2015.

POPIK, Bruno *et al.* Calpain modulates fear memory consolidation, retrieval and reconsolidation in the hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 151, n. March, p. 53–58, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.04.002>.

POPIK, Bruno *et al.* Shifting from fear to safety through deconditioning-update. **eLife**, [s. l.], v. 9, p. 1–20, 2020.

QUIRK, Gregory J; MUELLER, Devin. Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 56–72, 2008.

QUIRK, Gregory J.; REPA, J. Christopher; LEDOUX, Joseph E. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: Parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 1029–1039, 1995.

RAMIREZ, Steve *et al.* Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. **Nature**, [s. l.], v. 522, n. 7556, p. 335–339, 2015.

RAMIREZ, Steve *et al.* Creating a false memory in the hippocampus. **Science**, [s. l.], v. 341, n. 6144, p. 387–391, 2013.

RASHID, Asim J. *et al.* Competition between engrams influences fear memory formation and recall. **Science**, [s. l.], v. 353, n. 6297, p. 383–387, 2016.

REDONDO, Jadier *et al.* Hippocampal HECT E3 ligase inhibition facilitates consolidation, retrieval, and reconsolidation, and inhibits extinction of contextual fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 167, n. July 2019, p. 107135, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107135>.

REDONDO, Roger L.; MORRIS, Richard G.M. Making memories last: The synaptic tagging and capture hypothesis. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 17–30, 2011.

RICHARDS, Blake A.; FRANKLAND, Paul W. The Persistence and Transience of Memory. **Neuron**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 1071–1084, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.037>.

RODRIGUEZ-ORTIZ, Carlos J. *et al.* Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 352–359, 2008.

ROESLER, Rafael *et al.* Amygdala-hippocampal interactions in synaptic plasticity and memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 184, n. May, p. 107490, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107490>.

ROGERSON, Thomas *et al.* Synaptic tagging during memory allocation. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 157–169, 2014.

ROUX, Candice M.; LEGER, Marianne; FRERET, Thomas. Memory disorders related to hippocampal function: The interest of 5-HT₄ receptor targeting. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, 2021.

ROY, Dheeraj *et al.* Brain-wide mapping of contextual fear memory engram ensembles supports the dispersed engram complex hypothesis. **bioRxiv**, [s. l.], p. 668483, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/668483>.

RUDY, Jerry W. **The Neurobiology of Learning and Memory**. [S. l.: s. n.], 2014.

SAJIKUMAR, S.; MORRIS, R. G. M.; KORTE, M. Competition between recently potentiated synaptic inputs reveals a winner-take-all phase of synaptic tagging and capture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 33, p. 12217–12221, 2014. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1403643111>.

SCHILLER, D., MONFILS, M. H., RAIIO, C. M., JOHNSON, D. C., LEDOUX, J. E., & PHELPS, E. A. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. **Nature**, 463(7277), 49–53, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature08637>

SEMON, Richard. **The mneme**. [S. l.]: London : Allen & Unwin, 1921.

SENN, Verena *et al.* Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. **Neuron**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 428–437, 2014.

SEVENSTER, Dieuwke; BECKERS, Tom; KINDT, Merel. Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. **Science**, [s. l.], v. 339, n. 6121, p. 830–833, 2013.

SHENG, Morgan; HOOGENRAAD, Casper C. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 76, p. 823–847, 2007.

SHINOHARA, Keisuke; YASOSHIMA, Yasunobu. Inactivation of the basolateral amygdala suppresses the expression of taste neophobia but not the retrieval process in attenuation of neophobia. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 372, n. February, p. 112010, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112010>.

SIERRA-MERCADO, Demetrio; PADILLA-COREANO, Nancy; QUIRK, Gregory J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 529–538, 2011.

SILVA, Bianca A.; BURNS, Allison M.; GRÄFF, Johannes. A cFos activation map of remote fear memory attenuation. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 236, n. 1, p. 369–381, 2019.

SINCLAIR, Alyssa H; BARENSE, Morgan D. Surprise and destabilize: Prediction error triggers episodic memory updating. **Learning & Memory**, [s. l.], v. 25, p. 369–381, 2018.

SOTRES-BAYON, Francisco *et al.* Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala Inputs. **Neuron**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 804–812, 2012.

SQUIRE, Larry R. **Memory and brain**. [S. l.]: Oxford University Press, 1987.

SQUIRE, Larry R. *et al.* Memory Consolidation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. a021766, p. 1–22, 2015.

SQUIRE, Larry R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 171–177, 2004.

STACHO, Martin; MANAHAN-VAUGHAN, Denise. The Intriguing Contribution of Hippocampal Long-Term Depression to Spatial Learning and Long-Term Memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. April, p. 1–15, 2022.

SUZUKI, Akinobu *et al.* Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 20, p. 4787–4795, 2004. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>.

TAKEHARA-NISHIUCHI, Kaori. Neurobiology of systems memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 6850–6863, 2021.

- TANAKA, Kazumasa Z. *et al.* Cortical Representations Are Reinstated by the Hippocampus during Memory Retrieval. **Neuron**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 347–354, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.037>.
- TOMAIUOLO, Micol *et al.* Evidence of Maintenance Tagging in the Hippocampus for the Persistence of Long-Lasting Memory Storage. **Neural Plasticity**, [s. l.], v. 2015, 2015.
- TONEGAWA, Susumu; MORRISSEY, Mark D; KITAMURA, Takashi. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. August, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41583-018-0031-2>.
- TORQUATTO, Kamilla Irigaray *et al.* Role of calcium-permeable AMPA receptors in memory consolidation, retrieval and updating. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 144, n. July 2018, p. 312–318, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.10.030>.
- TRIPATHI, Sunil Jamuna *et al.* Inactivation of basolateral amygdala prevents chronic immobilization stress-induced memory impairment and associated changes in corticosterone levels. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 142, p. 218–229, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2017.05.005>.
- TROUCHE, Stéphanie *et al.* Recoding a cocaine-place memory engram to a neutral engram in the hippocampus. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 564–567, 2016.
- TSE, Dorothy *et al.* Schema-Dependent Gene Activation. **Science Reports**, [s. l.], v. 9596, n. August, p. 891–896, 2011.
- VARGAS, Liane da Silva; LIMA, Karine Ramires; MELLO-CARPES, Pâmela B. Infralimbic and prelimbic prefrontal cortex activation is necessary to the enhancement of aversive memory extinction promoted by reactivation. **Brain Research**, [s. l.], v. 1770, n. March, p. 1–6, 2021.
- WANG, Szu Han; DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas; NADER, Karim. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 905–912, 2009.
- WINOCUR, Gordon; MOSCOVITCH, Morris; SEKERES, Melanie. Memory consolidation or transformation: Context manipulation and hippocampal representations of memory. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 555–557, 2007.
- WITTER, Menno P. *et al.* Architecture of spatial circuits in the hippocampal region. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, [s. l.], v. 369, n. 1635, p. 11–13, 2014.
- WITTER, Menno P. *et al.* Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. **Hippocampus**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 398–410, 2000.
- YANG, Ying; WANG, Jian-zhi. From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 11, n. October, p. 1–8, 2017.
- YIU, Adelaide P. *et al.* Neurons Are Recruited to a Memory Trace Based on Relative

Neuronal Excitability Immediately before Training. **Neuron**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 722–735, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.017>.

YU, Kai *et al.* Central Amygdala Somatostatin Neurons Gate Passive and Active Defensive Behaviors. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 36, n. 24, p. 6488–6496, 2016.

YUSTE, Rafael. Dendritic spines and distributed circuits. **Neuron**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 772–781, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.024>.

ZAKI, Yosif *et al.* Hippocampus and amygdala fear memory engrams re-emerge after contextual fear relapse. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 47, n. 11, p. 1992–2001, 2022.

ZHANG, Xiangyu; KIM, Joshua; TONEGAWA, Susumu. Amygdala Reward Neurons Form and Store Fear Extinction Memory. **Neuron**, [s. l.], v. 105, n. 6, p. 1077-1093.e7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.12.025>.

ZUBEDAT, Salman; AKIRAV, Irit. The involvement of cannabinoids and mTOR in the reconsolidation of an emotional memory in the hippocampal – amygdala – insular circuit. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 336–349, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.011>.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Resultados da infusão de Daun02 no Hipocampo dorsal. Dados não incorporados no corpo da tese por problemas metodológicos e baixo número amostral, assim optamos por deixá-los de fora da discussão.

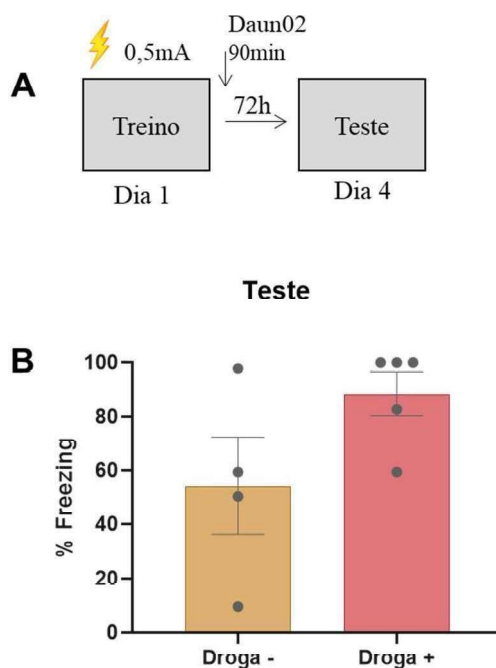


Figura 1: Consolidação de memória contextual no HPC. **A.** Desenho experimental. Os animais são treinados em um contexto onde recebem 2 choques de 0.5 mA e 90 minutos depois recebem a infusão de Daun02. Após 3 dias os animais são testados. **B.** Teste de medo ao contexto. As estatísticas não foram realizadas, pois o número amostral é baixo. Droga - (n=4); Droga + (n=5). Os resultados estão apresentados como média ± EPM.

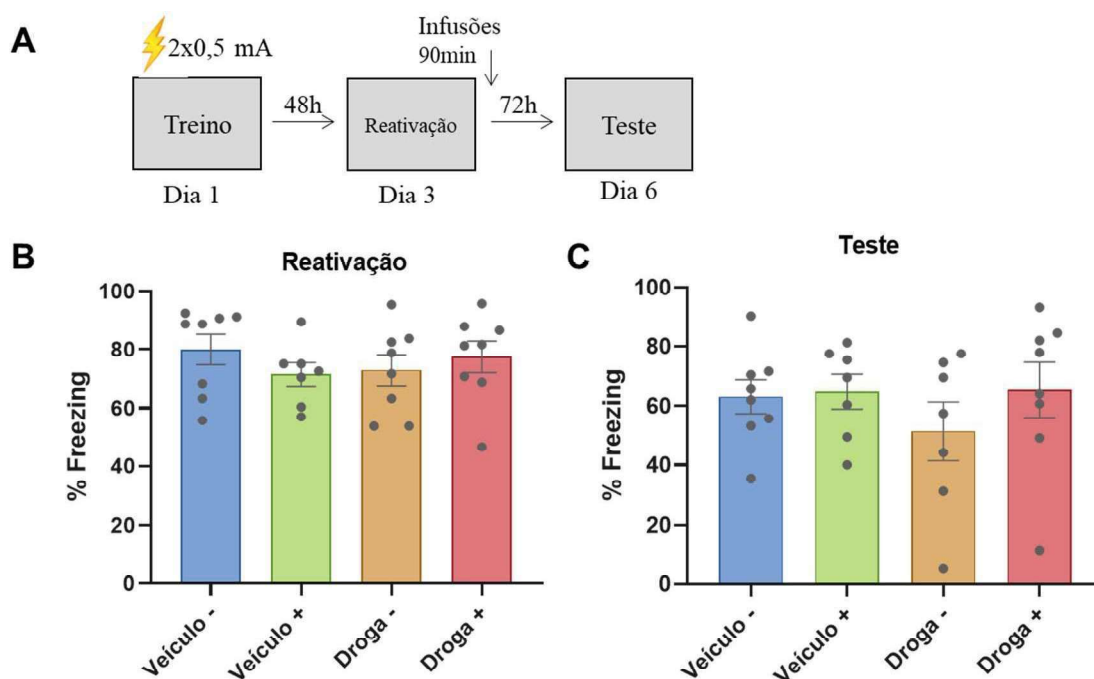


Figura 2: Reconsolidação de memória contextual no HPC. **A.** Desenho experimental. Os animais são treinados em um contexto onde recebem 2 choques de 0.5 mA. Após 48 horas os animais passam por uma sessão de reativação para induzir um processo de reconsolidação e 90 minutos depois recebem a infusão de Daun02. Após 3 dias os animais são testados. **B.** Freezing da sessão de reativação. **C.** Os níveis de freezing dos animais não demonstraram diferenças estatísticas após a infusão de Daun02. Veículo - (n=8); Veículo + (n=7); Droga - (n=7); Droga + (n=8). Os resultados estão apresentados como média ± EPM.

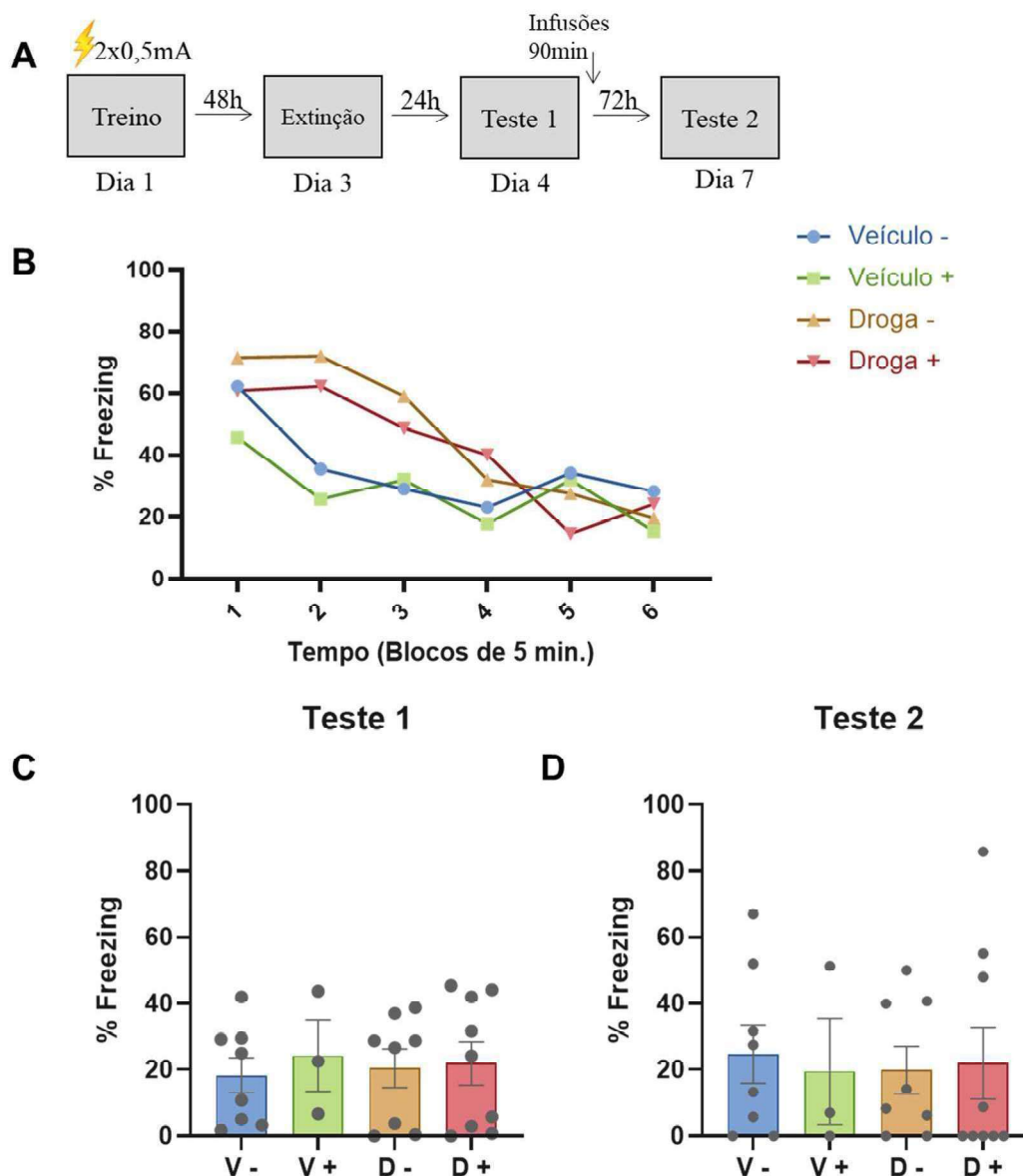


Figura 3: Extinção de memória contextual no HPC. **A.** Desenho experimental. Os animais são treinados em um contexto onde recebem 2 choques de 0.5 mA. Após 48 horas os animais passam por uma sessão de extinção, que consiste em apresentar o contexto por 30 minutos semreceber choque, e 90 minutos depois recebem a infusão de Daun02. Após 3 dias os animais são testados. **B.** Curva de extinção apresentada em blocos de 5 minutos. **C.** Freezing do teste 1. **D.** Teste 2. Os níveis de freezing dos animais não demonstraram diferenças estatísticas após a infusão de Daun02. Veículo - (n=8); Veículo + (n=3); Droga - (n=8); Droga + (n=9). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM.

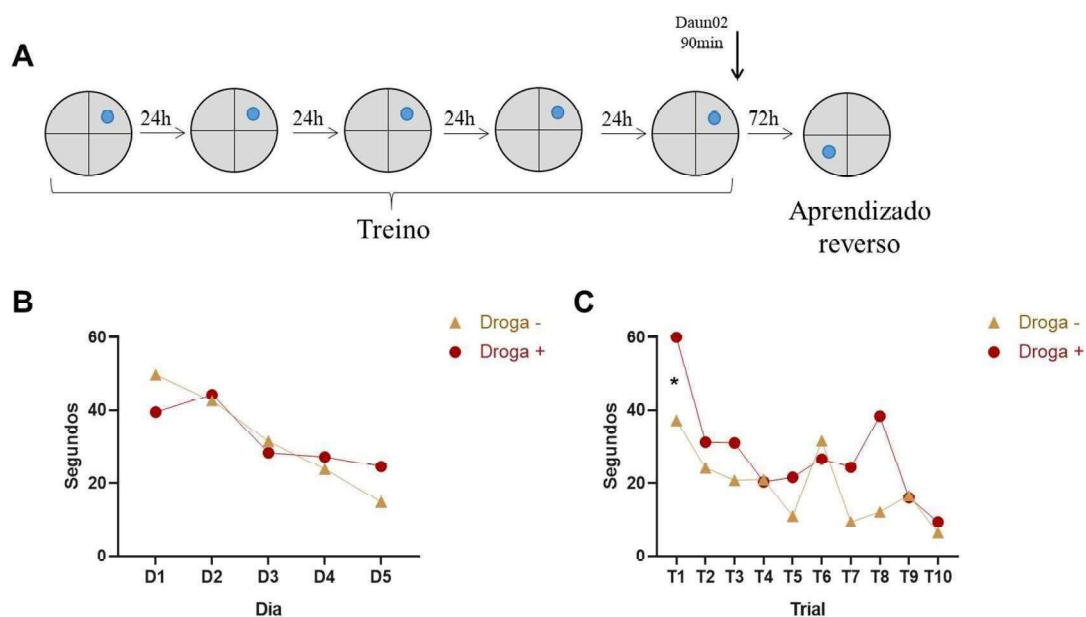


Figura 4: Aprendizado contextual avaliado através do Water Maze. **A.** Desenho experimental. Os animais são treinados para encontrarem uma plataforma submersa durante 5 dias e 90 minutos após o último treino recebem a infusão de Daun02. Após 3 dias os animais são testados e passam por uma sessão de aprendizado reverso em que a plataforma é colocada no quadrante oposto e os animais precisam aprender a nova localização. **B.** Curva de aprendizado apresentando a latência média para encontrar a plataforma de cada dia de treino. **C.** Curva demonstrando a latência para encontrar a plataforma apresentando a média de cada trial de 60 segundos, onde T1 representa a sessão de Teste em que os animais do grupo Droga + não conseguiram encontrar a plataforma dentro do tempo determinado sendo estatisticamente diferente do grupo Droga -. Droga - (n=5); Droga + (n=5). Teste t de Student ($P=0.0125$). Os resultados estão apresentados como média \pm EPM.

APÊNDICE B: Produções científicas durante o doutorado.

Distinct engrams control fear and extinction memory.

Jordana Griebler Luft, Bruno Popik, Débora Gonçalves, Fábio C Cruz, Lucas De Oliveira Alvares.

Manuscrito publicado no periódico *Hippocampus*

Qualis Ciências Biológicas II: A2

Naturalistic Housing Condition Promotes Behavioral Flexibility and Increases Resilience to Stress in Rats.

Nicoli Caratti, Ana Paula Crestani, Jordana Griebler Luft, Lucas de Oliveira Alvares. Manuscrito publicado no periódico *Behavioral Neuroscience*.

Qualis Ciências Biológicas II: A3

Probiotic supplementation facilitates memory updating and extinction in rats by the gut-brain-axis communication.

Débora Aguirre Gonçalves, Jordana Griebler Luft, Manuel Adrian Riveros Escalona, MicheleBertoni Mann, Jeverson Frazzon, Márcio Dorn, Lucas de Oliveira Alvares.

Manuscrito submetido ao periódico *Microbial Pathogenesis*

Qualis Ciências Biológicas II: A3

Molecular mechanisms underpinning deconditioning-update in fear memory.

Bruno Popik, Jordana Griebler Luft, Kétlyn Talise Knak Guerra, Lucas de Oliveira Alvares. Manuscrito publicado no periódico *Hippocampus*

Qualis Ciências Biológicas II: A2

Characterization of deconditioning-update on fear memory attenuation.

Bruno Popik, Kétlyn Talise Knak Guerra, Jordana Griebler Luft, Henrique Schaan Fernandes, Lucas de Oliveira Alvares.

Manuscrito publicado no periódico *Neurobiology of Learning and Memory*

Qualis Ciências Biológicas II: A1

Reduced Expression of Hippocampal GluN2A-NMDAR Increases Seizure Susceptibility and Causes Deficits in Contextual Memory.

Maria Florencia Acutain, Jordana Griebler Luft, Cecilia Alejandra Vazquez, Bruno Popik, Magalí C. Cercato, Alberto Epstein, Anna Salvetti, Diana A. Jerusalinsky, Lucas De Oliveira Alvares, Maria Verónica Baez.

Manuscrito publicado no periódico *Frontiers in Neuroscience*

Qualis Ciências Biológicas II: A2

ANEXO

ANEXO A: Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36550

Título: UTILIZANDO A TECNICA DE INATIVACAO POR DAUN02 PARA DETERMINAR A NATUREZA DO ENGRAMA DE DIFERENTES TIPOS DE MEMORIA

Vigência: 01/05/2019 à 30/12/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUCAS DE OLIVEIRA ALVARES - coordenador desde 01/05/2019
Jordana Griebler Luft - Aluno de Doutorado desde 01/05/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 13/05/2019 - Sala 223 do Prédio do Instituto de ciências Básicas da Saúde - ICBS - Campus Centro UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 375 ratos, machos e fêmeas, da linhagem transgênica Fos-lacZ, com idade aproximada de 60 dias e pesando entre 250 e 300 g, provenientes do biotério do Departamento de Biofísica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONGEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 24 de Maio de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética