

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Lindsey de Freitas Cassini

**INFLUÊNCIA DA RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA SOBRE
UM NOVO APRENDIZADO CONCOMITANTE E MAIS FRACO**

Porto Alegre

2013

Lindsey de Freitas Cassini

INFLUÊNCIA DA RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA SOBRE UM
NOVO APRENDIZADO CONCOMITANTE E MAIS FRACO

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge A. Quillfeldt.

Coorientador: Prof. Dr. Lucas de O. Alvares.

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa sem a qual esse mestrado não teria sido possível.

Ao Jorge Quillfeldt, por ter aberto as portas do laboratório para mim durante quase sete anos. Ao Lucas Alvares, pela ajuda indispensável e eficiente na elaboração e submissão desse trabalho. À Dona Zelma, pelo cuidado zeloso com os animais. E a todos os integrantes do laboratório, pelo auxílio nos experimentos e pelas discussões frutíferas.

Mas agradeço principalmente à minha família e aos meus amigos, *eu* amigos. Pessoas que me apoiaram e estiveram ao meu lado nos bons, e, nos maus momentos. Pessoas que mesmo não contribuindo diretamente com esse trabalho, me proveram de toda a serotonina, adrenalina e ocitocina necessárias para o pleno funcionamento de meu cérebro pensante! Em especial:

À minha mãe, pela força e dedicação dignas de uma leoa. Pelo seu amor incondicional, porque “A maior felicidade é a certeza de sermos amados exatamente como somos”.

À Felícia, minha fiel escudeira que tornou os últimos sete anos tão mais divertidos, tão mais coloridos, tão mais... felícios! A pessoa com quem posso ser eu mesma, sem medo de ser feliz.

À Márcia, a quem tive o recente privilégio de conhecer, que me estendeu a mão quando mais precisei e que possui a formidável sensibilidade de oferecê-la sem ser necessário pedir.

À Patrícia, presença talvez não tão frequente, mas tão sólida e confortante que se fez constante. Uma pessoa que transborda amor e carinho.

Agradeço também à UFRGS, FeSBE, IBRO e à SBNec pelos auxílios e oportunidades que me propiciaram experiências únicas tanto para meu crescimento profissional quanto pessoal.

E por fim agradeço ao meu querido cérebro que trabalhou duro por essa dissertação!

RESUMO

Baseado na *hipótese da marcação e captura sináptica* (STC, do inglês para *synaptic tagging and capture*), recentemente foi proposto que um aprendizado fraco, que induz apenas memória de curta duração (STM, na sigla inglesa), pode capturar proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs) de uma experiência forte associada, e dessa forma estabelecer uma memória de longa duração (LTM, na sigla inglesa). Aqui mostramos que a reconsolidação da memória do Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) pode propiciar a formação de LTM de um aprendizado fraco de Reconhecimento Espacial de Objetos (REO). Este efeito foi observado apenas durante uma janela de tempo restrita e foi dependente da síntese proteica pelo CAC e do estabelecimento de um *tag* sináptico pelo REO. A evocação por si só (sem reconsolidação) não foi capaz de exercer o mesmo efeito promotor. Adicionalmente, a reconsolidação do Labirinto Aquático e a extinção do CAC também foram capazes de propiciar a formação de LTM do REO. Estes resultados mostram pela primeira vez que a reconsolidação de uma memória pode promover a consolidação de um aprendizado fraco concomitante através de um provável mecanismo de STC.

ABSTRACT

Based on the synaptic tagging and capture (STC) hypothesis, it was recently proposed that a weak learning, only able to produce short-term memory (STM), can capture plasticity related proteins (PRPs) provided by a strong experience, and also succeed in establishing long-term memory (LTM). Here we found that reconsolidation of a Contextual Fear Conditioning (CFC) memory allowed LTM formation of a weak Spatial Object Recognition (wSOR) training applied closely in time. This effect was observed only during a critical time window and was dependent on CFC's protein synthesis and on wSOR's tagging process. CFC retrieval by itself (without reconsolidation) did not have the same promoting effect. In addition, Water Maze reconsolidation, and even CFC extinction, allowed the formation of wSOR-LTM. These results show for the first time that memory reconsolidation can promote the consolidation of concomitant weak learning through probable STC mechanisms and trigger new insights related to memory acquisition during daily life situations.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	do inglês, ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiônico
AP5	do inglês, ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico
Arc	do inglês, proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade
BDNF	do inglês, fator neurotrófico derivado do encéfalo
CA	campo aberto
CA1	região CA1 do hipocampo (de <i>Cornu Ammonis I</i>)
CAC	condicionamento aversivo ao contexto
CAMKII	do inglês, proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina
EI	esquiva inibitória
ERKs	do inglês, proteína cinase regulada por sinais extracelulares
KN-93	do inglês, N-(2-hidroxietil)-4-metoxibenzenossulfonamida
LAM	labirinto aquático de Morris
LTD	do inglês, depressão de longa duração
LTP	do inglês, potenciação de longa duração
LTM	do inglês, memória de longa duração
LVGCC	do inglês, canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L
mTOR	do inglês, proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NMDA	N-metil-D-aspartato
1NMPP1	do inglês, 4-amino-1-tercbutil-3-(1'-Naftilmetil)-pirazolo (3,4-d) pirimidina
pCREB	do inglês, proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc fosforilada
PKA	do inglês, proteína cinase A
PRPs	proteínas relacionadas à plasticidade
PKM ζ	proteína cinase M zeta
RNA	do inglês, ácido ribonucleico
REO	reconhecimento espacial de objetos
STC	do inglês, marcação e captura sináptica
STM	do inglês, memória de curta duração
TrkB	do inglês, proteína tirosina cinase B.
Zif268	do inglês, proteína “dedos” de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Memória.....	7
1.2 Potenciação de Longa Duração (LTP).....	9
1.3 Marcação e Captura Sináptica (STC)	11
1.4 Bases celulares e moleculares da Marcação e Captura Sináptica (STC).....	12
1.5 Conceitos importantes.....	16
1.6 Fenômeno de associação tardia.....	18
1.7 Marcação e Captura Sináptica (STC) & Memória.....	21
1.8 Reconsolidação	25
1.9 Hipótese de trabalho	27
2 OBJETIVOS	28
3 ARTIGO	29
Abstract.....	31
Introduction.....	32
Material and Methods	33
Results.....	35
Discussion	41
References.....	44
Figures	47
4 DISCUSSÃO	55
5 CONCLUSÕES.....	64
6 REFERÊNCIAS	65
6.1 Artigos	65
6.2 Material gráfico complementar.....	70
ANEXO.....	71

1 INTRODUÇÃO

A presente dissertação de mestrado tem como foco de estudo as implicações e aplicações da *hipótese de captura e marcação sináptica* (STC, do inglês para *synaptic tagging and capture*) nos processos de aprendizado e memória. Vejamos, a seguir, os principais fundamentos deste estudo.

1.1 Memória

“Lembrar é fácil para quem tem memória. Esquecer é difícil para quem tem coração. Esquecer... Esquecer... Esquecer será sempre a melhor opção?”

William Shakespeare.

Podemos definir memória como o armazenamento de informações representativas adquiridas através da experiência. Tal armazenamento pode ser de menor ou maior duração conforme o tipo de memória: de Trabalho (segundos), de Curta Duração (minutos/horas), de Longa Duração (dias/semanas) e Remota (meses/anos) (Akers e Frankland, 2009; Izquierdo, 2002). Ver Figura 1.1

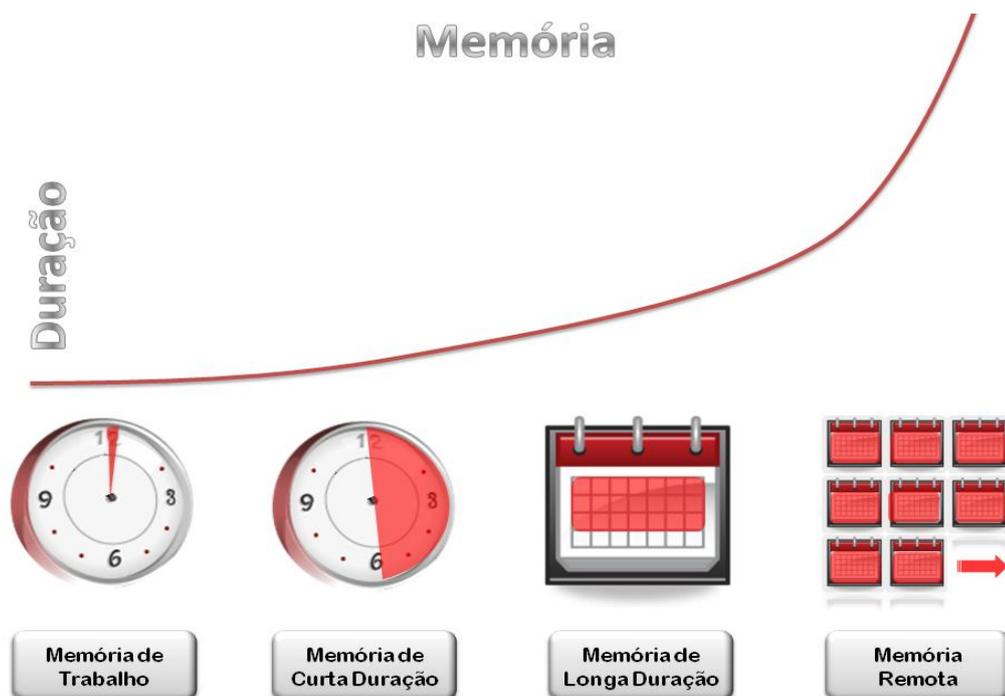


Figura 1.1- Tipos de memória quanto à duração. Descrição no texto. Elaborada pela autora.

O estabelecimento de uma memória é um processo que envolve três fases principais: aquisição, consolidação e evocação (ver Figura 1.2). Durante a aquisição de uma memória, há a indução de um determinado padrão de atividade neural que codifica essa informação aprendida, e representa o que chamamos de *engrama*. Através da modificação da força das conexões sinápticas nessa rede neural, temos a formação da memória de Curta Duração (STM). Essas modificações são então sustentadas e estabilizadas pelo processo conhecido como consolidação sináptica. A consolidação leva à formação da memória de Longa Duração (LTM) e depende da síntese de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs). Finalmente, essas memórias poderão então ser expressas através da evocação (Redondo e Morris, 2011; Izquierdo, 2002).

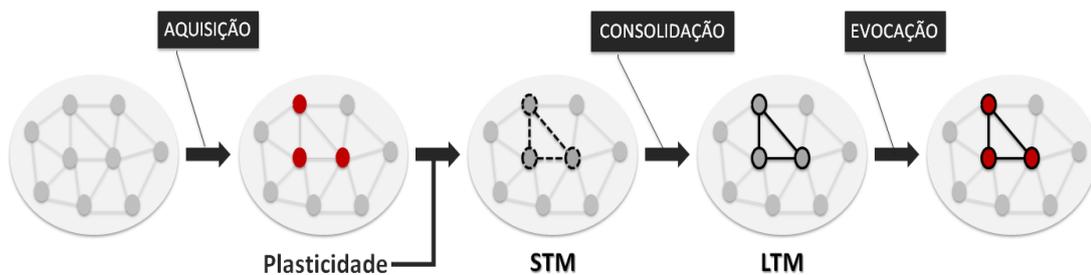


Figura 1.2 - Principais fases da memória representadas em uma rede neural esquemática. Descrição no texto.
Elaborada pela autora.

No entanto, se o aprendizado não for forte o suficiente para induzir síntese proteica, ou, se for administrado um inibidor de transcrição/tradução e outras interferências, o traço não poderá ser sustentado e não teremos a formação de LTM (Barco et al., 2008). Já se essa experiência for muito fraca até para induzir plasticidade, não teremos nem a expressão de STM. Adicionalmente, o traço mnemônico, mesmo após estabilizado, não é imutável e pode sofrer alterações futuras através da reconsolidação, ou ser suprimido pela extinção (Costanzi et al., 2011; Dudai, 2012). E por meio da consolidação sistêmica essa memória lentamente passará a ser armazenada em estruturas corticais, permitindo sua evocação meses ou anos mais tarde (memória remota) (Akers e Frankland, 2009).

Nesse trabalho concentrar-nos-emos nos mecanismos e características das memórias de curta e de longa duração, bem como nos processos de consolidação sináptica e de reconsolidação da memória.

1.2 Potenciação de Longa Duração (LTP)

Como vimos, o estabelecimento de uma memória envolve modificações plásticas na força das conexões sinápticas. Um fenômeno conhecido, capaz de aumentar a eficiência sináptica, em resposta à atividade, é a Potenciação de Longa Duração (LTP, sigla em inglês). A LTP é um fenômeno observado em experimentos eletrofisiológicos geralmente realizados em fatias de hipocampo (mas também pode ser observado *in vivo* ou em outras estruturas). O hipocampo é uma estrutura que, em mamíferos, está localizada no lobo temporal medial e é extremamente importante para o processamento de memórias *explícitas* (de fatos e eventos). Nesses experimentos, uma determinada via pré-sináptica é estimulada eletricamente através de um eletrodo inserido, por exemplo, nas colaterais de Schaeffer, grupo de axônios que fazem conexão com células da região CA1, região na qual é inserido então um eletrodo para registro da resposta pós-sináptica (Bear et al., 2008). Ver Figura 1.3A.

Com um estímulo simples é avaliada a resposta basal dessa via, o potencial excitatório pós-sináptico (PEPS). Após a aplicação de um estímulo tetânico (estímulo de alta frequência), observa-se que a resposta pós-sináptica é potenciada, ou seja, o mesmo estímulo simples que antes gerava uma resposta basal, passa a gerar uma resposta maior. Esta potenciação é chamada de LTP precoce e dura cerca de uma a poucas horas. Ver Figura 1.3B. Entretanto, se for aplicada uma estimulação mais forte, com repetidos estímulos tetânicos em sequência, essa potenciação inicial pode ser estabilizada e sustentada por pelo menos 24h. Esta potenciação duradoura é chamada de LTP tardia (Redondo e Morris, 2011). Ver Figura 1.3C. A LTP tardia pode durar de dias a semanas, dependendo da capacidade de registro do experimento (Barnes 2003). No entanto, se a transcrição ou tradução de proteínas for bloqueada farmacologicamente, esse estado potenciado não consegue ser sustentado e a resposta gradualmente decai e volta aos níveis basais (Barco et al., 2008). Ver Figura 1.3D.

A LTP compartilha muitas propriedades com os processos de aprendizado e memória (Bliss e Collingridge, 1993; Lamprecht e LeDoux, 2004), e pode, inclusive, ser induzida pelo próprio aprendizado (ver Clarke et al., 2010; Gruart et al., 2006; Whitlock et al., 2006). Além do mais, na LTP, assim como na memória, podemos distinguir, pelo menos, duas fases de armazenamento: um estágio inicial, independente de síntese proteica, e, de curta duração (LTP precoce e STM), e um estágio mais tardio, dependente de expressão gênica e de síntese proteica, e, de longa duração (LTP tardia e LTM). É, atualmente, um fenômeno amplamente aceito como modelo celular da memória (Barco et al., 2008; Martin et al., 2000).

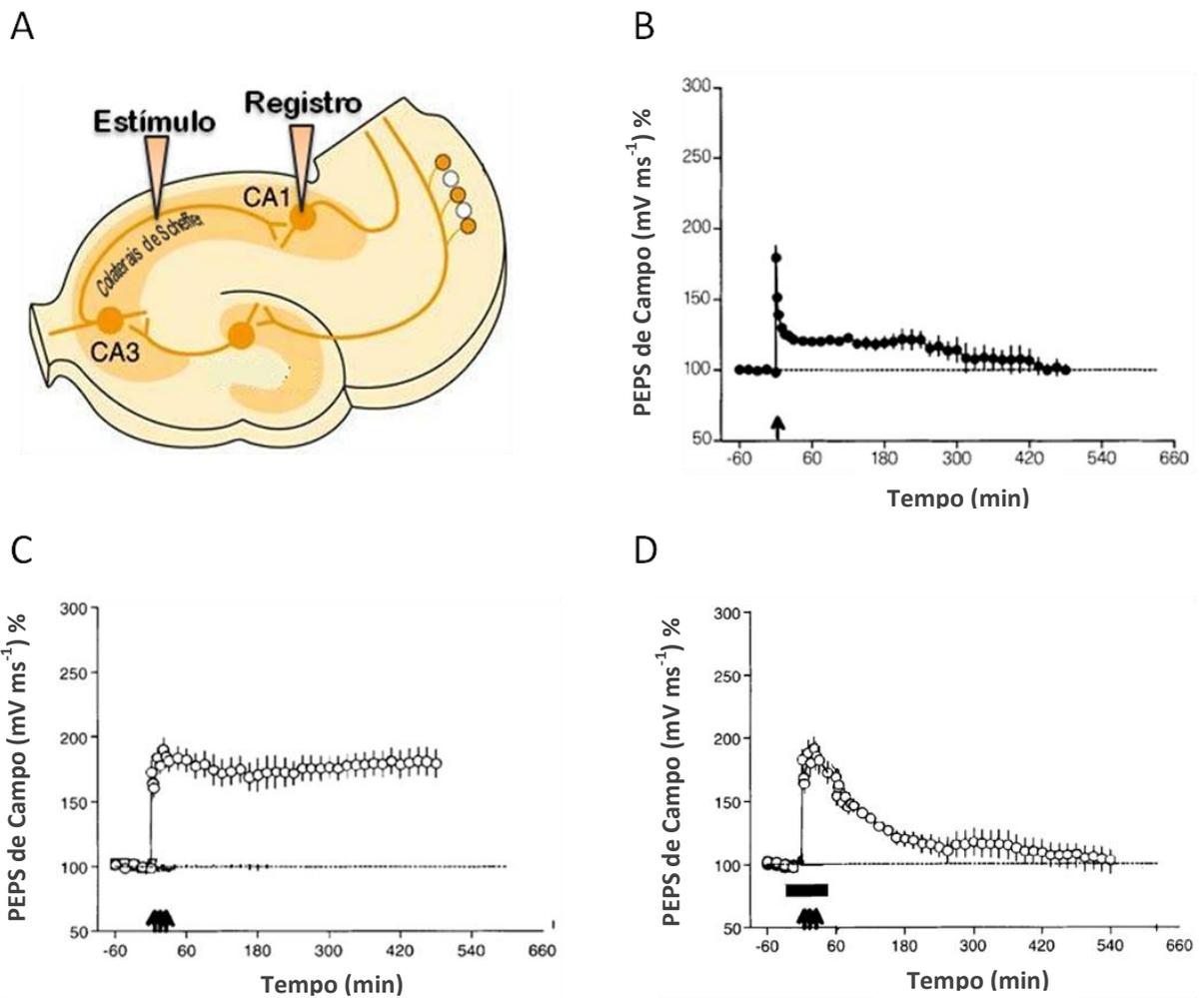


Figura 1.3 - Potencição de Longa Duração (LTP).

A. Experimento eletrofisiológico representativo em uma fatia de hipocampo. Descrição no texto. Adaptado de http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupoc/gd4grupo3_arquivos/image015.jpg. **B.** Indução de LTP Precoce, após aplicação de um único estímulo tetânico (seta). **C.** Indução de LTP Tardia após aplicação de repetidos estímulos tetânicos. **D.** Indução apenas de LTP precoce após aplicação de repetidos estímulos tetânicos sob efeito de um inibidor de síntese proteica (barra). Adaptado e traduzido de Frey e Morris (1997).

1.3 Marcação e Captura Sináptica (STC)

Uma característica importante da LTP é a sua especificidade, ou seja, apenas as sinapses que foram estimuladas serão potenciadas, e não todas as presentes no neurônio de forma indiscriminada. A LTP é então sinapse-específica (Bliss e Collingridge, 1993). Como vimos anteriormente, a LTP tardia requer expressão gênica, a qual ocorre no corpo ou soma neuronal. Como, então, as proteínas e outros produtos provindos do soma agem especificamente nas sinapses que foram estimuladas, considerando-se que um neurônio pode possuir milhares de conexões sinápticas?

Para elucidar essa questão, entre outras, Frey e Morris formularam em 1997 a hipótese da *marcação e captura sináptica* ou STC (sigla em inglês para *synaptic tagging and capture*). A hipótese STC propõe que quando uma determinada via sináptica é estimulada, dois eventos dissociáveis ocorrem: primeiro há a expressão da LTP precoce e a marcação dessa sinapse por um *tag*, o qual sinaliza essa atividade sináptica de forma específica. Paralelamente, se o estímulo for forte o suficiente, haverá a síntese das proteínas relacionadas à plasticidade, chamados coletivamente de PRPs. Essas PRPs são então capturadas apenas pelas sinapses marcadas pelo *tag*, e não atuarão nas demais que não foram marcadas e, portanto, não foram estimuladas. A ação das PRPs propicia a sustentação desse estado potenciado e a formação da LTP tardia. Sem a disponibilidade das PRPs, a sinapse gradualmente retorna ao seu estado basal, não potenciado e não-marcado. Ver Figura 1.4.

Ao longo desses 15 anos, desde sua formulação original, a hipótese STC foi sendo reformulada à medida que seus mecanismos moleculares e celulares vão sendo cada vez mais estudados e desvendados. Anos de literatura científica nos permitem hoje responder mais precisamente, mas não de forma definitiva, algumas questões que antes permaneciam inacessíveis, como: O que é o *tag* sináptico? Quais os mecanismos responsáveis pela expressão da LTP precoce e da LTP tardia? Serão os mesmos? Qual a identidade molecular das PRPs?

Veremos então a seguir os principais mecanismos por trás do processo de *marcação e captura sináptica*, que nos permitirá dessa forma analisar na seção seguinte as questões fundamentais apontadas acima.

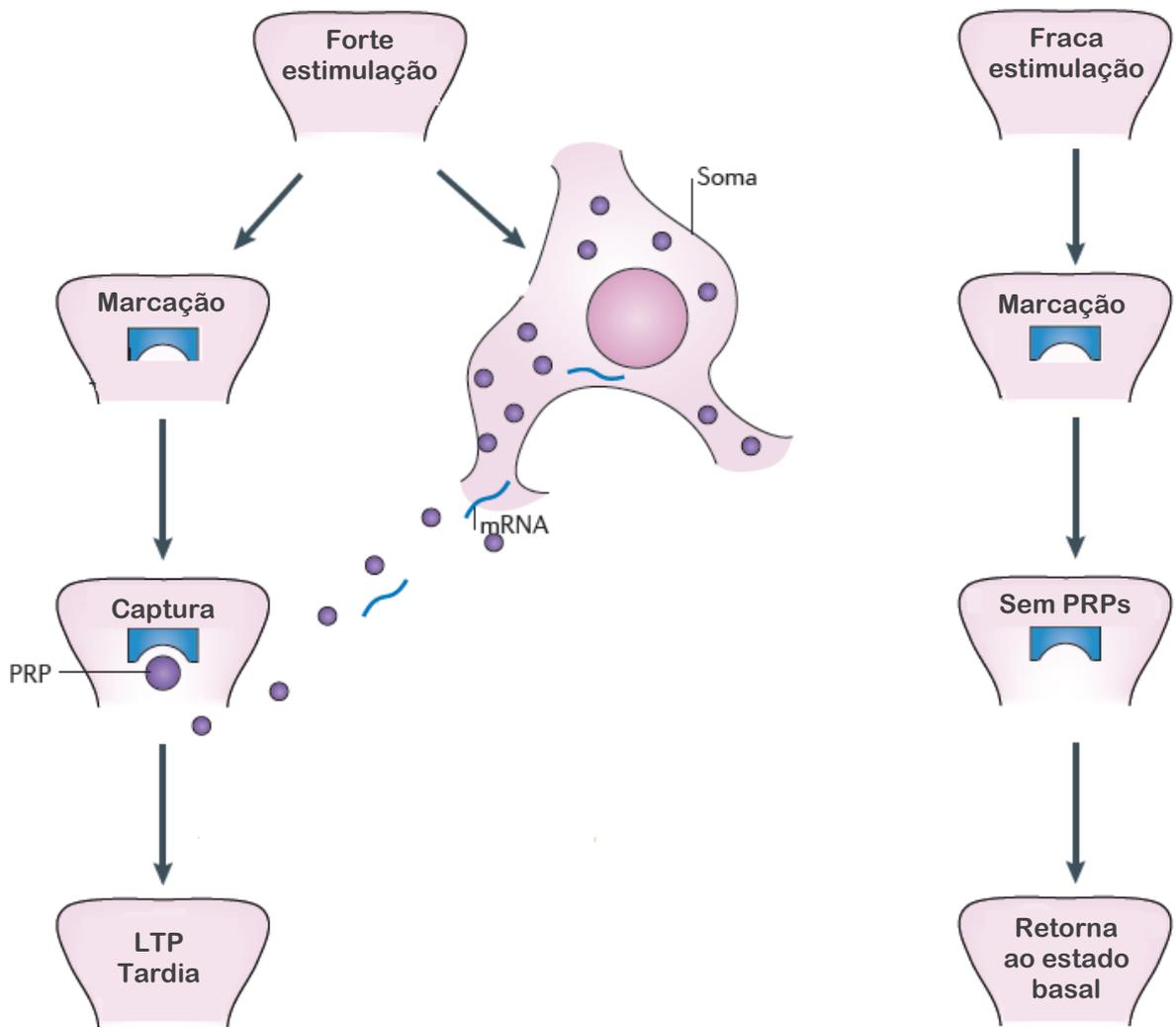


Figura 1.4 - Desenho esquemático do processo de *marcação e captura sináptica*. Descrição no texto. Adaptado e traduzido de Redondo e Morris (2011).

1.4 Bases celulares e moleculares da marcação e captura sináptica (STC)

A hipótese STC a nível celular e molecular envolve uma série de eventos descritos de forma esquemática a seguir (Redondo e Morris, 2011):

Em uma sinapse excitatória no seu estado basal, observamos vesículas pré-sinápticas justapostas a *sítios de encaixe da densidade pós-sináptica (PSD Slots)*: um grupo de proteínas capazes de se ligar a receptores. Esses *sítios* contêm receptores AMPA (canais de sódio ativados por glutamato) que estão ligados ao citoesqueleto através das proteínas de ancoramento. O citoesqueleto de actina é dinâmico, mas nesse caso, estável. Há uma contínua renovação (*turnover*) desses receptores e uma taxa constante de inserção e remoção dos mesmos a partir de um estoque (*pool*) perissináptico. Dessa forma, é mantido o mesmo número de receptores AMPA por *sítio* e um nível basal de excitação sináptica. Ver Figura 1.5.

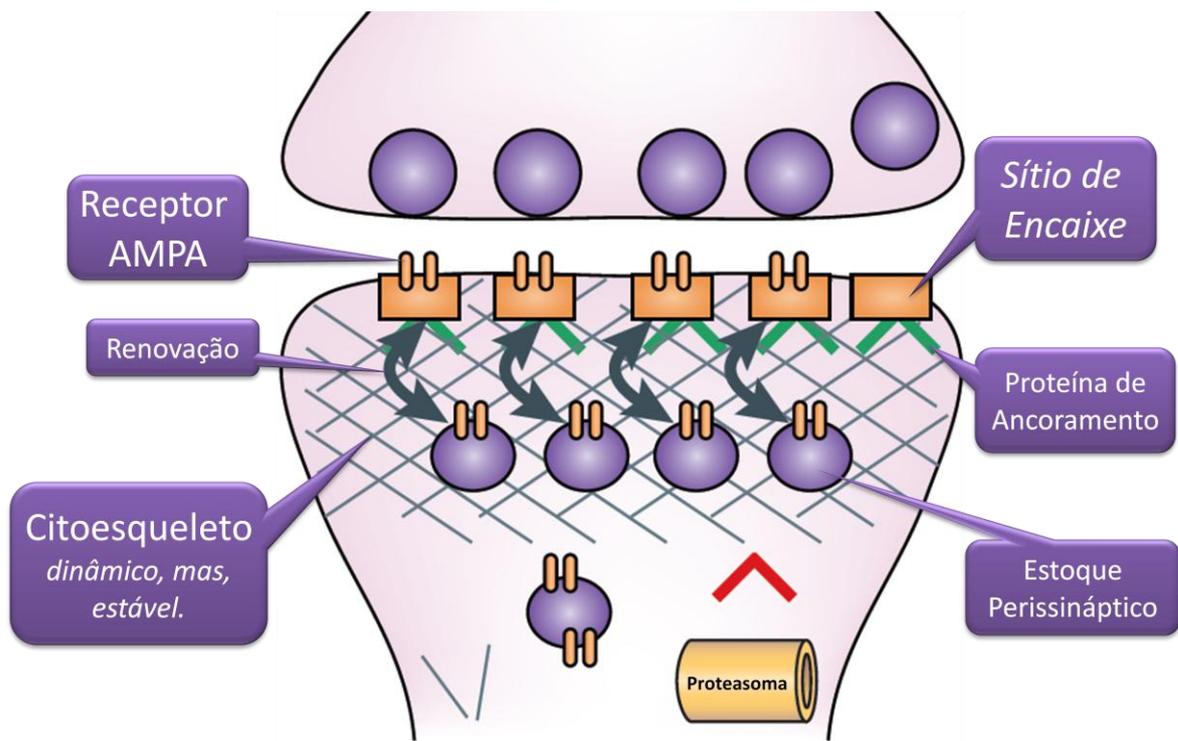


Figura 1.5 - Desenho esquemático de uma sinapse excitatória em seu estado basal. Descrição no texto. Adaptado de Redondo e Morris (2011).

Quando essa sinapse recebe um estímulo de alta frequência, há uma rápida incorporação de receptores AMPA provenientes do estoque perissináptico nos *sítios* já existentes da sinapse. Com o aumento no número de receptores, há uma maior entrada de sódio e maior é a resposta pós-sináptica frente a um estímulo. Tal estado potenciado caracteriza assim a expressão da LTP precoce. Paralelamente há a desestabilização e a expansão do citoesqueleto pela ação do proteassoma (complexo proteolítico) e também de cinases (enzimas que fosforilam seus substratos). Esse estado instável e maleável torna a sinapse acessível e suscetível a modificações, diferentemente das demais que não foram estimuladas. Tal situação caracteriza a marcação ou *tagging* sináptico. Ver Figura 1.6.

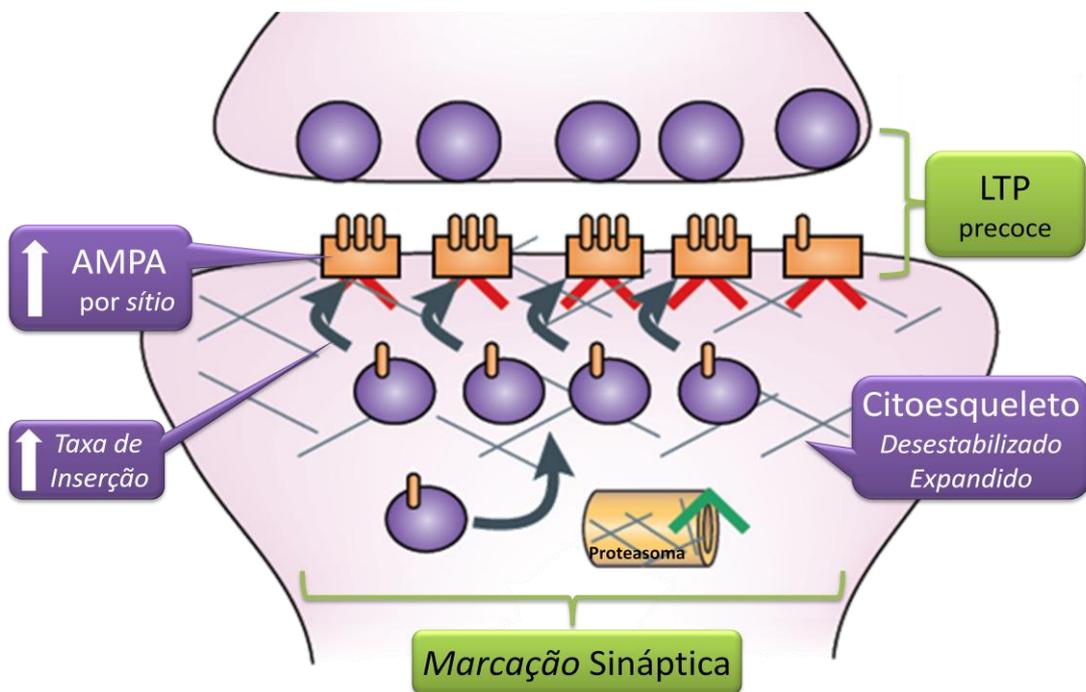


Figura 1.6 - Desenho esquemático de uma sinapse excitatória durante o processo de *marcação* sináptica em um estado potenciado temporário. Descrição no texto. Adaptado de Redondo e Morris (2011).

No entanto, se o estímulo não foi forte o suficiente para induzir síntese proteica, esse estado potenciado gradativamente decai à medida que a taxa de inserção/remoção de receptores restabelece o número basal de AMPAs em cada *sítio* da densidade pós-sináptica. Adicionalmente, conforme a atividade das cinases decai, a sinapse em cerca de 90min retorna ao seu estado estável e menos acessível e, portanto, não-marcado. Esses processos são ilustrados no [Vídeo 1](#) da revista *Nature* (ver Referências).

Já se o estímulo foi forte o suficiente, haverá a síntese de PRPs e a ação dessas proteínas nas sinapses que estão acessíveis e suscetíveis a modificações. Novos *sítios de encaixe* serão inseridos nesse botão sináptico que está se expandido, bem como novas proteínas de ancoramento, e o estoque perissináptico de receptores também será restabelecido. A taxa de inserção/remoção e a estrutura sináptica também vão gradativamente se reestabilizando e voltando ao estado basal. Mas nesse caso, como existem mais *sítios* na densidade pós-sináptica, o número total de receptores se manterá maior. Essa sinapse expandida e potenciada é agora estável e permanecerá nesse novo estado estacionário que permite a expressão da LTP tardia de forma duradoura e sustentável. Ver Figura 1.7. Esses mecanismos também estão ilustrados no [Vídeo 2](#) da revista *Nature* (ver Referências).

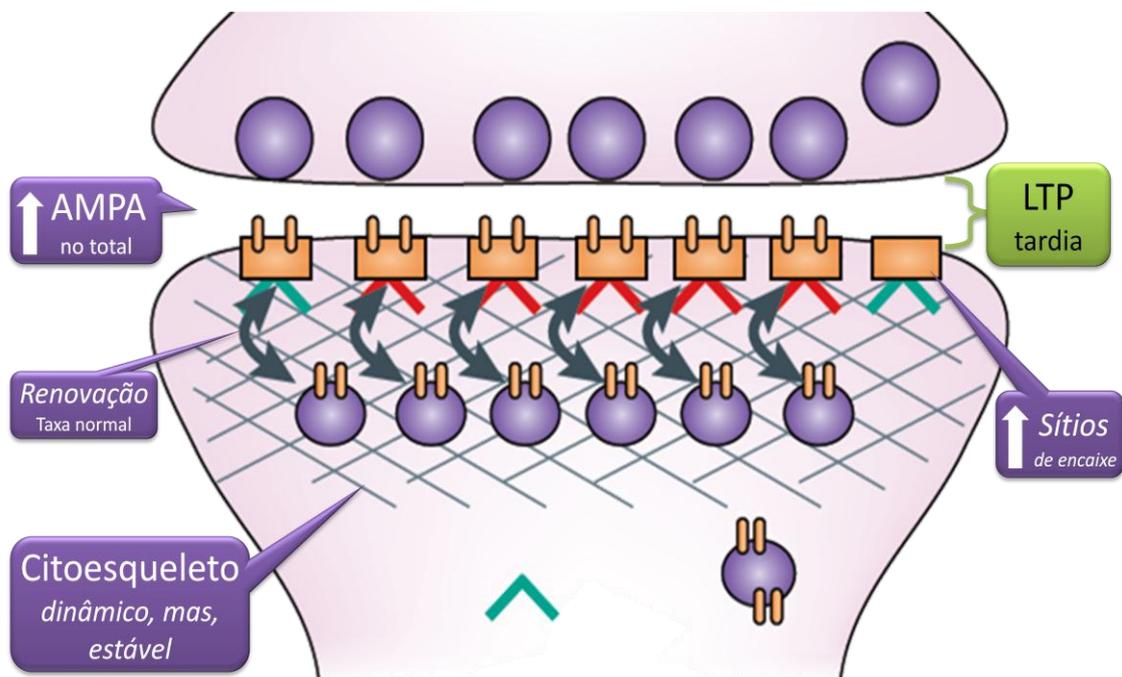


Figura 1.7 - Desenho esquemático de uma sinapse excitatória em um estado potenciado duradouro. Descrição no texto. Adaptado de Redondo e Morris (2011).

1.5 Conceitos importantes

O que é uma sinapse marcada (“tag”)?

Uma *sinapse marcada* é um estado de toda a sinapse, não é uma única molécula ou a fosforilação desta, nem a captura das PRPs é a interação de apenas uma proteína com outra. Uma *sinapse marcada* é um estado permissivo, temporário, no qual a mesma está acessível à ação das PRPs e, assim, suscetível a modificações duradouras (Barco et al., 2008; Redondo e Morris, 2011).

Esse estado envolve um grande número de proteínas e interações moleculares. Entre elas está a ativação do receptor NMDA, um canal de cálcio simultaneamente dependente de voltagem e ativado por glutamato. O receptor NMDA, quando estimulado, interage com a proteína autofosforilante CaMKII. Esta, enquanto permanecer no estado fosforilado, irá agir (dentre diversos outros alvos) sobre o citoesqueleto de actina e, assim, mediar a expansão dendrídica (Okamoto et al., 2013; Moncada et al., 2011; Zhou et al., 2007).

É possível, então, modular o processo de *marcação (tagging)* através de antagonistas e agonistas do receptor NMDA, por exemplo, como o AP5 e a D-cicloserina (Moncada et al., 2011). Ou ainda, de forma mais específica, com baixas doses de KN-93, um inibidor da CaMKII, ou de Latrunculina, um inibidor da polimerização da actina (Okamoto et al., 2009).

Outros processos importantes para a *marcação* sináptica são a degradação de proteínas, a atividade de certas moléculas de ancoramento, certos processos pré-sinápticos, extracelulares e gliais, e a tradução restrita de RNA mensageiro (Dong et al., 2008; Ehlers, 2002; Nagy et al., 2006; Ishikawa et al., 2008; Wang et al., 2010).

Quais os mecanismos responsáveis pela expressão da LTP precoce e da LTP tardia? São os mesmos?

Como vimos anteriormente, apesar de funcionalmente similares, pois ambas levam a uma potenciação, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela expressão da LTP precoce e da LTP tardia não são os mesmos e estão resumidos no Quadro 1.1 (Redondo e Morris, 2011; Barco et al., 2008).

	LTP Precoce	LTP Tardia
Receptores AMPA	↑	↑
Sítios de Encaixe	=	↑
Taxa inserção/remoção de AMPA	↑	=
Receptores por Sítio	↑	=
Expressão	Rápida	Lenta
Duradoura	Não	Sim
Síntese Protéica	Independente	Dependente
Marcação sináptica	Independente	Dependente

Quadro 1.1 - Resumo dos principais mecanismos da LTP precoce e da LTP tardia. Descrição no texto. Elaborado pela autora e baseado na revisão de Redondo e Morris (2011).

Qual a identidade molecular das PRPs?

A identidade molecular de muitas PRPs é desconhecida, mas inclui, por exemplo, GluR1, PKM ζ e BDNF. GluR1 é uma subunidade do receptor AMPA que desempenha um papel proeminente no tráfego dependente de atividade do receptor e é necessária para permitir um aumento estável no tamanho do espinho dendrítico (Hayashi, 2000; Kopec et al., 2007). A PKM ζ é uma proteína cinase necessária para a manutenção da LTP e da memória. Sua atividade relaciona-se com a sustentação do nível elevado de receptores AMPA em sinapses potenciadas (Pastalkova et al., 2006; Yao et al., 2008). O BDNF é uma neurotrofina que possui uma dupla função muito interessante: atua tanto como uma PRP quanto como uma proteína necessária para estabelecimento de uma *sinapse marcada*. Lu e colaboradores mostraram que a interação do BDNF já existente nas sinapses com o seu receptor TrkB faz parte do processo inicial de marcação. Paralelamente, a expressão de BDNF é necessária para o estabelecimento da LTP tardia e da memória de longo prazo (Lu et al., 2011; Lu, 2003; Lee et al., 2004).

1.6 Fenômeno de associação tardia

A hipótese STC, de acordo com suas premissas, traz uma nova forma de enxergar a plasticidade sináptica e uma importante implicação prática no que diz respeito à indução da LTP: a possibilidade de associação entre diferentes estímulos. Suponhamos que uma determinada via receba um estímulo tetânico fraco, suficiente para estabelecer uma *sinapse marcada*, mas não para induzir a síntese de PRPs, e adicionalmente, um estímulo tetânico forte seja aplicado em outra via independente, porém convergente (uma via que faça conexão com a mesma população neuronal da primeira via estimulada, mas que o faça em sinapses diferentes e não relacionadas). Ver Figura 1.8.

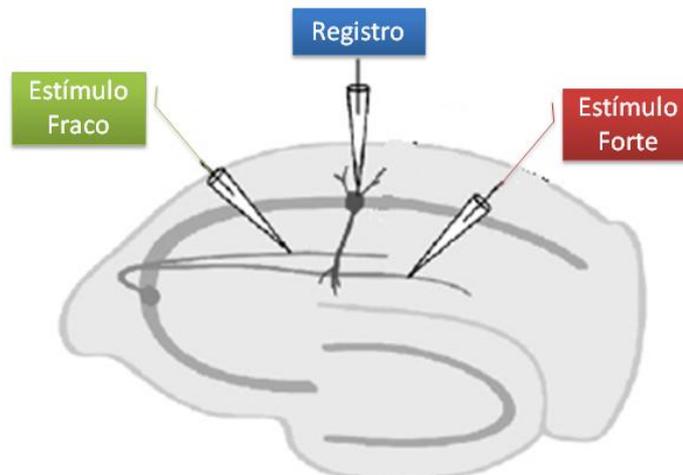


Figura 1.8 - Esquema de um experimento eletrofisiológico de duas vias em hipocampo de roedor. Descrição no texto. Adaptado de Barco et al. (2008).

O estímulo forte irá induzir além da *marcação sináptica*, a síntese de PRPs, as quais estarão então disponíveis e livres para atuar no neurônio. Se esse estímulo for aplicado enquanto ainda estiver presente a marcação das sinapses que foram fracamente estimuladas (durante cerca de 2h), as PRPs recém-produzidas poderão então atuar em ambas as sinapses marcadas, tanto a fraca quanto a forte! Nessa situação, o estímulo tetânico fraco poderá estabelecer efetivamente uma LTP tardia, que de outra forma não seria possível. Ver Figura 1.9.

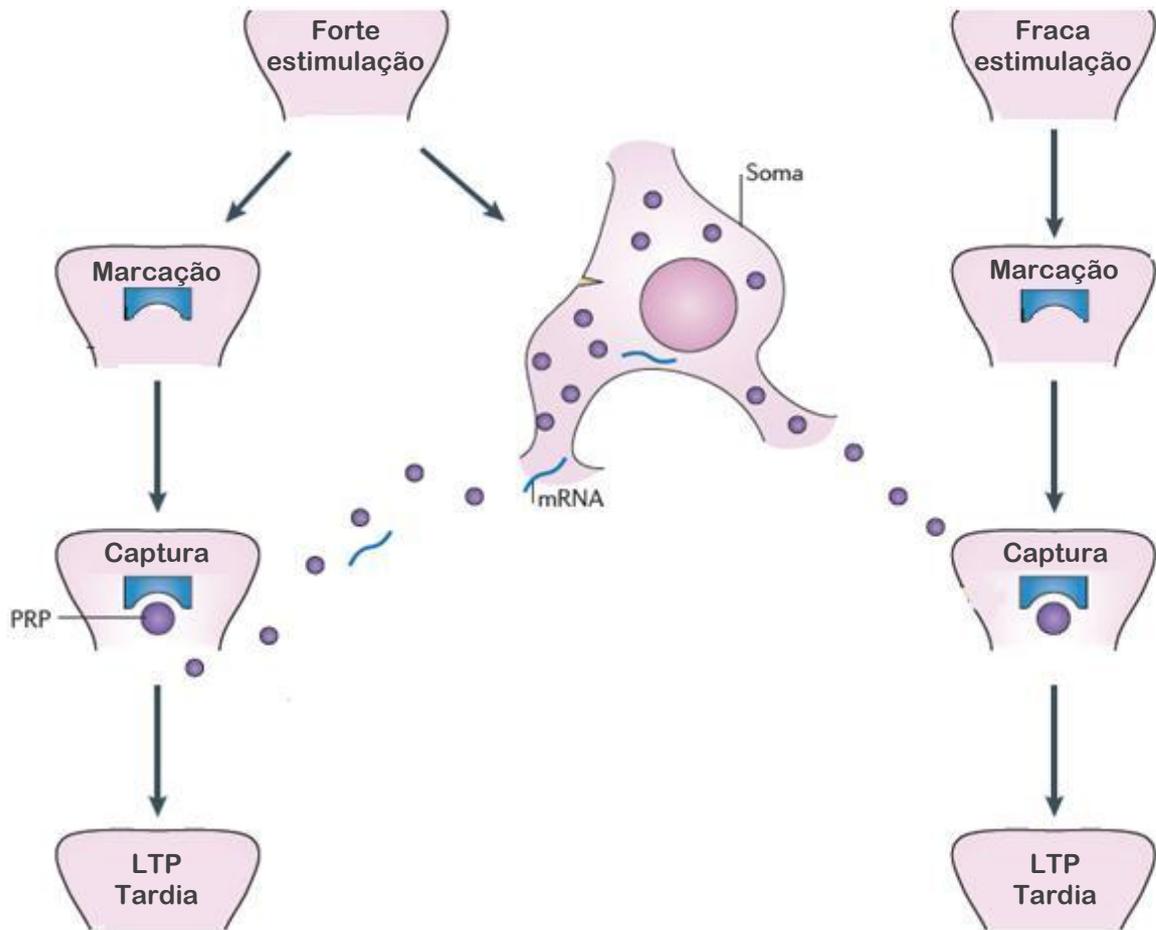


Figura 1.9 - Desenho esquemático do fenômeno de associação postulado pela hipótese STC. Descrição no texto. Adaptado e traduzido de Redondo e Morris (2011).

Frey e Morris foram os primeiros em 1997 a testar e observar esse fenômeno que veio a ser chamado de associação tardia da LTP, ou captura heterossináptica. Ver Figura 1.10A. Desde então, esse modelo experimental vem sendo intensivamente explorado, bem como suas variações e diversas manipulações metodológicas e farmacológicas, resumidas esquematicamente na Figura 1.10B-F (Barco et al., 2008; Redondo e Morris, 2011). Tal abordagem experimental tem como objetivo tanto a comprovação da hipótese STC e seus mecanismos, quanto o estudo da interação entre distintos estímulos associados espacial e temporalmente.

A possibilidade de associação postulada pela hipótese STC implica de forma surpreendente que a indução da LTP tardia não depende apenas das características do próprio estímulo (força, repetição, modulação, etc.), mas também da atividade neural prévia e futura a esse evento.

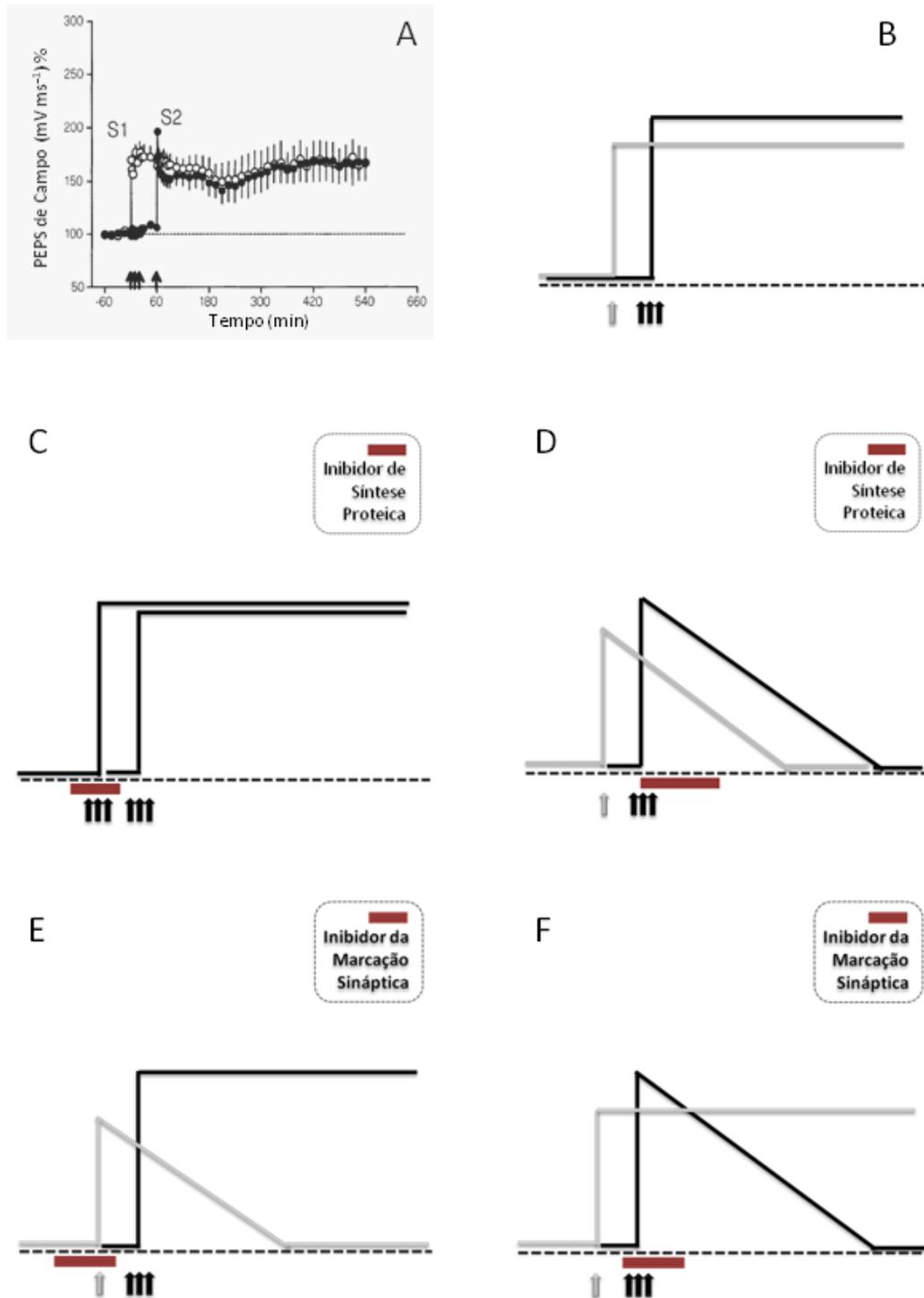


Figura 1.10 - Fenômeno de Associação Tardia. **A**. Associação entre um estímulo forte (repetidos estímulos tetânicos) e um estímulo fraco (único estímulo tetânico) em vias independentes e convergentes do Hipocampo (ver Figura 1.8). Adaptado e traduzido de Frey e Morris (1997). **B-F**. Resumo esquemático dos demais desenhos experimentais eletrofisiológicos utilizados no estudo da STC, e, seus resultados esperados conforme as premissas da hipótese. **B**. Estímulo Fraco + Estímulo Forte = ambos promovem LTP Tardia. **C**. Estímulo Forte (sob efeito de um inibidor de síntese proteica) + Estímulo Forte = ambos promovem LTP Tardia. **D**. Estímulo Fraco + Estímulo Forte (sob efeito de um inibidor de síntese proteica) = nenhum promove LTP Tardia. **E**. Estímulo Fraco (sob efeito de um inibidor específico do processo de marcação sináptica, *tagging*) + Estímulo Forte = apenas estímulo forte promove LTP Tardia. **F**. Estímulo Fraco + Estímulo Forte (sob efeito de um inibidor específico do processo de marcação sináptica, *tagging*) = Apenas estímulo fraco promove LTP Tardia. Elaborado pela autora e baseado nas revisões de Redondo e Morris (2011) e Barco et al. (2008).

1.7 Marcação e Captura Sináptica (STC) & Memória

A hipótese STC e o estudo do fenômeno de associação é particularmente relevante devido às suas interessantes implicações para os processos de aprendizagem e memória. No entanto, foi apenas recentemente que a hipótese e suas predições foram testadas e estudadas a nível comportamental.

Moncada e Viola foram os primeiros a avaliar essa questão em 2007, associando-se um protocolo fraco da tarefa de Esquiva Inibitória (EI), capaz de induzir memória de curta (STM), mas não de longa duração (LTM), com a exploração de um ambiente novo (novidade), uma experiência forte capaz de induzir síntese proteica. Eles observaram que o treino fraco da EI podia gerar LTM quando os animais eram expostos a uma novidade próxima da sessão de treinamento (-1h ou +1h). Se a novidade era exposta em outros momentos (-2h ou +2h), ou se síntese de proteínas fosse inibida pela administração de Anisomicina imediatamente após a exploração, ou ainda, se o ambiente já fosse familiar para os animais, o efeito de associação não ocorria. Além do mais, o efeito amnésico da Anisomicina sobre um treino forte da EI podia ser prevenido se os animais fossem expostos a uma novidade 1h antes da sessão de treino.

Em 2009, Ballarini e colaboradores publicaram o primeiro conjunto abrangente de evidências indicando a existência de um processo análogo ao STC na formação de uma memória. Protocolos fracos de tarefas dependentes do hipocampo (reconhecimento espacial de objetos e condicionamento aversivo ao contexto) e também independentes do hipocampo (condicionamento aversivo ao gosto) foram associados a uma novidade (exploração de um ambiente ou de um sabor novo, respectivamente). Mais uma vez se observou que a novidade, durante uma janela de tempo crítica e dependente de síntese proteica, podia promover a formação de LTM de um aprendizado que havia sido fraco e insuficiente para tal. Adicionalmente, se uma tarefa dependente do hipocampo era associada a uma novidade que não ativava tal estrutura e vice-versa, ou, se o estímulo já fosse familiar para o animal, o efeito de associação não ocorria, reforçando a natureza *localizada* do fenômeno.

Wang, Redondo e Morris em 2010 aplicaram a hipótese STC a um modelo comportamental de memórias “ordinárias e quotidianas” (*everyday appetitive behavioral model*) as quais geralmente não formam lembranças duradouras, como, por exemplo, o que comemos no almoço, onde deixamos o carro, etc. Os animais aprendiam a localização de um *pellet* de alimento enterrado em uma arena familiar, e mais tarde deveriam recordar sua localização. Esse aprendizado era suficiente para formar STM, mas não LTM. Em seguida,

observaram que a exposição à uma novidade 30min após a sessão de treino era capaz de promover a formação de LTM dessa informação. Por outro lado, se a recompensa original fosse maior (3 *pellets*), e, portanto, mais relevante, os animais aprendiam tal localização de forma duradoura. A administração de Anisomicina imediatamente antes da experiência, no entanto, inibia esse aprendizado, mas não exercia nenhum efeito quando os animais haviam sido expostos 1h antes do evento à uma novidade.

Em 2011, Moncada e colaboradores estudaram o envolvimento das vias glutamatérgica, dopaminérgica e noradrenérgica no processo de *marcação sináptica* e da síntese de PRPs na EI. Através de intervenções farmacológicas sobre a novidade e/ou sobre as sessões de treino fraco ou forte da EI, demonstraram que os receptores D1/D5 e β -adrenérgico no hipocampo são especificamente necessários para induzir a síntese de PRPs. Além do mais, a ativação de receptores NMDA é necessária para criação dos *tags* sinápticos, assim como a ativação da CaMKII e da PKA, mas não das ERKs 1 e 2.

O grupo de Lu, em 2011, estudou o papel do receptor TrKB do BDNF na indução da *marcação sináptica*. Para tanto, foram utilizados camundongos *knock-in* da cepa TrkB^{616A}, nos quais o receptor TrKB devido a uma mutação passava a ser sensível à inibição, pela droga 1NMPP1. Os animais foram treinados em um protocolo fraco da EI (versão *step through*) suficiente apenas para formação de STM. Novamente, a exposição a uma novidade 1h antes da sessão de treino possibilitou o estabelecimento de LTM, mas não teve nenhum efeito quando os animais foram treinados sob efeito do 1NMPP1. Em conjunto com outros experimentos, os resultados sugerem que o receptor TrKB é um *marcador* em potencial para a expressão sinapse-específica da L-LTP e da LTM.

Almaguer-Melian e seus colaboradores, em 2012, avaliaram se as PRPs produzidas pela novidade seriam capazes de impedir a perda de memória causada por um estresse e se este interagiria com o processo de *marcação sináptica*. Os animais foram treinados no Labirinto Aquático de Morris (LAM) e 5min após submetidos a um evento estressante (5 choques de 1mA nas patas). O estresse causou prejuízo sobre a LTM, mas não sobre a STM. No entanto, a exposição a uma novidade 15min antes ou após o LAM impediu a perda de memória induzida pelo estresse. No grupo controle que não passou pelo estresse, a novidade não teve nenhum efeito sobre a expressão da memória no dia seguinte, mas, curiosamente, facilitou sua persistência 4 dias após. Os autores também demonstraram um aumento da expressão de BDNF e de Arc no hipocampo de animais expostos à novidade.

No estudo mais recente que temos notícia, Myskiw, Benetti e Izquierdo (2013) aplicaram a hipótese STC a um paradigma comportamental não avaliado até então: a extinção

da memória. Os animais foram treinados no Condicionamento Aversivo ao Contexto e 24h após, submetidos a uma sessão fraca de extinção (10min) insuficiente para inibir a memória aversiva de forma duradoura. Porém, nos animais que foram expostos a uma novidade 2h ou 1h antes da sessão de extinção, ou 1h após, a memória aversiva permaneceu inibida por pelo menos 24h. Esse efeito associativo não foi observado em outros períodos e foi dependente da ativação gênica no hipocampo após a novidade, mas não após a fraca sessão de extinção. Já a síntese proteica ribossomal e a dependente do sistema mTOR foi requerida tanto pela novidade quanto pela extinção. Nenhuma forma de síntese na amígdala foi necessária para a observação do fenômeno.

Apesar de ainda pouco numerosos, os estudos publicados até o momento (Tabela 1.1) indicam que a formação de uma memória também requer o estabelecimento de uma *marcação* sináptica e a síntese *de novo* de PRPs, em um processo análogo ao preconizado pela hipótese STC no contexto da LTP sináptica. A disponibilidade apenas das PRPs, ou da *marcação* sináptica, parece ser insuficiente para a estabilização do traço mnemônico, sendo necessária a ocorrência de ambas simultaneamente para que uma LTM seja formada. Tal contingência pode ser proporcionada mesmo por eventos distintos, desde que coincidam estrutural e temporalmente (fenômeno de associação).

A possibilidade de associação postulada e observada experimentalmente implica que a formação de uma memória não depende apenas das características da própria experiência (força, repetição, relevância, etc.), mas também da atividade neural prévia e futura ao evento. Assim sendo, o estudo da hipótese STC e do fenômeno de associação é de particular relevância para compreensão dos processos de aprendizado e memória na vida real, durante a qual os eventos e circunstâncias se dão num *continuum* de experiências, e não de forma isolada e restrita como geralmente se estuda em laboratório.

Ano	Autor	Experiência “doadora” de PRPs		Experiência “receptora” de PRPs		Ferramentas Farmacológicas		Outras Ferramentas
		Tarefa	Variações	Tarefa	Variações	Drogas	Infusão	
2007	Moncada & Viola	Campo Aberto	Ambiente Novo Ambiente Familiar	Esquiva Inibitória (<i>step down</i>)	Treino Fraco Treino Forte	Anisomicina SCH23390	Hipocampo	-
2009	Ballarini et al.	Campo Aberto	Ambiente Novo Ambiente Familiar	Reconhecimento Espacial de Objetos	Treino Fraco	Anisomicina	Hipocampo Córtex Insular	Quantificação de pCREB
		Água c/ Sabor	Sabor novo Sabor Familiar	Condicionamento Aversivo ao Sabor				
2010	Wang et al.	Campo Aberto	Ambiente Novo	Modelo de memória do “dia-a-dia”	Treino Fraco Treino Forte	Anisomicina SCH23390	Hipocampo	Eletrofisiologia Meta-análise
2011	Moncada et al.	Campo Aberto	Ambiente Novo	Esquiva Inibitória (<i>step down</i>)	Treino Fraco Treino Forte	Anisomicina Emetina KN62 U0126 Rp-cAMP SCH23390 Propranolol AP5	Hipocampo	-
						SKF-38393 Dobutamina		
2011	Lu et al.	Campo Aberto c/ Objetos	Ambiente Novo	Esquiva Inibitória (<i>step through</i>)	Treino Fraco	1NMPP1	Intraperitoneal	Mutantes c/ TrkB sensível á 1NMPP1. Eletrofisiologia
2012	Almaguer-Melian et al.	Campo Aberto	Ambiente Novo Ambiente Familiar	Labirinto Aquático de Morris	Treino Forte	Anisomicina	Hipocampo	Estresse Quantificação de Arc e BDNF
2013	Myskiw et al.	Campo Aberto	Ambiente Novo Ambiente Familiar	Condicionamento Aversivo ao Contexto	Extinção fraca	Anisomicina Rapamicina DRB	Hipocampo Amígdala	-

Tabela 1.1 – Visão panorâmica dos trabalhos publicados até o momento relacionando STC com Memória. Explicações no texto. Elaborada pela autora.

1.8 Reconsolidação

Como vimos, a novidade foi utilizada como a experiência “doadora” de PRPs em todos os trabalhos publicados até então sobre STC & memória. No entanto, não apenas experiências novas são capazes de induzir síntese proteica: a reconsolidação da memória também exibe essa mesma propriedade. Durante a evocação de uma memória, o traço mnemônico pode ser labilizado, isto é, entrar em um estado de instabilidade durante o qual está novamente suscetível a intervenções e modificações. Paralelamente, há a síntese de proteínas necessária para a reestabilização da memória após esse período lábil temporário, em um processo conhecido como reconsolidação (Dudai, 2012; Nadel et al., 2012).

A labilização/desestabilização da memória, ou reativação, é um processo que requer a degradação de proteínas através da via proteolítica ubiquitina-proteassoma (Kaang et al., 2009). Envolve também a ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (LVGCC). A administração de Nimodipina, um antagonista dos canais LVGCC, é capaz de impedir que a memória entre em um estado lábil, e que, assim, se torne sensível a interferências e suscetível a modificações (de Oliveira Alvares et al., 2013; Sierra et al., 2013; Flavell et al., 2011; Suzuki et al., 2008). Mas, uma vez iniciado o processo de labilização, a síntese de novo de proteínas é requerida para reestabilização do traço. Se a síntese proteica for bloqueada farmacologicamente, com Ciclohexamida por exemplo, ou, se houver outros tipos de interferência, o traço não mais poderá ser reconsolidado e a memória será prejudicada (Tronson e Taylor, 2007).

O processo de labilização/reconsolidação da memória cumpre um importante papel biológico: traz flexibilidade e maleabilidade à memória. Essa função é de fundamental importância adaptativa num ambiente dinâmico e em constante mudança da vida de um animal. É através desse processo que memórias previamente adquiridas e consolidadas podem novamente sofrer modificações. Essas modificações incluem fortalecimento, manutenção da precisão e atualização (de Oliveira Alvares et al., 2012, 2013; Lee 2010, 2008).

Mas cabe observar que nem sempre a evocação induz a reconsolidação. Vários fatores determinam quando e como a evocação levará à desestabilização da memória. A força, idade e tipo de memória, bem como a similaridade do contexto onde foi adquirida e onde é evocada, e a duração dessa experiência, são todos fatores determinantes (Dudai, 2012; Nadel et al., 2012). Quanto mais forte e antiga for a memória, mais difícil será labilizá-la por exemplo (Frankland et al., 2006; Wang et al., 2009). Além do mais, uma evocação breve provavelmente não afetará a estabilidade da memória. É necessária uma duração mínima para

que o processo de *labilização/reconsolidação* seja desencadeado. Foi observado, por exemplo, que a reexposição de animais ao contexto onde passaram por um condicionamento aversivo, durante 3min, é capaz de induzir a reativação dessa memória. No entanto, uma reexposição mais curta, de 1min, não foi suficiente para desencadear esse processo (Bustos et al., 2009; Suzuki et al., 2004). Por outro lado, se essa experiência se estender por muito tempo, teremos o início de outro processo conhecido como *extinção*. A extinção é um novo aprendizado, também dependente de síntese proteica, que suprime e inibe a memória original sem, porém, afetá-la de forma permanente (de Oliveira Alvares et al., 2008; Suzuki et al., 2004). Diversos fatores influenciam, enfim, o caminho que uma memória irá seguir após sua evocação (ver Figura 1.11). Fatores estes, que, são então passíveis de manipulações farmacológicas e comportamentais.

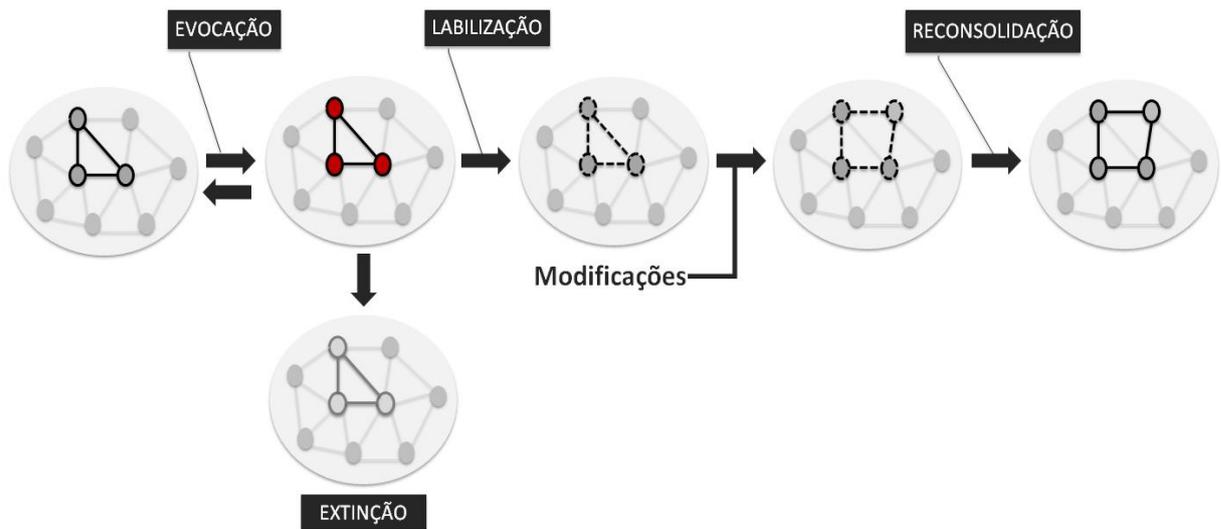


Figura 1.11 - Possíveis fases da memória após a evocação. Descrição no texto. Elaborada pela autora.

1.9 Hipótese de trabalho

Considerando que:

- Um aprendizado fraco pode utilizar as proteínas produzidas por uma experiência nova através de um processo de *marcação e captura sináptica* e assim formar uma memória duradoura.
- A reconsolidação de uma memória também induz síntese proteica.

Podemos supor que:

- A reconsolidação de uma memória também poderia propiciar a formação de memória de longa duração de um aprendizado fraco concomitante através de um processo de *marcação e captura sináptica*.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é avaliar se a reconsolidação da memória de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) pode propiciar a formação de uma memória de longa duração (LTM) de um aprendizado fraco concomitante de Reconhecimento Espacial de Objetos (REO), também conhecido como Localização de Objetos, mediante um processo de *marcação e captura sináptica* (STC, *synaptic tagging and capture*). Os objetivos específicos assim são:

- Avaliar se a reconsolidação do CAC propicia a formação de LTM de um treino fraco de REO, em uma janela de tempo restrita, e dependente de síntese proteica;
- Avaliar se a evocação do CAC por si só, sem o processo de labilização/reconsolidação (isto é, *sem reativação*), é suficiente para promover o fenômeno de associação;
- Avaliar se a ativação do receptor NMDA durante o aprendizado fraco do REO é necessária para o fenômeno de associação;
- Avaliar se a reconsolidação do CAC pode propiciar a formação de LTM de um aprendizado muito fraco de REO;
- Avaliar se a facilitação farmacológica do receptor NMDA durante o treino muito fraco de REO possibilita o fenômeno de associação;
- Avaliar se a reconsolidação de outro paradigma comportamental, o Labirinto Aquático de Morris, é capaz de promover a formação de LTM de um treino fraco do REO;
- Avaliar se outra experiência indutora de síntese proteica, a extinção do CAC, pode promover a formação de LTM de um treino fraco do REO.

3 ARTIGO

Manuscrito “*Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism*” submetido à revista *Hippocampus* no dia 14 de Dezembro de 2012 e em processo de revisão desde 17 de Abril de 2013.

Title: Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism

Author names: Lindsey F. Cassini,^{1,2} Rodrigo O. Sierra,^{1,2} Josué Haubrich,^{1,2} Ana P. Crestani,^{1,2} Fabiana Santana,^{1,2} Lucas de Oliveira Alvares,^{1,2,3} and Jorge A. Quillfeldt,^{1,2,3}

Author affiliations: ¹Psychobiology and Neurocomputation Lab, Biophysics Department, Institute of Biosciences, 91.501-970, and ²Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, 90.046-900, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³The authors have equally contributed to this work.

Abbreviated title: STC & Reconsolidation

Number of figures: 8

Corresponding author: Jorge A. Quillfeldt or Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: quillfe@ufrgs.br or lucas_alvares@yahoo.com.

Key words: Hippocampus; nimodipine; reactivation; fear conditioning; object recognition.

Abstract

Motivated by the synaptic tagging and capture (STC) hypothesis, it was recently shown that a weak learning, only able to produce short-term memory (STM), can succeed in establishing long-term memory (LTM) with a concomitant, stronger experience. This is consistent with the *capture*, by the first - *tagged* event, of the so-called plasticity related proteins (PRPs) provided by the second one. Here we describe how a concomitant session of reactivation/reconsolidation of a stronger, Contextual Fear Conditioning (CFC) memory, allowed LTM to result from a weak Spatial Object Recognition (wSOR) training. This effect was observed only during a critical time window and was dependent on protein synthesis. Retrieval by itself (without reconsolidation) did not have the same promoting effect. We also found that the inactivation of the NMDA receptor by AP5 prevented wSOR training to receive this support of CFC reconsolidation (supposedly through the production of PRPs), which may be the equivalent of blocking the setting of a learning *tag* in the dorsal CA1 region for that task. Furthermore, either a Water Maze reconsolidation, on a CFC extinction session, allowed the formation of wSOR-LTM. These results suggest for the first time that a reconsolidation session can promote the consolidation of a concomitant weak learning through a probable STC mechanism. These findings allow new insights concerning the influence of reconsolidation in the acquisition of memories of otherwise unrelated events during daily life situations.

Introduction

The synaptic tagging and capture (STC) hypothesis proposes that a strong stimulation of one synaptic pathway leads to two dissociable events: local tag setting and the synthesis of diffusible plasticity-related proteins (PRPs). The PRPs are then captured by the tagged synapses, allowing the maintenance of late long-term potentiation (L-LTP). If PRPs are not available, the receptive state (tagging) of the synapses will fade away and L-LTP will not be sustained (Frey and Morris, 1997; Barco et al., 2008; Redondo and Morris, 2011). Thus, a weak stimulation which ordinarily results only in early LTP (E-LTP), but is sufficient for setting a synaptic tag, can lead to L-LTP through the capture of the PRPs produced by a different, stronger stimulation applied closely in time (Frey and Morris, 1998a, 1998b; Frey and Frey, 2008).

Recent behavioral studies indicate that long-term memory (LTM) also requires both synaptic tagging and PRPs synthesis in order to warrant its maintenance (Moncada and Viola, 2007; Ballarini et al., 2009; Wang et al., 2010; Lu et al., 2011; Moncada et al., 2011; Almaguer-Melian et al., 2012; Myskiw et al., 2013). These experiments have shown that weak learning, only able to induce short-term memory (STM), concomitant to a novelty (Open Field exploration), was able to promote LTM, possibly through the capture of PRPs supposedly provided by the novel situation. On the other hand, exploration of a familiar Open Field did not cause such effect since it does not involve novelty, and consequently, there was no protein synthesis (Moncada and Viola, 2007; Ballarini et al., 2009; Wang et al., 2010; Almaguer-Melian et al., 2012; Myskiw et al., 2013).

Recently acquired memories are initially sensitive to disruption, but later consolidate into a stable LTM. The reactivation of an established memory might result in a new labile state, that needs to be reconsolidated in order to persist. Both processes were shown to require *de novo* protein synthesis (Suzuki et al., 2004; Tronson and Taylor, 2007; Dudai, 2012; Nadel et al., 2012). Our hypothesis is that a concomitant memory reconsolidation session could provide the PRPs that allow a weak learning (which ordinarily would result only in STM) to attain a LTM.

Here we evaluate whether memory for a weak training in Spatial Object Recognition, which would otherwise be rapidly forgotten, can result in a LTM with the assistance of the concomitant reconsolidation of a Fear Conditioning memory. The STC hypothesis predicts that, in this situation, the tagged wSOR trace would have the opportunity to capture some PRPs produced by the reconsolidation of the CFC trace and, thus, produce a LTM.

Material and Methods

Subjects. Male adult Wistar rats (270-320 g) from our breeding colony were used, housed in groups of 5 per cage, under a 12 h light/dark cycle and temperature of 24°C, with water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance to local and national animal care guidelines and the project was approved by the University's Ethics Committee.

Contextual Fear Conditioning (CFC). The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box, 25x25 cm, with a metallic grid floor. During training, rats were placed in the chamber for 3 min, received 2 foot shocks (0.7 mA 2 sec) separated by a 30 sec interval, and 1min after were placed back into their home cages. Three days later, animals were reexposed to the context for inducing memory Retrieval (90 sec), Reconsolidation (3 min) or Extinction (30 min) (De Oliveira Alvares et al., 2008, 2013; Bustos et al., 2009).

Spatial Object Recognition (SOR - Ballarini et al., 2009). The SOR apparatus was a 50 cm high, 60x40 cm plywood box with a frontal glass wall and a linoleum floor. Lateral walls had different visual clues. In the weak protocol, animals were pre-habituated to the context for 20 min, once a day, for 2 days; in the *very* weak protocol, no habituation was performed. On the training day, two identical objects were put in the arena in two adjacent corners, and animals were left to explore them for 4 min; in the test session, one of the objects was switched to a new position and animals were allowed to explore them for 2 min. SOR memory is expressed when animals spent more time exploring the object in the novel position. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose or forepaws. The time of exploration to each object was recorded and expressed as a percentage of the total exploration time to both objects (Ballarini et al., 2009).

Morris Water Maze (WM). The apparatus consisted of a circular swimming pool (diameter of 180 cm, filled with water at 22 °C) located in a room with several visual cues on the walls. Animals were trained in the WM during 5 days (4 trials per day), in which they could search (60 sec maximum) for a hidden platform to escape from water. Three days later, to induce memory reconsolidation, animals were reexposed to the training apparatus for 1 min without the escape platform (Rossato et al., 2006).

Drugs. Nimodipine, D-cycloserine (DCS), cycloheximide (CHX) and (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) were purchased from Sigma. Nimodipine (16mg/kg) and DCS (15mg/kg) were diluted in saline and injected s.c and i.p (1ml/kg) respectively (Bustos et al., 2010; Flavell et al., 2011). CHX (20µg/side or 2,2mg/kg) and AP5 (5µg/side) were diluted in

DMSO 1% and PBS respectively, and infused locally in the CA1 region of the dorsal hippocampus (1µg/side) or i.p (Rossato et al., 2010; Moncada et al., 2011).

Intrahippocampal infusion. At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula end and aimed at the pyramidal cell layer of CA1 of the dorsal hippocampus. A volume of 1 µl was bilaterally infused at a slow rate (40 µl/h) and the needle was removed only after another additional 30 sec (de Oliveira Alvares et al., 2012).

Stereotaxic surgery. For cannulae implantation animals were anesthetized by a mixture of ketamine and xylazine (i.p., 75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally implanted with a 27-gauge guide cannulae aimed at AP 24.2 mm (from bregma), LL+3.0 mm, DV 1.8 mm, just 1.0 mm above the target CA1 area of the dorsal hippocampus (Paxinos and Watson, 2007). After a 1-week recovery from surgery, animals were submitted to the behavioral procedures. Following the behavioral experiments, subjects were sacrificed and their brains dissected and preserved in 10% formaldehyde to verify for cannulae position. Only animals with correct cannulae placements were considered in the statistical analyses.

Statistics. Since data was normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors' correction), within-group comparisons were performed with paired *t*-test; for between-group comparisons either independent *t*-test, or one or two way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test, were used. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

A concomitant CFC reconsolidation session allows LTM formation of a weak SOR training.

Rats were trained in a weak protocol of Spatial Object Recognition (wSOR) task, consisting of a 4 min exploration of two identical objects located in a familiar arena (previous habituation of 20 min/2 days). Figure 1a shows that time spent exploring both objects in the training session was similar, with 50% exploration time for each object. In the test session performed 1 h later, animals showed STM by expressing a preferential exploration of the object switched to a new location ($p < 0.001$, paired t -test). However, this weak training was ineffective in inducing LTM, since another set of rats tested 24 h later did not display a preferential exploration of the objects ($p = 0.280$, paired t -test).

Next, we asked whether LTM could be obtained by pairing wSOR with a Contextual Fear Conditioning (CFC) memory reconsolidation session. We have previously shown that a 3 min session can induce memory reconsolidation of a consolidated trace (De Oliveira Alvares et al., 2008). Therefore, we reexposed rats to a previously conditioned context at different times before or after the wSOR training task (Figure 1b). CFC reconsolidation performed 1 h before or 1 h after wSOR training, allowed the formation of this wSOR-LTM ($p \leq 0.001$, paired t -test). Control animals that were not exposed to CFC reconsolidation or those groups exposed 4 h before or after wSOR training, did not express its LTM ($p > 0.40$, paired t -test). One-Way ANOVA revealed a significant effect among the groups ($F_{4,35} = 5.35$, $p = 0.002$). Tukey's *post-hoc* test showed that CFC reconsolidation performed 1 h before or after wSOR training resulted in higher memory retention compared with the other groups ($p < 0.05$), as depicted in Figure 1b.

If this memory-assisting effect of a concomitant reconsolidation is mediated by the STC process, then memory reactivation/reconsolidation should provide the PRPs necessary to induce LTM of the wSOR training. To address this question, we infused the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX; 20 μ g/side) in the CA1 region of the dorsal hippocampus (CA1) immediately after reexposition to the CFC context that took place 1 h after wSOR training (Figure 1c). As seen before, paired t -test shows that vehicle-injected (Veh) animals exposed to CFC reconsolidation, express significant wSOR-LTM ($p < 0.001$), different from those animals that received CHX ($p = 0.987$). Further analysis with two-way ANOVA

revealed a significant effect of Group (Control or +Reconsolidation): $F_{1,40} = 16.55$, $p < 0.001$; Drug (Veh or CHX): $F_{1,40} = 7.52$, $p = 0.009$; and Group x Drug interaction: $F_{1,40} = 9.09$, $p = 0.004$. Tukey's *post-hoc* test showed that the +Reconsolidation-Veh group differs from all others ($p < 0.001$), and the performance of +Reconsolidation-CHX group was similar to that of Controls ($p > 0.79$), demonstrating that infusion of CHX completely blocked the assisting effect of the concomitant CFC context reexposure (Figure 1c).

Taken together, these results show that (i) concomitant CFC memory reconsolidation allows LTM formation of wSOR; (ii) this effect is only observed during a critical time window; and (iii) it depends on protein synthesis (provided by CFC reconsolidation). As a whole this suggests that such process may be mediated by a STC mechanism.

A concomitant CFC retrieval session does not allow, by itself, LTM formation of a weak SOR training

Once retrieval of emotional memories leads to important physiological and behavioral alterations, it can be argued that the promoting effect of CFC reactivation could be explained by such somewhat classical effects, rather than by a STC process. To address this question, we used the L-type voltage-gated calcium channels (LVGCCs) antagonist nimodipine. Confirming findings by other authors (Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011), we have previously shown - in an experimental design identical to the one here employed - that nimodipine prevents labilization of CFC memory when infused before reactivation, and yet do not affect its expression (de Oliveira Alvares et al., 2013). Consequently, nimodipine-injected animals should be able to normally retrieve a stable memory - including all the emotional context - without effectively undergoing reconsolidation. Here, animals received a subcutaneous (s.c) injection of nimodipine (16mg/kg) 30 min before the CFC context reexposure, performed 1h after wSOR training (Figure 2a). A paired *t*-test showed that animals reexposed to CFC context and injected with vehicle expressed significant wSOR-LTM ($p < 0.001$). However, animals that received nimodipine did not show wSOR-LTM ($p = 0.241$). Two-way ANOVA revealed a significant effect of Group (Control or +Reconsolidation): $F_{1,26} = 5.52$, $p = 0.027$; Drug (Veh or Nimodipine): $F_{1,26} = 6.99$, $p = 0.014$; and Group x Drug interaction: $F_{1,26} = 12.03$, $p = 0.002$. Tukey's *post-hoc* test demonstrated that the +Reconsolidation-Veh group differs from all others ($p < 0.01$), and the +Reconsolidation-Nimo group was indistinguishable from controls ($p > 0.85$). These results

show that nimodipine completely prevented the assisting effect of the concomitant CFC context reexposure upon wSOR-LTM (Figure 2a). Since this treatment does not block the normal memory retrieval of this aversive task, we can also exclude the possibility that the observed assisting effect may be due to any associative emotional modulatory mechanism.

Besides this pharmacological intervention, it is possible to suppress memory labilization by shortening the reactivation time (Suzuki et al., 2004; Bustos et al., 2009). Accordingly, we observed that CHX i.p injection after a 90 sec reactivation session had no effect upon CFC memory [$p = 0.338$, Veh ($41,46 \pm 9.48$) vs. CHX ($51,88 \pm 4.13$), t -test, $n = 6$], differently of its observed amnesic effect after a 3 min session [$p = 0.002$, Veh ($52,15 \pm 5.06$) vs. CHX ($23,54 \pm 4.79$), t -test, $n = 6$]. Therefore, one hour after wSOR training, a set of animals was reexposed to the CFC context either for 90 sec, or for 3 min, (Figure 2b). Animals reexposed to the CFC context for 3 min (+Reconsolidation group) expressed significant wSOR-LTM (paired t -test, $p = 0.006$). However, animals reexposed for 90 sec (+Retrieval group) or the group with no reactivation (Control group) did not express wSOR-LTM ($p > 0.12$). Tukey's *post-hoc* test performed after one-way ANOVA ($F_{2,26} = 6.29$, $p = 0.006$), showed that the +Reconsolidation group differed from the Control ($p = 0.005$). Hence, CFC context reexposure for a short period (not able to induce memory reconsolidation) is not sufficient to allow wSOR-LTM formation (Figure 2b).

Taken together, these results indicate that a simple, non-reactivating memory retrieval cannot induce wSOR-LTM formation by itself, and that the destabilization/reconsolidation process is a necessary condition for the memory-assisting effect.

NMDA receptors are necessary to allow LTM formation of a weak SOR training with a concomitant CFC reconsolidation session

It was recently shown that NMDA activity is essential for both tag setting and STM acquisition (Moncada et al., 2011). According to the STC hypothesis, without the tagging process, memory could not be sustained, even if PRPs were available. Thus, we evaluated whether the infusion of the NMDA antagonist AP5 ($5\mu\text{g}/\text{side}$) infused into the CA1 15 min before wSOR training could affect STM (Figure 3a): a significant STM was observed in the animals that received vehicle ($p < 0.001$, paired t -test), as previously observed (Figure 1a), however, STM was abolished in the AP5-infused group ($p = 0.524$, paired t -test). Further analysis revealed a significant effect between these groups in the test ($p = 0.008$, independent

t-test). Next we tested whether CFC reconsolidation would allow LTM formation of wSOR training when AP5 were infused into CA1 (Figure 3*b*). Paired *t*-test showed that animals exposed to CFC reconsolidation and infused with vehicle expressed significant wSOR-LTM ($p < 0.001$). However, animals that received AP5 had no wSOR-LTM retention ($p = 0.358$). Further analysis with two-way ANOVA revealed a significant effect of Group (Control or +Reconsolidation): $F_{1,41} = 4.13$, $p = 0.049$; Drug (Veh or AP5): $F_{1,41} = 7.85$, $p = 0.008$; and Group x Drug interaction: $F_{1,41} = 7.00$, $p = 0.011$. Tukey's *post-hoc* test has shown that +Reconsolidation-Veh differed from all other groups ($p < 0.01$), and no significant difference was found between +Reconsolidation-AP5 and Control groups ($p > 0.94$). This indicates that CFC reconsolidation could not have its assisting effect if the CA1 NMDARs were not activated during wSOR training (Figure 3*b*).

In other words, NMDA activation in the hippocampus seems to be required to set a learning tag during a weak training, without with (under the AP5 action), should any PRPs be provided by the concomitant CFC reconsolidation, they could not be captured in order to favour a LTM.

A concomitant CFC reconsolidation session, by itself, does not allow LTM formation of a very weak SOR training

The above finding that animals that do not form STM also do not seem to set a learning tag is consistent with previous studies (Moncada et al., 2011) (Figure 3*a*). Therefore, we would expect that *very* weak training, which is insufficient to induce STM, will not set a learning tag. We trained animals in a *very* weak SOR protocol (vwSOR), in which no previous familiarization (pre-habituation) was done. Without any spatial map of the context, it seems to be harder to make precise associations among objects and the environment. Accordingly, this vwSOR training was not able to induce STM ($p = 0.286$, paired *t*-test) as depicted in Figure 4*a*. With this protocol, a concomitant CFC reconsolidation session did not allow vwSOR-LTM formation ($p = 0.605$, paired *t*-test) and animals were not distinguishable from controls ($p = 0.543$, independent *t*-test), suggesting the absence of vwSOR tagging (Figure 4*b*). This indicate that CFC reconsolidation – with its associated PRPs – would not be able to assist LTM formation if SOR training does not set a learning tag.

A concomitant CFC reconsolidation session allows LTM formation of a very weak SOR training only if NMDA receptors are partially activated

Consistent with the previous experiments, vwSOR training may not be able to set a learning tag due to insufficient NMDA activation, and it is reasonable to hypothesize that the facilitation of its activity would allow the tagging process. To verify this, the NMDA partial agonist D-cycloserine (DCS) was intraperitoneally (i.p) injected (15 mg/Kg) 30 min prior to vwSOR training, and a test, performed 1h (STM) or 24h (LTM) later (Figures 5a and 5b): DCS injection propitiated STM formation ($p = 0.019$, paired t -test), but not LTM ($p = 0.176$, paired t -test) and the Control group expressed neither STM nor LTM ($p > 0.26$, paired t -test). We then evaluated if CFC reconsolidation could allow LTM formation of a vwSOR training performed under these conditions (Figure 5c). Paired t -test showed that animals injected with DCS and exposed to CFC reconsolidation, expressed significant vwSOR-LTM ($p < 0.001$). Animals that only received vehicle, however, did not show LTM ($p = 0.689$). Furthermore, two-way ANOVA revealed a significant effect of Group (Control or +Reconsolidation): $F_{1,27} = 5.85$, $p = 0.023$; Drug (Veh or DCS): $F_{1,27} = 6.62$, $p = 0.016$; and Group x Drug interaction: $F_{1,27} = 7.19$, $p = 0.012$. Tukey's *post-hoc* test demonstrated that the +Reconsolidation-DCS group differed from all others ($p < 0.01$). No effect was found for the +Reconsolidation-Veh group compared with the Control group, indicating that the effect of DCS must be contingent with reconsolidation in order to allow LTM formation in vwSOR training (Figure 5c).

Taken together, these results suggest that enhancement of NMDA activity was enough to enable tagging by a vwSOR training, as well as to promote STM. Supposedly, the PRPs synthesized by CFC reconsolidation may be being captured by the vwSOR synapses, which allows LTM formation.

A concomitant Water Maze reconsolidation session allows LTM formation of a weak SOR training

It was further evaluated whether reconsolidation of another hippocampus-dependent learning paradigm such as the Morris Water Maze (WM) could also induce wSOR-LTM formation. Animals were trained for 5 days on the WM, and 3 days later, the wSOR training began. One hour after wSOR training, animals were submitted to a WM reactivation session (without platform), which would undergo memory reconsolidation (data not shown) exactly

like Rossato et al. (2006) have observed before. Figure 6 shows that WM reconsolidation allowed wSOR-LTM formation ($p < 0.001$, paired t -test). Control animals that were not exposed to WM reconsolidation did not express LTM ($p = 0.819$, paired t -test). Further analysis showed that the Reconsolidation group expressed better memory retention than the Control group ($p = 0.009$, independent t -test). Since WM is a task substantially different from CFC, these results suggest that the LTM-assisting effect could be a general property of memory reconsolidation.

A concomitant CFC extinction session also allows LTM formation of a weak SOR training

Since extinction of a given memory is a process that requires protein synthesis (Suzuki et al., 2004), we tested if it could also allow LTM formation of wSOR training. Animals (previously conditioned on CFC) were trained in wSOR, and 1 h later were reexposed to the CFC context for 30 min, which induced memory extinction (data not shown), replicating previous observations of our lab (De Oliveira Alvares et al., 2008). CFC extinction allowed wSOR-LTM formation ($p = 0.026$, paired t -test). Control animals that were not exposed to CFC extinction did not express LTM ($p = 0.722$, paired t -test). Further analysis showed that the Extinction group expressed better memory retention than the Control group ($p = 0.007$, independent t -test) as depicted in Figure 7. These results add to the previous findings in this work suggesting that PRPs synthesized as consequence either of a reconsolidation or extinction session can be captured and used in order to allow LTM formation of a otherwise weak learning.

Discussion

Our data shows that a CFC reconsolidation session taking place in the vicinity of wSOR training can allow LTM formation. In normal conditions, that experience would normally be forgotten within 24 h. Consistent with an STC process, the effect was observed only during a critical time window and was dependent on the CFC reconsolidation-related protein synthesis (Figure 1). The possibility that this protein synthesis was induced by the wSOR is negligible since Ballarini et al. (2009) have shown that inhibition of protein synthesis have no effect when administered right before the very same weak training (wSOR). We have also found that the inactivation of the NMDA receptor by AP5 prevented wSOR training to establish a LTM: this supports the idea that AP5 prevented wSOR training from setting a learning tag, and, consequently, the PRPs provided by CFC reconsolidation failed to allow LTM by themselves (Figure 3). On the other hand, the enhancement of NMDAR activity by DCS allowed a wSOR training to set a learning tag that, with a concomitant CFC reconsolidation session, was able to promote LTM formation (Figures 4 and 5). In addition, the concomitant reconsolidation of WM, a qualitatively different, less aversive task, or even the extinction of CFC, a different process that, however, also involves protein synthesis, were both also able to allow LTM formation of wSOR training (Figures 6 and 7), indicating that, independent from which origin the proteins have, if PRPs are available, they can be used for LTM maintenance.

Taken together, these results strongly suggest that SOR-LTM formation is sustained by a synaptic tagging and capture process. The STC hypothesis has recently been applied to understand learning and memory process, and proposes that both synaptic tag setting and PRPs availability are necessary for LTM formation (Ballarini et al., 2009). Trying to interpret our results according to the STC framework prompted us to sort out our experimental groups into four expected conditions: (1) Neither TAG nor PRPs; (2) TAG only; (3) PRPs only; or (4) Both TAG and PRPs present during SOR training (Figure 8, upper panel). We then compared the overall mean performance on a SOR-LTM test in the four conditions (Figure 8, lower panel). As predicted by the STC hypothesis (Frey and Morris, 1997; Barco et al., 2008; Redondo and Morris, 2011), SOR-LTM is obtained only if both TAG and PRPs are available during learning, and our results as a whole provide further support for the idea that a STC process may underlie LTM formation *in vivo* (Martin et al., 2000; Frey and Frey, 2008; Redondo and Morris, 2011).

Electrophysiological experiments have shown that PKA and α CaMKII activity is necessary for the tagging process in CA1-LTP (Young et al., 2006; Redondo et al., 2010). In accordance with this, we found that the NMDA receptor (which triggers the activation of α CaMKII and PKA) was necessary to set learning tags (Figures 3 and 5), as also previously observed (Moncada et al., 2011). PRPs that have been implicated in learning and plasticity include the activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), Homer1a, and the AMPAR (α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate receptor) subunit Glur1 (Lanahan and Worley, 1998; Miyashita et al., 2008). PRPs seem to have overlapping effects acting upon different forms of plasticity. Cross-tagging experiments have shown that E-LTP can be transformed into L-LTP by prior long-term depression (LTD), showing that LTD can provide the PRPs necessary for L-LTP maintenance (Sajikumar and Frey, 2004; Barco et al., 2008; Sajikumar and Korte, 2011). Interestingly, we have found that inhibitory learning (CFC extinction) was also able to allow LTM formation of wSOR (Figure 7), which is consistent with the recent demonstration that novelty can promote consolidation of a weak extinction memory (Myskiw et al. 2013). These results suggest that an analogous cross-tagging process could also be taking place *in vivo*.

To date, relevance of an STC hypothesis for learning and memory has been tested through the association of novelty, such as Open Field exploration, to a weak training protocol previously only able to induce STM. Novelty was shown to allow LTM formation of several learning paradigms, such as inhibitory avoidance (Moncada and Viola, 2007; Lu et al., 2011; Moncada et al., 2011), spatial object recognition, contextual fear conditioning, taste aversion (Ballarini et al., 2009), water maze task (Almaguer-Melian et al., 2012), an “everyday memory” model (Wang et al., 2010), and memory extinction (Myskiw et al., 2013). In accordance to this hypothesis, novelty induces PRPs synthesis, and these proteins are then captured by the weak experience tags. However, as pointed out by Wang and collaborators, an alternative account is possible for such results: novelty could simply enhance memory consolidation by up-regulating neurotransmission in the amygdala (e.g., via β -adrenergic receptors) or stress hormones (e.g., via glucocorticoid receptors), a process that would not require the concept of synaptic tag and capture (Gold and McGaugh, 1975; Cahill and McGaugh, 1998; De Oliveira Alvares et al., 2010; Wang et al., 2010). However, this does not seem to be the case here, since both in the nimodipine experiment (Figure 2A) and in the simple CFC retrieval (Figure 2B) – two situations in which the emotional, amygdala-mediated responses were not affected - wSOR-LTM formation was not allowed. It is worth noticing

that in those conditions, despite the fear response being retrieved, this memory trace does not undergo reconsolidation.

The promoting effect of a concomitant Open Field (OF) exploration was absent when the environment was already familiar to the animals (they are exposed twice to the OF) (Moncada and Viola, 2007; Ballarini et al., 2009; Wang et al., 2010; Almaguer-Melian et al., 2012; Myskiw et al., 2013). Somewhat contrary to this, in our experiments a consistent assisting effect was observed when previously trained animals were submitted to a reexposition session that was able to induce, either memory reconsolidation, or extinction. It remains to be demonstrated that the exploration of a familiar OF does not result in memory reconsolidation, but it has been shown that there are many experimental conditions under which reconsolidation does not seem to take place (Wang et al., 2009; Sevenster et al., 2012), and this being the case, PRPs would not be available to allow LTM consolidation of a different, weak learning.

The STC hypothesis may explain why memory of apparently unimportant things can be stored when it occurs in contingency with surprising or emotionally significant events (Wang et al., 2010). An example of this is the interesting halo of accompanying memories surrounding “flashbulb memories” (Stratton, 1919; Brown and Kulik, 1977) that happen around very significant events such as the 9/11 attacks in 2001. Classically, this phenomenon is explained by emotional modulatory mechanisms, but there is some evidence now that STC could also be a plausible explanation, at least in some cases. In the present study, we provide evidence that the concomitant reconsolidation or extinction of different learnings can supply the same LTM-allowing effect in order to record an otherwise weak learning. This implies that when one memory is updated or reinforced by reconsolidation, or inhibited by the extinction process, weak events experienced closely in time can form persistent memories that ordinarily would not last, due to the capture of the PRPs produced by those concomitant processes.

In conclusion, our results demonstrate for the first time that memory reconsolidation (or extinction) can allow the consolidation of a concomitant weak learning, probably through a synaptic tagging and capture process. Consequently, the response to a particular stimulus would depend on the effective reactivation of a previous, stronger memory. These findings reinforce the hypothesis that STC is an integral component of the underlying mechanisms of LTM formation, and allow new insights concerning the influence of reconsolidation in the acquisition of memories of otherwise unrelated events during daily life situations.

References

- Almaguer-Melian W, Bergado-Rosadoa J, Pavón-Fuentesb N, Alberti-Amadorc E, Mercerón-Martínezd D, Frey JU. 2012. Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:953-958.
- Ballarini F, Moncada D, Martinez MC, Alen N, Viola H. 2009. Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14599–14604.
- Barco A, Lopez de Armentia M, Alarcon JM. 2008. Synapse-specific stabilization of plasticity processes: The synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neurosci Biobehav Rev* 32:831–851.
- Brown R, Kulik J. 1977. Flashbulb memories. *Cognition* 5:73–99.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34:446-457.
- Bustos SG, Giachero M, Maldonado H, Molina VA. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology* 35:1097-10108
- Cahill L, McGaugh JL. 1998. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21:294–299.
- de Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA. 2008. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154:1648-1655.
- de Oliveira Alvares L, Engelke DS, Diehl F, Scheffer-Teixeira R, Haubrich J, Cassini LF, Molina VA, Quillfeldt JA. 2010. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learn Mem* 17:202-209.
- de Oliveira Alvares L, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092-1095.
- de Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. *In press*.
- Dudai Y. 2012. The Restless Engram: Consolidations Never End. *Annu Rev Neurosci* 35:227-247.
- Flavell CR, Barber DJ, Lee JL. 2011. Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nat Commun* 2:1-9.

- Frey S, Frey JU. 2008. “Synaptic tagging” and “cross-tagging” and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation. *Prog Brain Res* 169:117–143.
- Frey U, Morris RG. 1997. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533–536.
- Frey U, Morris RG. 1998a. Synaptic tagging: Implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* 21:181–188.
- Frey U, Morris RG. 1998b. Weak before strong: Dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology* 37:545–552.
- Gold PE, McGaugh JL. 1975. A single-trace, two-process view of memory storage processes. In: Deutsch D, Deutsch JA, editors. *Short-Term Memory*. New York: Academic Press. p 355–378
- Lanahan A, Worley P. 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem* 70:37–43.
- Lu Y, Ji Y, Ganesan S, Schloesser R, Martinowich K, Sun M, Mei F, Chao MV, Lu B. 2011. TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *J Neurosci* 31:11762–11771.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. 2000. Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649–711.
- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF. 2008. Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 89:269–284.
- Moncada D, Viola H. 2007. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: Evidence for a behavioral tagging. *J Neurosci* 27:7476–7481.
- Moncada D, Ballarini F, Martinez MC, Frey JU, Viola H. 2011. Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proc Nat Acad Sci USA* 108:12931–12936.
- Myskiw JC, Benetti F, Izquierdo I. 2013. Behavioral tagging of extinction learning. *Proc Nat Acad Sci USA* 110: 1071–1076
- Nadel L, Hupbach A, Gomez R, Newman-Smith K. 2012. Memory formation, consolidation and transformation. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1640–1645.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Redondo RL, Okuno H, Spooner PA, Frenguelli BG, Bito H, Morris RG. 2010. Synaptic tagging and capture: Differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 30:4981–4989.

- Redondo RL, Morris RG. 2011. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 12:17-30.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2006. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13:431-440.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. 2010. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21801-21805.
- Sajikumar S, Frey JU. 2004. Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem* 82:12-25.
- Sajikumar S, Korte M. 2011. Metaplasticity governs compartmentalization of synaptic tagging and capture through brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and protein kinase Mzeta (PKMzeta). *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2551-2556.
- Sevenster D, Beckers T, Kindt M. 2012. Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 97:338-45.
- Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. 2013. Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem. Accepted.*
- Stratton GM. 1919. Retroactive hypermnesia and other emotional effects on memory. *Psychol Rev* 26:474-486.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.
- Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem* 15:426-433.
- Tronson NC, Taylor JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8:262-275.
- Wang SH, de Oliveira Alvares L, Nader K. 2009. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci* 12:905-912.
- Wang SH, Redondo RL, Morris RG. 2010. Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19537-19542.
- Young JZ, Isiegas C, Abel T, Nguyen PV. 2006. Metaplasticity of the late-phase of long-term potentiation: A critical role for protein Kinase A in synaptic tagging. *Eur J Neurosci* 23:1784-1794.

Figures

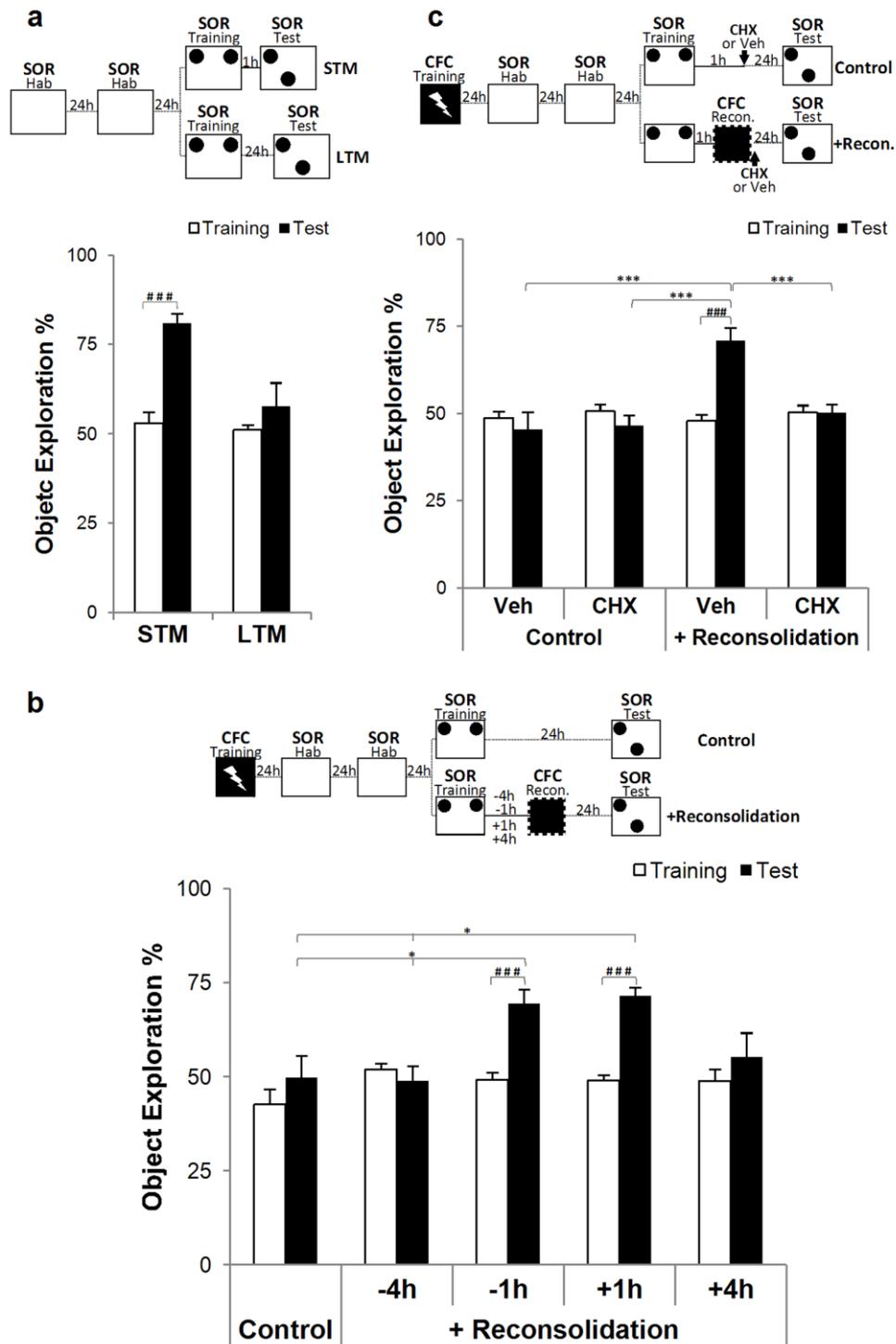


Figure 1 (Figura 3.1). CFC reconsolidation allows wSOR-LTM. All graphs show percent exploration time of the object switched to a new location in the test session, expressed as mean \pm SEM. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, wSOR training induced STM, but not LTM. **b**, CFC Reconsolidation performed 1 h, but not 4 h, before or after wSOR training, allowed wSOR-LTM. **c**, Infusion of CHX in CA1 immediately after reexposure to the CFC context completely blocked its assisting effect on wSOR-LTM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{###} $p < 0.001$. All other comparisons were not significant. $n = 7-14$ per group.

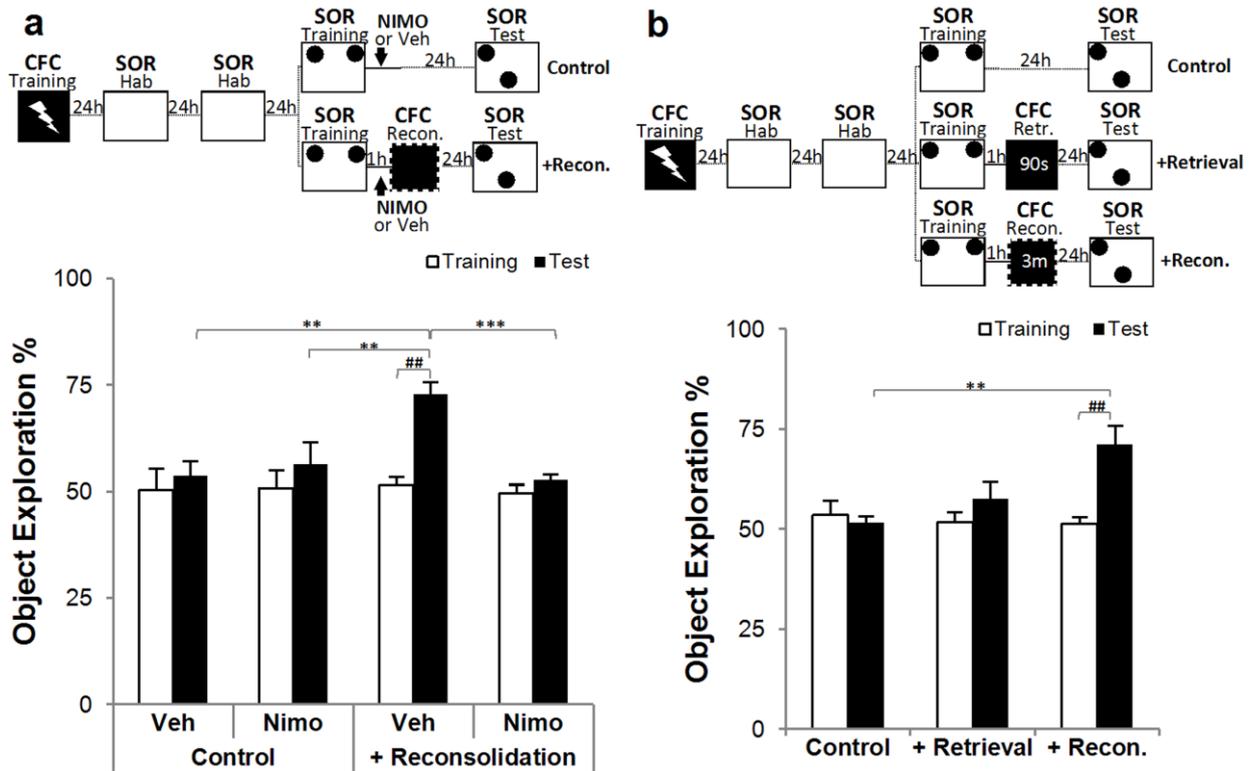


Figure 2 (Figura 3.2). CFC retrieval by itself does not allow wSOR-LTM. All graphs show percent exploration time of the object switched to a new location in the test session, expressed as mean \pm SEM. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, Nimodipine s.c injection 30 min before CFC context reexposure completely blocked its assisting effect on wSOR-LTM. **b**, Short reexposure to CFC context (90 sec) did not induce wSOR-LTM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ## $p < 0.01$. All other comparisons were not significant. $n = 7-10$ per group.

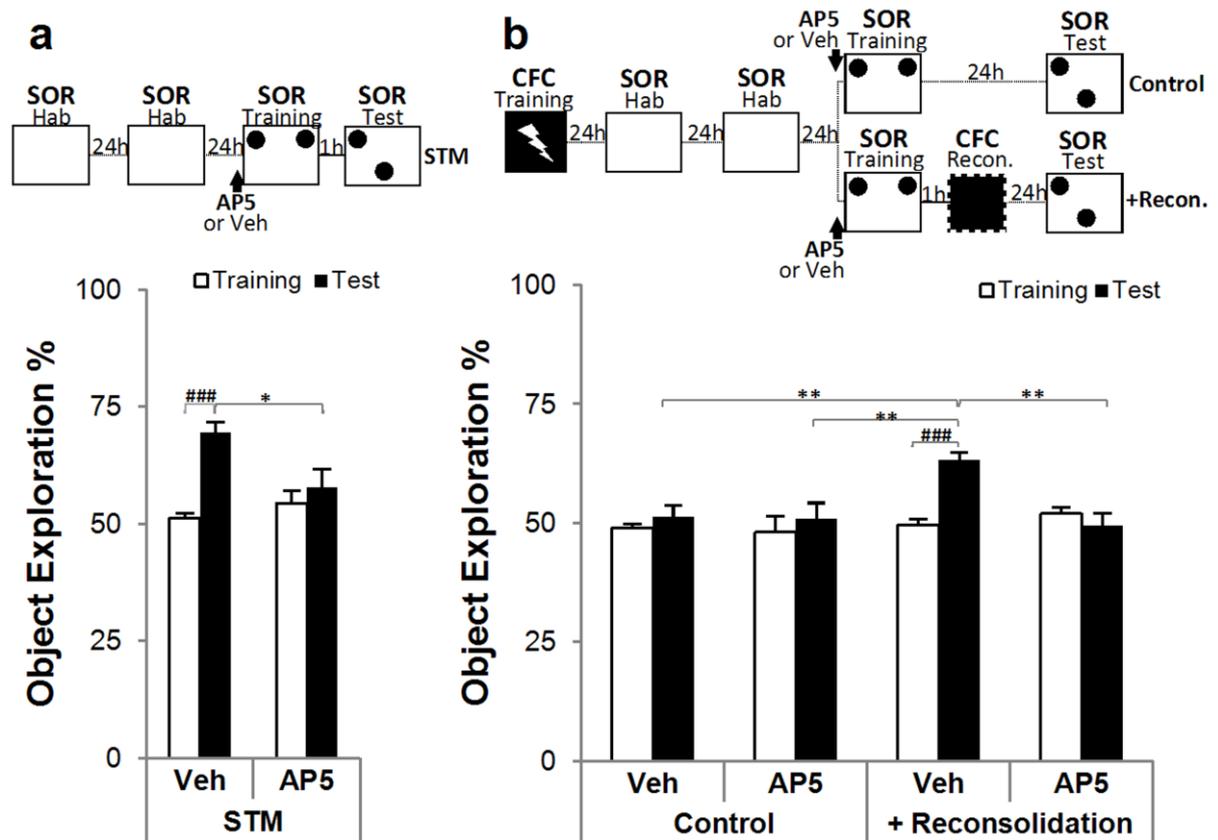


Figure 3 (Figura 3.3). Upon AP-5 effect, CFC reconsolidation does not allow wSOR-LTM. All graphs show percent exploration time of the object switched to a new location in the test session, expressed as mean \pm SEM. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, Infusion of AP5 in CA1 15 min before wSOR training inhibited wSOR-STM. **b**, The assisting effect of CFC reconsolidation was completely blocked by AP5 infusion in CA1 15 min before wSOR training. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. All other comparisons were not significant. $n = 7-13$ per group.

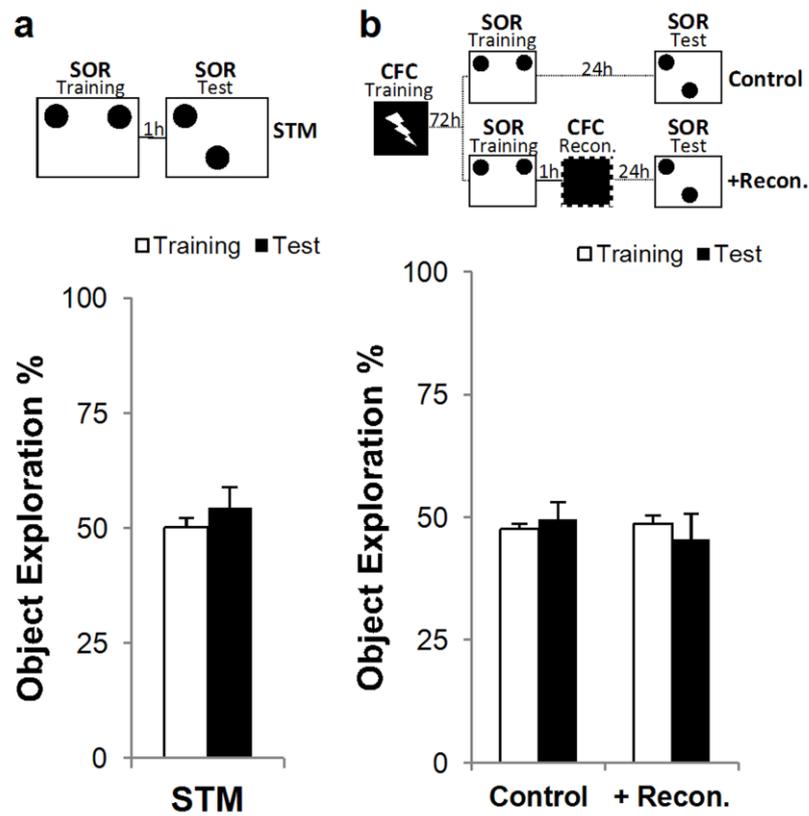


Figure 4 (Figura 3.4). CFC reconsolidation does not allow vwSOR-LTM. All graphs show percent exploration time of the object switched to a new location in the test session, expressed as mean \pm SEM. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, vwSOR training did not induce STM. **b**, CFC reconsolidation performed 1 h after vwSOR training did not allow its LTM formation. All comparisons were not significant. $n = 10-12$ per group.

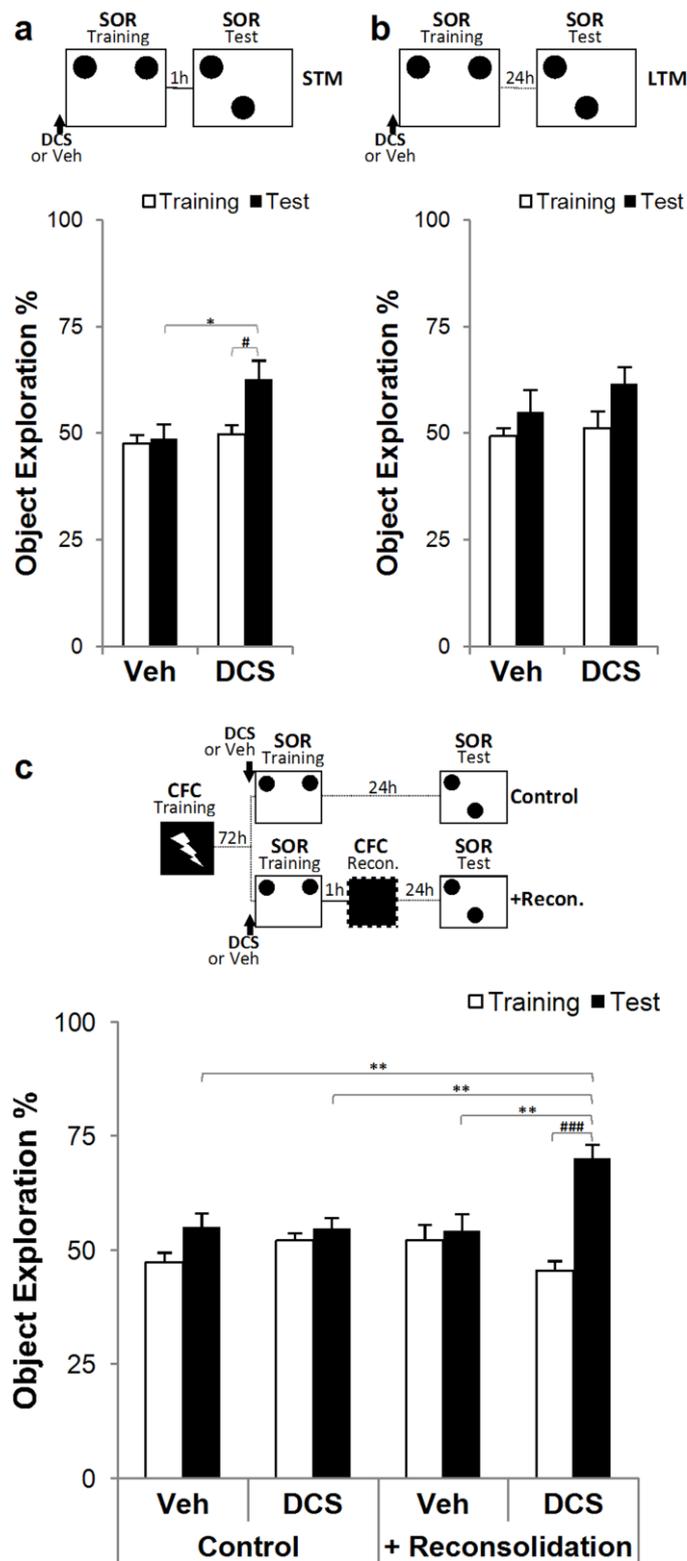


Figure 5 (Figura 3.5). Upon DCS effect, CFC reconsolidation allows vwSOR-LTM. All graphs show percent exploration time of the object switched to a new location in the test session, expressed as mean \pm SEM. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, DCS i.p injection 30 min before vwSOR training allowed STM **b**, but not LTM acquisition. **c**, DCS i.p injection 30 min before vwSOR training allowed CFC reconsolidation to assist LTM formation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$. All other comparisons were not significant. $n = 7-9$ per group.

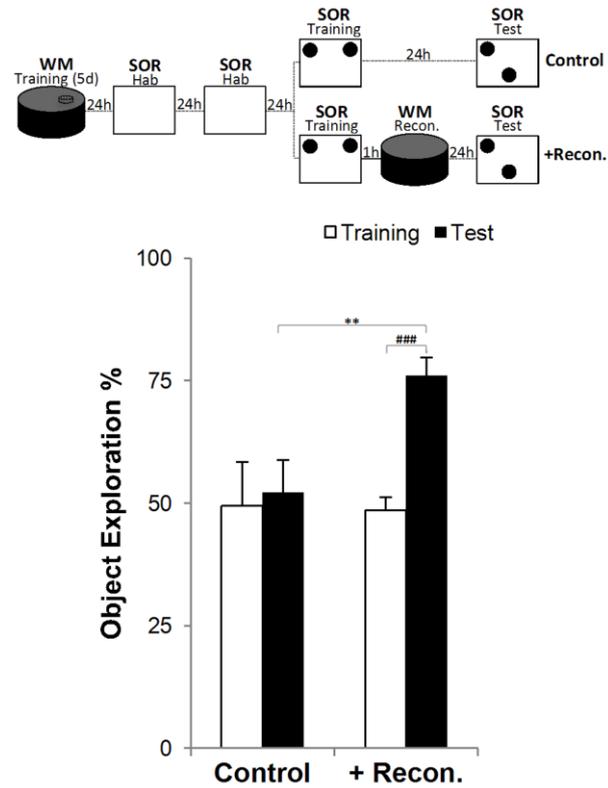


Figure 6 (Figura 3.6). WM reconsolidation performed 1 h after wSOR training allowed its LTM formation. Graph shows percent exploration time of the object switched to a new location in the test session, expressed as mean \pm SEM. The experimental design is shown in the top of the panel. ** $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. All other comparisons were not significant. $n = 7$ per group.

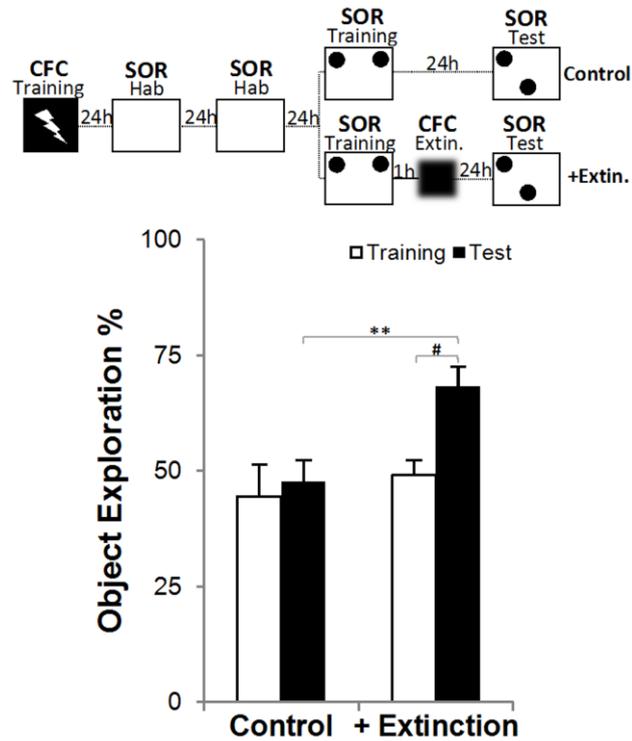


Figure 7 (Figura 3.7). CFC extinction performed 1 h after wSOR training allowed its LTM formation. Graph shows percent exploration time of the object switched to a new location in the test session, expressed as mean \pm SEM. The experimental design is shown in the top of the panel. ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$. All other comparisons were not significant. $n = 7$ per group.

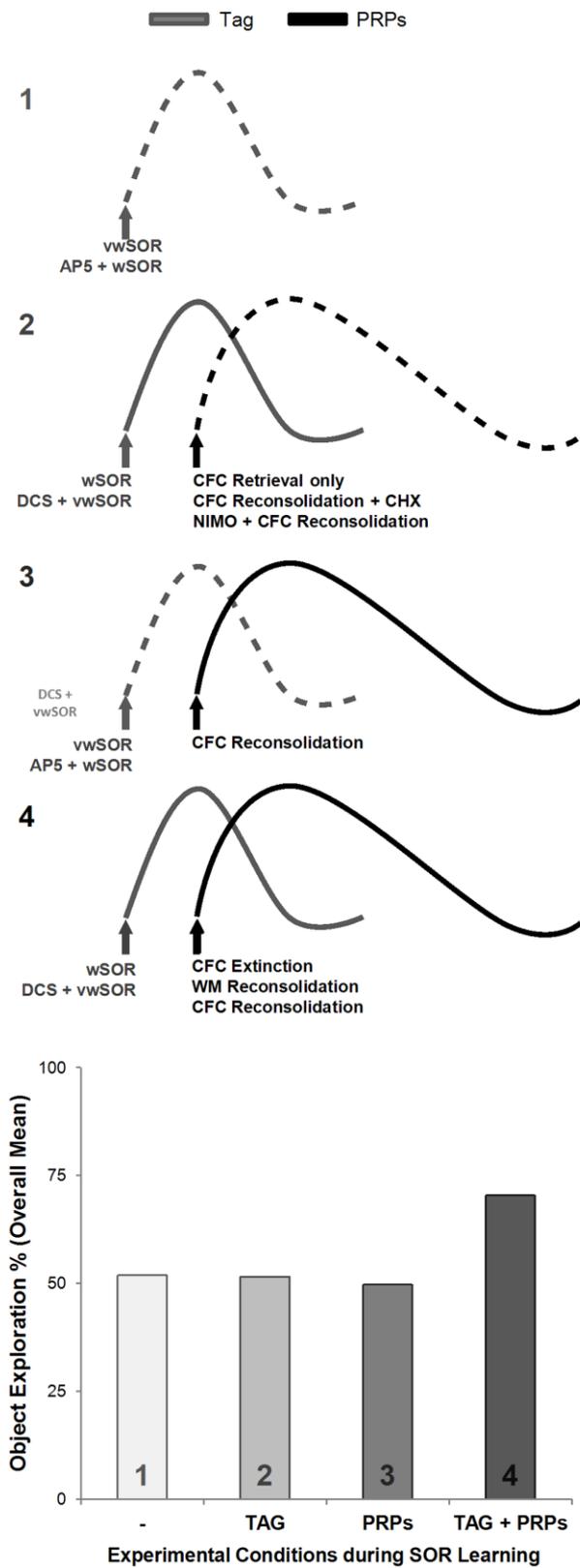


Figure 8 (Figura 3.8). LTM depends on both Tagging and PRPs synthesis for its maintenance. All experimental data was grouped in one of the four possible situations during SOR training and related to overall mean of performance on SOR-LTM test.

4 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho (Quadro 4.1 e Figura 3.8), obtidos mediante diversas manipulações comportamentais e farmacológicas, mostram, em conjunto, que a reconsolidação da memória do Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) pode propiciar a consolidação de um aprendizado fraco concomitante de Reconhecimento Espacial de Objetos (REO), plausivelmente através de um processo de *marcação e captura sináptica* (STC, sigla para *synaptic tagging and capture*). A reconsolidação da tarefa de Labirinto Aquático de Morris (LAM) e a extinção da memória do CAC foram igualmente capazes de induzir esse fenômeno de associação. Discutamos então os presentes resultados e suas implicações de forma mais aprofundada a seguir.

Exp.	Grupo	STM	LTM
1a	REO fraco	✓	✗
1b	REO fraco + Reconsolidação CAC	-	✓
1c	REO fraco + Reativação CAC + CHX	-	✗
2a	REO fraco + Evocação Breve CAC	-	✗
2b	REO fraco + Nimodipina + Evocação CAC	-	✗
3a	AP5 + REO fraco	✗	-
3b	AP5 + REO fraco + Reconsolidação CAC	-	✗
4a	REO muito fraco	✗	-
4b	REO muito fraco + Reconsolidação CAC	-	✗
5a,b	DCS + REO muito fraco	✓	✗
5c	DCS + REO muito fraco + Reconsolidação CAC	-	✓
6	REO fraco + Reconsolidação LAM	-	✓
7	REO fraco + Extinção CAC	-	✓
Obs.	Os grupos controle de cada experimento não estão exibidos, mas repetidamente replicaram o efeito promotor da reconsolidação (1b)		

Quadro 4.1 - Resumo dos experimentos realizados e dos resultados encontrados. O termo *Reconsolidação* engloba todas as etapas prévias: Evocação-Reativação-Reconsolidação. O termo *Reativação* (labilização) da mesma forma engloba: Evocação-Rativação, indicando que a Reconsolidação foi inibida. E o termo *Evocação* apenas, indica que as demais fases foram suprimidas. Elaborado pela autora.

Até o momento, a relevância da hipótese STC para a memória foi testada através da associação de uma novidade a um protocolo de treinamento fraco, ou a um protocolo forte submetido a interferências, suficiente apenas para induzir STM. A novidade foi capaz de propiciar a formação de LTM de vários paradigmas comportamentais como podemos ver na Tabela 1.1. De acordo com a hipótese, a novidade induz a síntese de PRPs, as quais são então capturadas pelos *tags* estabelecidos pelas experiências fracas (ver Figura 1.9). No entanto, como apontado por Wang e colaboradores, a novidade poderia simplesmente facilitar a consolidação da memória *per se*, isto é, pela estimulação da neurotransmissão na amígdala ou pela liberação de hormônios do estresse, um processo que não necessariamente requer o conceito de *marcação e captura sináptica* aqui discutido (Cahill e McGaugh, 1998; de Oliveira Alvares et al., 2010; Wang et al., 2010; Gold e McGaugh, 1975). Uma terceira possibilidade seria o fenômeno envolver um processo STC, mas sem haver um compartilhamento de PRPs, e, sim, uma facilitação da sua síntese pelo próprio evento fraco. Ver Figura 4.1.

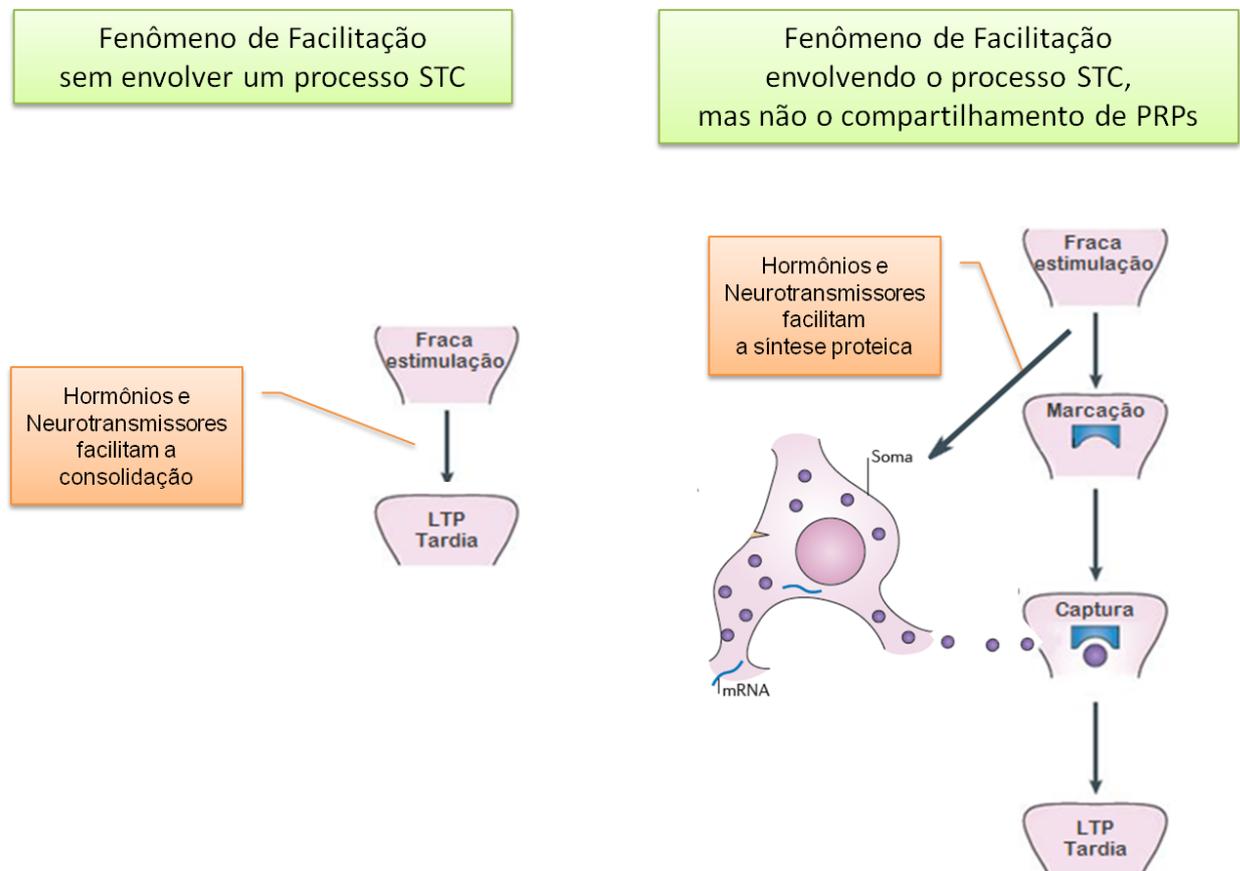


Figura 4.1 - Desenho esquemático de explicações alternativas para os resultados observados neste trabalho e na literatura. Descrição no texto. Adaptado e traduzido de Redondo e Morris (2011).

Esse não parece ser o caso em nossos experimentos, dado que, pela primeira vez, eventos não relacionados com a novidade (reconsolidação e extinção) foram utilizados para “fornecer” PRPs para um aprendizado fraco concomitante. Além do mais, a expressão de medo durante a evocação do CAC não foi capaz de promover por si só o fenômeno de associação, como podemos ver nos experimentos onde a labilização/reconsolidação foi prevenida ou bloqueada (Figuras 3.2 e 3.1C) sem se afetar a resposta aversiva (de Oliveira Alvares et al., 2013, Sierra et al., 2013). Esses resultados, juntamente com diversos experimentos controle existentes na literatura, apóiam a ideia de que o processo STC e o compartilhamento de proteínas seriam uma explicação plausível para o efeito promotor da novidade, previamente observado por outros autores, e o da reconsolidação e da extinção, aqui relatados.

Os estudos com novidade também mostraram que o efeito promotor da exploração do Campo Aberto (CA), ou da apreciação de um Sabor, não se verificava quando o ambiente/estímulo era familiar aos animais (Moncada e Viola, 2007; Ballarini et al., 2009; Almaguer-Melian et al., 2012; Myskiw et al. 2013). Curiosamente, neste trabalho quando os animais foram expostos ao contexto familiar do CAC ou do LAM, um fenômeno de associação consistente foi observado desde que a reexposição fosse suficiente para induzir reconsolidação ou extinção da memória. Dessa forma, surge a questão: por que a reexposição ao CA ou a um Sabor também não induziu o mesmo fenômeno? Está demonstrado que existem muitas condições experimentais sob as quais a reconsolidação parece não ocorrer (Sevenster et al., 2012; Wang et al., 2009). Portanto, é bem plausível que a reexposição ao CA ou Sabor tenha induzido evocação, mas, para estas tarefas e, sob essas condições, sem desencadear um processo de labilização/reconsolidação. Nesse caso, PRPs não seriam disponibilizadas para compartilhamento, e o fenômeno de associação não ocorreria como foi observado. Da mesma forma, a evocação do CAC sem reconsolidação não exerceu qualquer efeito promotor (Figura 3.2). Estas observações indicam que a evocação da memória, como esperado, não pode promover, por si só, o fenômeno de associação propriamente dito.

Neste estudo observou-se que a reconsolidação pode propiciar a consolidação de um aprendizado fraco associado, mas o contrário também seria uma possibilidade interessante. Redondo e Morris (2011) sugeriram recentemente que a reativação da memória poderia envolver um processo de *marcação* sináptica, o qual seria responsável pela labilização do traço mnemônico. Novas PRPs seriam então produzidas e capturadas pelas sinapses marcadas, levando à re-estabilização e manutenção do traço. Se tal processo realmente ocorre, o efeito amnésico de inibidores de síntese proteica poderia teoricamente ser prevenido por uma

experiência forte concomitante, como a novidade ou a reconsolidação/extinção de outra memória. Por outro lado, inibidores específicos da *marcação* sináptica, como a Latrunculina e o KN-93 em baixas doses, poderiam impedir a labilização e conseqüentemente a atualização, a manutenção da precisão e o fortalecimento da memória (Lee, 2008, 2010; de Oliveira Alvares et al., 2012, 2013). Já a facilitação deste processo poderia permitir a labilização de memórias resistentes, como as traumáticas e as antigas (Costanzi et al., 2011; Frankland et al., 2006), e, assim, torná-las novamente vulneráveis e sensíveis a intervenções.

Outra questão intrigante acerca dos resultados encontrados surge de um trabalho publicado por Lee em 2004. Nesse trabalho foi demonstrado que a consolidação do CAC depende da expressão de BDNF, mas não do fator de transcrição Zif268. Já a reconsolidação induz e depende da expressão de Zif268, mas não depende de BDNF. Na sequência, Lee (2010) replicou os resultados em um paradigma comportamental semelhante: Efeito Facilitador da Pré-exposição ao Contexto. Nessa tarefa os animais são expostos a um contexto e no dia seguinte retornam ao ambiente e recebem imediatamente um choque nas patas. A memória contextual inicialmente neutra (dependente de BDNF, mas não de Zif268) é, assim, atualizada e passa a se tornar aversiva através de um mecanismo de reconsolidação (dependente de Zif268, mas não de BDNF). Além do mais, a fase de consolidação induziu a síntese de BDNF, mas não de Zif268, enquanto que a reconsolidação induziu a síntese de Zif268, mas não de BDNF:

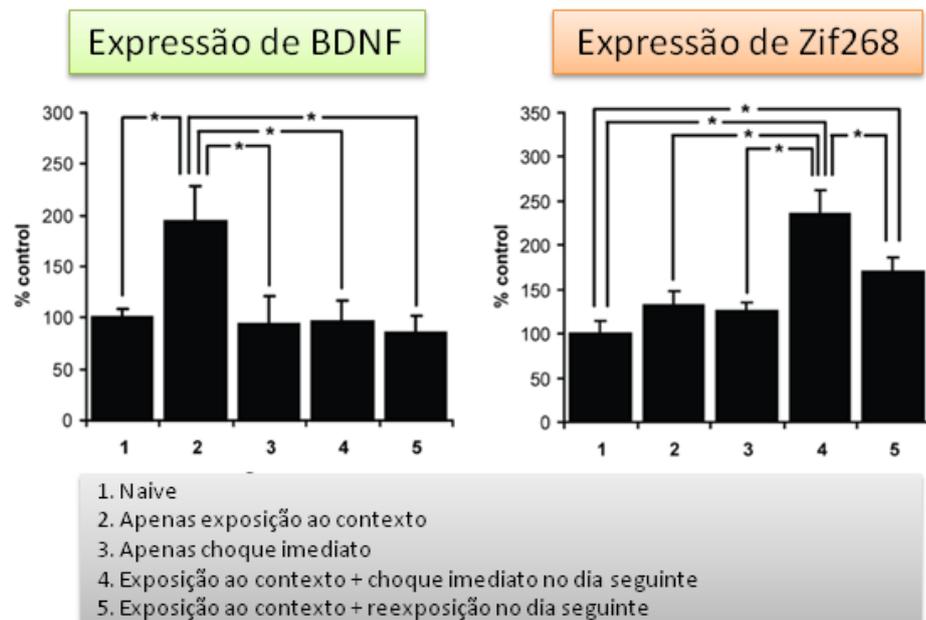


Figura 4.2 - Expressão seletiva de BDNF e Zif268 durante a consolidação e a reconsolidação da memória. Descrição no texto. Adaptado de Lee (2010).

Ora, se a formação de LTM depende de BDNF e se a reconsolidação não induz a síntese dessa molécula, como então ocorreu o fenômeno de associação observado neste trabalho? Algumas explicações interessantes, que merecem maior investigação, podem ser apontadas: (1) apesar de a consolidação necessitar de BDNF, é possível que, na ausência deste, outras proteínas como o próprio Zif268 sejam suficientes para a formação de LTM; (2) apesar de a reconsolidação do CAC não depender da síntese de BDNF é possível que ainda assim leve à sua expressão; (3) talvez a consolidação da memória de Reconhecimento de Objetos Espacial, ou especificamente o seu protocolo fraco, não dependam da expressão de BDNF; (4) é possível ainda que a informação espacial acerca dos objetos envolva a atualização da memória contextual prévia, através de mecanismos mais semelhantes à reconsolidação do que à consolidação. De qualquer forma, nossos resultados sugerem que esses eventos de características moleculares e comportamentais distintas ainda assim compartilhem semelhanças gerais o suficiente para possibilitar a associação entre ambos.

Da mesma forma, nós observamos que a extinção do CAC, apesar de sua natureza inibitória, foi também capaz de propiciar a consolidação do REO. Por outro lado, também é possível promover a consolidação de uma extinção fraca do CAC através da novidade (Myskiw et al., 2013). Curiosamente, a extinção é um aprendizado com características peculiares que poderia teoricamente envolver mecanismos semelhantes ao da Depressão de Longa Duração (LTD) (Shaw et al., 2012; Tsetsenis et al., 2011), um fenômeno eletrofisiológico que opostamente à LTP, causa depressão da resposta sináptica (Bear et al., 2008). Apesar das diferenças entre essas duas formas de plasticidade, foi observado que uma LTD pode promover a formação da LTP, e vice-versa, em um fenômeno conhecido como *cross-tagging* ou *cross-capture* (Sajikumar e Korte, 2011; Barco et al., 2008). Portanto, o fenômeno de associação envolvendo a extinção aqui descrito pode vir a representar, com mais estudos no futuro, um processo *in vivo* de *cross-tagging*.

Como vimos, é possível interpretar a observação de que o treino fraco do REO levou à formação de uma LTM através da “captura” de PRPs produzidas durante a reconsolidação do CAC. Se isso é verdade, é plausível supor que a memória do CAC poderia de alguma forma ser prejudicada por essa associação... Mas ao que tudo indica, não é o que acontece: os animais do experimento 1b, que foram treinados no REO e submetidos à reconsolidação do CAC, não demonstraram nenhum prejuízo da memória em um teste realizado no dia seguinte (ver Figura 4.3). O que está de acordo com experimentos eletrofisiológicos, onde normalmente não se observa prejuízo da LTP induzida por um estímulo forte, quando associada a outro fraco. No entanto, os experimentos deste trabalho não foram desenhados

para testar essa hipótese e, portanto, faltam grupos controle (como reconsolidação apenas, sem treino no RO) para permitir comparações e conclusões mais seguras.

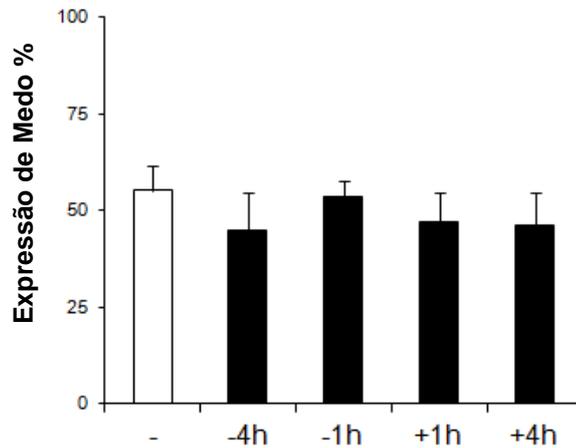


Figura 4.3 - Teste da memória do CAC 24h após o experimento 1b. Os animais foram treinados no protocolo fraco do REO e submetidos a uma sessão de reconsolidação do CAC 4h ou 1h antes, ou, 1h ou 4h após o treino. O grupo controle não foi submetido à reconsolidação. No dia seguinte os animais foram reexpostos ao contexto do CAC por 4min e a expressão de medo (*freezing*) foi quantificada. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0.81$, ANOVA de uma via). $n = 7-9$ por grupo.

Podemos assim dizer que houve uma interação positiva entre o CAC e o REO: o aprendizado fraco pôde gerar uma memória duradoura e a memória forte aparentemente não foi afetada. Mas e se as duas experiências fossem fortes? E se fossem muito semelhantes? E a memória do REO, é tão forte e persistente quanto seria se o próprio treino tivesse propiciado a LTM? Afinal, o que determina qual, e como, será a interação entre dois eventos próximos no tempo? É possível, por exemplo, que a interação entre dois eventos fortes seja inibitória, ou, reforce a expressão da LTM de uma ou ambas as memórias. Ou ainda, como observado por Almaguer-Melian em 2012, é possível que não cause nenhum efeito inicialmente, mas venha a facilitar a persistência mais adiante. Além do mais, a associação entre aprendizados muito similares, como dois treinos de LAM ou de CAC em contextos diferentes, poderia causar interferência e/ou a generalização das memórias. Da mesma forma, a interação imediata entre uma experiência e outra mostrou não ter efeito, mesmo quando o fenômeno de associação era esperado (Moncada e Viola, 2007; Ballarini et al., 2009). Futuros estudos, mais abrangentes, poderão demonstrar interações cada vez mais complexas entre diferentes estímulos e os fatores que os influenciam.

Também mencionamos inicialmente que um requisito imprescindível para o fenômeno de associação é a coincidência espacial e temporal entre as vias estimuladas. Em experimentos eletrofisiológicos esse requisito é facilmente assegurado pela citoarquitetura simples do hipocampo e pelas técnicas precisas de estímulo e registro (Figura 1.8). Comportamentalmente apenas podemos assegurar que as duas experiências sejam dependentes da mesma estrutura, mas, é difícil, por hora, saber se estão realmente ativando a mesma população neuronal. Modelos computacionais e estudos experimentais de “alocação de memórias” (*memory allocation*) mostram que neurônios mais ativos num dado momento têm mais chances de serem recrutados durante a aquisição de uma memória (Silva et al., 2009; Zhou et al., 2009). Ver Figura 4.4.

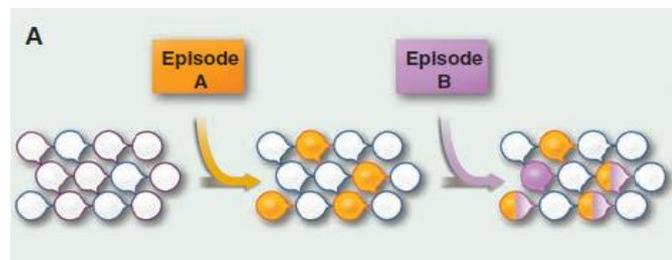


Figura 4.4 - Desenho esquemático do modelo de *alocação de memórias*. Descrição no texto. Adaptado de Silva et al. (2009).

Dessa forma podemos esperar que quando uma memória fraca é codificada, é provável que a exposição a uma novidade próxima no tempo venha a recrutar uma rede neural similar e parcialmente sobreposta, a ponto de permitir o fenômeno de associação observado nos estudos até então publicados. No entanto, é lógico esperar que a reconsolidação do CAC envolva a ativação de um engrama *já* previamente estabelecido. Então, como esse evento passaria a recrutar a mesma população neural da memória do REO que ocorreu antes desse processo? Essa é uma questão intrigante e muito difícil de responder... O primeiro passo seria constatar que os dois eventos, apesar da aparente incoerência, compartilham ao menos parte da mesma população neuronal (a estrutura anatômica já sabemos ser a mesma, pelo menos). O grau de co-localização poderia ser analisado por meio da marcação diferencial dos neurônios ativados por uma e por outra experiência, através da dupla-marcação fluorescente com hibridização *in situ* para RNA mensageiro de c-fos e imunohistoquímica para pCREB (Zaidi et al., 2000). Com esses resultados seria possível então especular e avaliar que mecanismos permitiriam tal fenômeno. A ausência dessas observações diretas não invalidam os dados e hipóteses aqui apresentados, apoiados por uma boa gama de evidências teóricas e

experimentais, mas, com certeza acrescentariam muito ao entendimento dos nossos resultados e do processamento da memória em geral.

Também é digno de nota o efeito encontrado pela inibição e pela ativação parcial do receptor NMDA. Nós observamos que o receptor está envolvido no processo de *marcação* sináptica, e, ao mesmo tempo, também é necessário para a expressão de STM, como já observado anteriormente (Moncada et al., 2011). De acordo com a atual hipótese STC, o estabelecimento de um *marcador* sináptico e a expressão da LTP precoce são eventos paralelos e, até certo ponto, independentes. Assim, seria correto esperar que a inibição do processo de *marcação* não afetasse a expressão da STM, e vice versa. Esses mecanismos são ilustrados no [Vídeo 3](#) da revista *Nature* (ver Referências).

No entanto, o receptor NMDA possui características que o colocam em uma posição privilegiada nos eventos de plasticidade sináptica. Esse receptor é o que chamamos de um *detector de coincidência* e só é ativado a partir de um nível alto de excitação neuronal (Bear et al., 2008). Então, mesmo que o processo de *marcação* não seja necessário para a expressão da STM, é de se esperar que, se o receptor não está ativo o suficiente para induzir a expressão de STM, também não o estará para induzir a *marcação* sináptica, e vice-versa. Esse receptor parece estar no topo das vias bioquímicas que levam a diferentes formas de plasticidade, funcional e estrutural, e, portanto, podemos esperar que a sua manipulação afete todos os processos à jusante. De acordo com essa “posição”, a inibição dos receptores NMDA também prejudicaria a síntese de PRPs (Moncada e Viola, 2007; Izquierdo e Medina, 1995; Igaz et al., 2002). Não chegamos a afetar mais essa função, no entanto, dado que o aprendizado do REO já não era forte o suficiente para induzir síntese proteica.

Da mesma forma, a ativação farmacológica do receptor NMDA com o agonista parcial D-cicloserina (DCS) foi suficiente apenas para possibilitar a expressão da *marcação* e da STM. Mas uma ativação total certamente afetaria todas as múltiplas funções desse receptor. Já se afetássemos o processo mais adiante na cadeia de eventos bioquímicos, é provável que o efeito fosse mais específico. A inibição leve da proteína CaMKII ou do processo de polimerização da actina, por exemplo, inibe a *marcação* sináptica, mas não afeta a expressão da LTP precoce. (Ramachandran e Frey, 2009; Redondo et al., 2010). Apesar de a manipulação do receptor NMDA possuir efeitos amplos e não muito específicos, traz vantagens práticas que são úteis e suficientes para uma primeira análise do fenômeno de associação. Nessa situação a ausência de STM, por exemplo, é utilizada como um indicativo de que o *marcador* sináptico também não deve estar presente, e vice-versa. No entanto, em

estudos futuros mais aprofundados seria interessante a utilização de ferramentas mais específicas.

É importante também ressaltar a relevância do fenômeno de associação aqui abordado para a aquisição e formação de memórias ao longo da vida. Esse fenômeno poderia explicar porque memórias de eventos aparentemente sem importância acabam sendo armazenadas quando em contingência de situações emocionalmente significativas (Wang et al., 2010). Um bom exemplo são as recordações associadas ao dia 09 de Novembro de 2001. Boa parte das pessoas não se recorda de detalhes do cotidiano do dia anterior, muito menos de anos atrás. Mas muitos se lembrarão onde estavam e o que estavam fazendo no momento em que receberam a notícia do ataque às torres gêmeas dos EUA, um fenômeno conhecido na literatura como *flashbulb memories* (Brown e Kulik, 1977; Stratton, 1919). Experimentos comportamentais têm demonstrado, como vimos, que a exposição a uma novidade é capaz de promover um efeito promotor semelhante através de um provável processo STC. No presente estudo, nós fornecemos a primeira evidência de que outros eventos fortes, como a reconsolidação de uma memória, ou a sua extinção, podem, da mesma forma induzir o armazenamento de aprendizados fracos concomitantes. Esses resultados implicam que, quando uma memória é atualizada ou reforçada pela reconsolidação, ou suprimida pela extinção, eventos não relacionados vivenciados próximo no tempo poderiam formar memórias persistentes, as quais, normalmente, seriam esquecidas em pouco tempo.

Em seu conjunto, enfim, esse trabalho traz novas ideias e contribuições significativas para o estudo dos processos de aprendizado e memória. Reforça a hipótese de que esses processos envolvem mecanismos de *marcação e captura sináptica*, e, adicionalmente, de que a aquisição de um aprendizado pode não depender apenas das características da própria experiência (força, repetição, relevância, etc.), mas também da atividade neural prévia e futura contígua a esse evento.

5 CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados nos permitem concluir especificamente que:

- A reconsolidação do CAC pode propiciar a formação de LTM de um treino fraco de REO, em uma janela de tempo restrita e dependente de síntese proteica.
- A evocação do CAC por si só, sem o processo de labilização/reconsolidação, não pode promover esse fenômeno de associação.
- A ativação do receptor NMDA durante o aprendizado fraco do REO é necessária para o fenômeno de associação.
- A reconsolidação do CAC não pode propiciar a formação de LTM de um aprendizado muito fraco de REO.
- A facilitação farmacológica do receptor NMDA durante o treino muito fraco de REO possibilita o fenômeno de associação.
- A reconsolidação de outro paradigma comportamental, o Labirinto Aquático, também é capaz de promover a formação de LTM de um treino fraco do REO.
- Outra experiência indutora de síntese proteica, a extinção do CAC, também pode promover a formação de LTM de um treino fraco do REO.

De forma geral, podemos concluir, então, que reconsolidação da memória é capaz de promover a consolidação de um aprendizado fraco concomitante, através de um provável processo de *marcação e captura sináptica*.

6 REFERÊNCIAS

6.1 Artigos

- Akers, K., & Frankland, P. (2009). Grading gradients: evaluating evidence for time-dependent memory reorganization in experimental animals. *Journal of Experimental Neuroscience*, 2, 13–22.
- Almaguer-Melian, W., Bergado-Rosado, J., Pavón-Fuentes, N., Alberti-Amador, E., Mercerón-Martínez, D., & Frey, J. U. (2012). Novelty exposure overcomes foot shock-induced spatial-memory impairment by processes of synaptic-tagging in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3), 953–8.
- Ballarini, F., Moncada, D., Martínez, M. C., Alen, N., & Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), 14599–604.
- Barco, A., Lopez de Armentia, M., & Alarcon, J. M. (2008). Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32(4), 831–51.
- Barnes, C. A. (2003). Long-term potentiation and the ageing brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358(1432), 765–72.
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. (2008). *Neurociências: desvendando o sistema nervoso* (Artmed.). Porto Alegre.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–9.
- Brown, R., & Kulik, J. (1977). Flashbulb memories. *Cognition*, 5(1), 73–99.
- Bustos, S. G., Maldonado, H., & Molina, V. A. (2009). Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 446–57.
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in neurosciences*, 21(7), 294–9.
- Clarke, J. R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., & Delgado-García, J. M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2652–7.
- Costanzi, M., Cannas, S., Saraulli, D., Rossi-Arnaud, C., & Cestari, V. (2011). Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learning & memory*, 18(8), 508–18.

- de Oliveira Alvares, L., Pasqualini Genro, B., Diehl, F., Molina, V. A., & Quillfeldt, J. A. (2008). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience*, *154*(4), 1648–55.
- de Oliveira Alvares, L., Engelke, D. S., Diehl, F., Scheffer-Teixeira, R., Haubrich, J., Cassini, L. F., Molina, V. A., & Quillfeldt, J. A. (2010). Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learning & memory*, *17*(4), 202–9.
- de Oliveira Alvares, L., Einarsson, E. Ö., Santana, F., Crestani, A. P., Haubrich, J., Cassini, L. F., Nader, K., & Quillfeldt, J. A. (2012). Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*, *22*(5), 1092–5.
- de Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., Quillfeld, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience. Aceito*.
- Dong, C., Upadhyaya, S. C., Ding, L., Smith, T. K., & Hegde, A. N. (2008). Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learning & memory*, *15*(5), 335–47.
- Dudai, Y. (2012). The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience*, *35*(March), 227–47.
- Ehlers, M. (2002). Molecular morphogens for dendritic spines. *Trends in neurosciences*, *25*(2), 64–67.
- Flavell, C. R., Barber, D. J., & Lee, J. L. C. (2011). Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nature communications*, *2*, 504.
- Frankland, P. W., Ding, H.-K., Takahashi, E., Suzuki, A., Kida, S., & Silva, A. J. (2006). Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning & memory*, *13*(4), 451–7.
- Frey, U., & Morris, R. G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, *385*(6616), 533–6.
- Gold, P., & McGaugh, J. (1975). A single-trace, two-process view of memory storage processes. In D. Deutsch & J. Deutsch (Eds.), *Short-Term Memory* (Academic P., pp. 355–78). New York..
- Gruart, A., Muñoz, M. D., & Delgado-García, J. M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *The Journal of neuroscience*, *26*(4), 1077–87.
- Hayashi, Y. (2000). Driving AMPA Receptors into Synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GluR1 and PDZ Domain Interaction. *Science*, *287*(5461), 2262–2267.

- Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of neuroscience*, *22*(15), 6781–9.
- Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H., & Shiosaka, S. (2008). Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience*, *28*(4), 843–9.
- Izquierdo, I. (2002). *Memória* (Artmed.). Porto Alegre.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of learning and memory*, *63*(1), 19–32.
- Kaang, B.-K., Lee, S.-H., & Kim, H. (2009). Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *The Neuroscientist*, *15*(5), 430–5.
- Kopec, C. D., Real, E., Kessels, H. W., & Malinow, R. (2007). GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *The Journal of neuroscience*, *27*(50), 13706–18.
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature reviews. Neuroscience*, *5*(1), 45–54.
- Lee, J. L. C. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature neuroscience*, *11*(11), 1264–6.
- Lee, J. L. C. (2010). Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *4*(November), 168.
- Lee, J. L. C., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, *304*(5672), 839–43.
- Lu, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learning & memory*, *10*(2), 86–98.
- Lu, Y., Ji, Y., Ganesan, S., Schloesser, R., Martinowich, K., Sun, M., Mei, F., Chao, M. V., & Lu, B. (2011). TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *The Journal of neuroscience*, *31*(33), 11762–71.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). Synaptic plasticity and memory: an Evaluation of the Hypothesis. *Annual review of neuroscience*, *23*, 649–711.
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(31), 12931–6.

- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *The Journal of neuroscience*, *27*(28), 7476–81.
- Myskiw, J.C., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2013). Behavioral tagging of extinction learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(3), 1071–6.
- Nadel, L., Hubbach, a, Gomez, R., & Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *36*(7), 1640–5.
- Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R. M., Silva, A. J., Kaczmarek, L., & Huntley, G. W. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *The Journal of neuroscience*, *26*(7), 1923–34.
- Okamoto, K., Bosch, M., & Hayashi, Y. (2009). The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology*, *24*, 357–66.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., & Sacktor, T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, *313*(5790), 1141–4.
- Ramachandran, B., & Frey, J. U. (2009). Interfering with the actin network and its effect on long-term potentiation and synaptic tagging in hippocampal CA1 neurons in slices in vitro. *The Journal of neuroscience*, *29*(39), 12167–73.
- Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature reviews. Neuroscience*, *12*(1), 17–30.
- Redondo, R. L., Okuno, H., Spooner, P. a, Freguelli, B. G., Bito, H., & Morris, R. G. M. (2010). Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *The Journal of neuroscience*, *30*(14), 4981–9.
- Sajikumar, S., & Korte, M. (2011). Metaplasticity governs compartmentalization of synaptic tagging and capture through brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and protein kinase Mzeta (PKMzeta). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(6), 2551–6.
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2012). Retrieval per se is not sufficient to trigger reconsolidation of human fear memory. *Neurobiology of learning and memory*, *97*(3), 338–45.
- Shaw, J. A, Matlovich, N., Rushlow, W., Cain, P., & Rajakumar, N. (2012). Role of calcineurin in inhibiting disadvantageous associations. *Neuroscience*, *203*, 144–52.

- Sierra, R. O., Cassini, L. F., Santana, F., Crestani, A. P., Duran, J. M., Haubrich, J., de Oliveira Alvares, L., Quillfeldt, J. A. (2013). Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learning & memory, Aceito*.
- Silva, A. J., Zhou, Y., Rogerson, T., Shobe, J., & Balaji, J. (2009). Molecular and cellular approaches to memory allocation in neural circuits. *Science, 326*(5951), 391–5.
- Stratton, G. (1919). Retroactive hyperamnesia and other emotional effects on memory. *Psychological Review, 26*, 474–486.
- Suzuki, A., Josselyn, S. a, Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of neuroscience, 24*(20), 4787–95.
- Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P. W., & Kida, S. (2008). Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning & memory, 15*(6), 426–33.
- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature reviews. Neuroscience, 8*(4), 262–75.
- Tsetsenis, T., Younts, T. J., Chiu, C. Q., Kaeser, P. S., Castillo, P. E., & Südhof, T. C. (2011). Rab3B protein is required for long-term depression of hippocampal inhibitory synapses and for normal reversal learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108*(34), 14300–5.
- Wang, D. O., Martin, K. C., & Zukin, R. S. (2010). Spatially restricting gene expression by local translation at synapses. *Trends in neurosciences, 33*(4), 173–82.
- Wang, S.-H., De Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature neuroscience, 12*(7), 905–12.
- Wang, S.-H., Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2010). Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107*(45), 19537–42.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science, 313*(5790), 1093–7.
- Yao, Y., Kelly, M. T., Sajikumar, S., Serrano, P., Tian, D., Bergold, P. J., Frey, J. U., & Sacktor, T. C. (2008). PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. *The Journal of neuroscience, 28*(31), 7820–7.
- Zaidi, A. U., Enomoto, H., Milbrandt, J., & Roth, K. A. (2000). Dual Fluorescent In Situ Hybridization and Immunohistochemical Detection with Tyramide Signal Amplification. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 48*(10), 1369–1375.

Zhou, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., Li, G.-D., Hell, J. W., Kennedy, M. B., & Silva, A. J. (2007). Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *The Journal of neuroscience*, 27(50), 13843–53.

Zhou, Y., Won, J., Karlsson, M. G., Zhou, M., Rogerson, T., Balaji, J., Neve, R., Poirazi, P., & Silva, A. J. (2009). CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nature neuroscience*, 12(11), 1438–43.

6.2 Material gráfico complementar

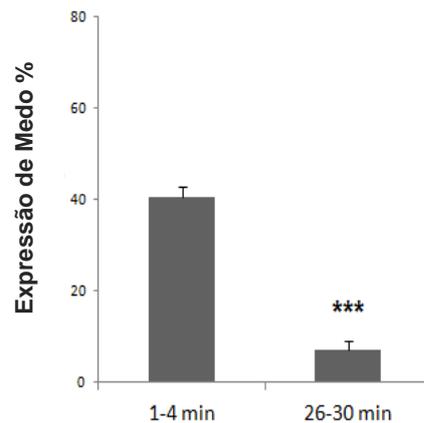
Vídeo 1 - LTP Precoce: devido a falta de PRPs, uma sinapse que passou por plasticidade estrutural e funcional retorna ao seu estado basal. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrn/journal/v12/n1/extref/nrn2963-s1.swf>>. Acessado em 24 de Março de 2013. Material suplementar de Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(1), 17–30.

Vídeo 2 - LTP Tardia: Após modificações plásticas funcionais e estruturais, PRPs encontram uma sinapse receptiva com a qual elas podem contribuir. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrn/journal/v12/n1/extref/nrn2963-s2.swf>> Acessado em 24 de Março de 2013. Material suplementar de Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(1), 17–30.

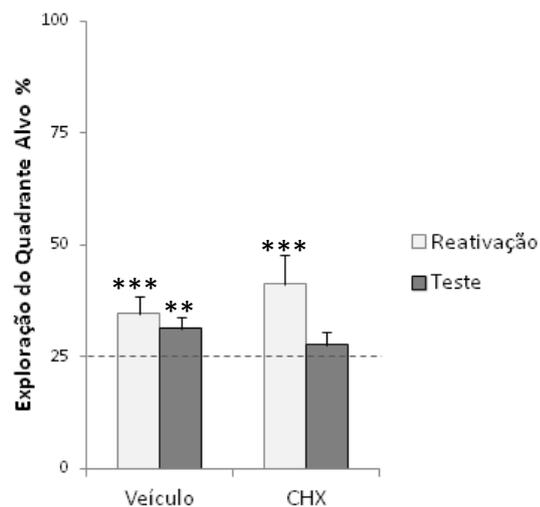
Vídeo 3 - A inibição da plasticidade estrutural (marcação sináptica) ainda permite a expressão funcional da LTP precoce, mas esta é de curta duração, pois as PRPs disponíveis não podem contribuir para a manutenção da LTP tardia. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrn/journal/v12/n1/extref/nrn2963-s4.swf>> Acessado em 24 de Março de 2013. Material suplementar de Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(1), 17–30.

ANEXO

A seguir estão os dados que foram mencionados no texto, mas não foram incluídos no artigo submetido. Referem-se aos experimentos de extinção do CAC e da reconsolidação do LAM respectivamente.



Expressão de medo (*freezing*) durante a sessão de extinção do CAC, no experimento da Figura 3.7 do artigo. Houve extinção significativa da memória de medo: *** $p < 0.001$ entre os primeiros e os últimos 4 minutos da sessão, teste *t* pareado, $n = 7$.



Exploração do quadrante alvo (QA) expressa como porcentagem do tempo total. Os animais foram treinados na tarefa do LAM durante 5 dias (4 *trials*/dia) e no 6º dia foram reexpostos ao labirinto sem a plataforma por 1min para induzir labilização da memória. Imediatamente após, receberam injeção intraperitoneal de CHX (2,2 mg/kg/ml) ou Veículo (DMSO 1%). No dia seguinte foi realizado um teste para avaliação da memória. Todos os grupos exibiram preferência significativa pelo QA durante a reativação. Mas no teste o grupo que recebeu CHX deixou de exibir essa preferência. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *One Samples T-Test*, $n = 9-10$.