



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FERNANDA TROYNER

PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO REUNIENS DO TÁLAMO NA
DESESTABILIZAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS
CONTEXTUAIS EM RATOS

FLORIANÓPOLIS

MARÇO DE 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FERNANDA TROYNER

PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO REUNIENS DO TÁLAMO NA
DESESTABILIZAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS
CONTEXTUAIS EM RATOS

Documento apresentado à banca como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Farmacologia

FLORIANÓPOLIS

MARÇO DE 2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Troyner, Fernanda
PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO REUNIENS DO TÁLAMO NA
DESESTABILIZAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS
CONTEXTUAIS EM RATOS / Fernanda Troyner ; orientador,
Leandro José Bertoglio, 2021.
98 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Psicofarmacologia.
4. Memória. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

Fernanda Troyner

Participação do núcleo reuniens do tálamo na desestabilização e reconsolidação de memórias aversivas contextuais em ratos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Raquel Vecchio Fornari, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal do ABC

Prof.(a) Felipe Villela Gomes, Dr.(a)

Instituição Universidade de São Paulo

Prof.(a) Alfeu Zanotto Filho, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Prof.(a) Rui Daniel Prediger, Dr.(a)

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Leandro José Bertoglio, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2021

AGRADECIMENTOS

Desenvolver um trabalho que culmine em uma Tese de Doutorado é um desafio enorme. E todos sabemos que, sozinhos, superar desafios enormes é muito mais difícil. Dessa forma, gostaria de agradecer a todos que estiveram presentes em algum momento dos quatro anos de desenvolvimento deste trabalho. Alguns presencialmente, outros nem tanto. Alguns diariamente, outros ocasionalmente. Alguns não ajudaram conscientemente diretamente, mas também tiveram seu papel ao me ajudar em outras questões da vida, seja pessoal ou profissional. Tenho também alguns agradecimentos especiais.

Gostaria de agradecer a todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, desde 2015. Colegas de mestrado, doutorado, pós-doutorado, docentes e outros servidores. Todos estiveram, de forma direta ou indireta, envolvidos neste trabalho. Seja por ajudar diretamente, seja por orientar, seja por ensinar, seja por oferecer críticas construtivas, seja por apoiar durante experimentos e disciplinas, seja por discutir questões profissionais e pessoais, seja por oferecer conselhos, seja por manter o funcionamento do nosso espaço físico na UFSC: muito obrigada. O programa foi essencial para todo meu aprendizado, e tenho orgulho de dizer que sou egressa dele.

Gostaria de agradecer à Universidade Federal de Santa Catarina, que foi minha casa durante todos esses anos. Sabemos os desafios que as Universidades Públicas enfrentam no Brasil, e mesmo assim a UFSC segue cumprindo seu papel social da melhor forma possível, sendo referência nacional.

Gostaria de agradecer ao LAMEB e seus funcionários, pela ajuda e pelo suporte técnico. O trabalho de vocês é fundamental.

Gostaria de agradecer à minha família, que sempre se mostrou orgulhosa do meu caminho. Muitos desafios tiveram que ser superados, e sem vocês nada disso seria possível. Um dos meus maiores objetivos na vida é ser um ser humano do qual vocês possam se orgulhar, e, portanto, dedico este trabalho a vocês.

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Leandro Bertoglio, que me acolheu em seu laboratório, mesmo sem experiência nenhuma, e me orientou durante todos esses anos. Agradeço por ter me ajudado a trilhar um caminho pedregoso e incerto da melhor forma possível. Gostaria de agradecer também aos meus colegas de laboratório pela

convivência. Cada um com seus objetivos, podem ter certeza que ajudamos a construir um pouquinho de Ciência juntos.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, que me mantiveram sã (ou quase sã) durante todo esse processo. Mesmo que vocês, muitas vezes, não entendessem exatamente sobre o que eu estava falando ou os processos pelos quais passei na vida acadêmica, nunca deixaram de me escutar e me apoiar.

Com especial carinho, gostaria de agradecer ao Guilherme, que me apoiou desde o momento em que me conheceu. Pelos conselhos, pelo carinho, por toda ajuda, pelo acolhimento das minhas dúvidas e erros, você foi um dos pilares em que me apoiei para a conclusão desse trabalho.

Agradeço também aos professores doutores Felipe Gomes, Alfeu Zanotto, Raquel Fornari, Jorge Quillfeldt, e Cilene Lino de Oliveira, por aceitarem compor a banca de avaliação, e colaborar na discussão e aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradeço também à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*Do novelo emaranhado da memória, da escuridão dos
nós cegos, puxo um fio que me aparece solto.*

*Devagar o liberto, de medo que se desfaça entre os
dedos.*

*É um fio longo, verde e azul, com cheiro de limos,
e tem a macieza quente do lodo vivo.*

É um rio.

Corre-me nas mãos, agora molhadas.

*Toda a água me passa entre as palmas abertas, e de
repente não sei se as águas nascem de mim, ou para
mim fluem.*

*Continuo a puxar, não já memória apenas, mas o
próprio corpo do rio.*

*Sobre a minha pele navegam barcos, e sou também os
barcos e o céu que os cobre e os altos choupos que
vagarosamente deslizam sobre a película luminosa
dos olhos.*

*Nadam-me peixes no sangue e oscilam entre duas
águas como os apelos imprecisos da memória.*

Sinto a força dos braços e a vara que os prolonga.

*Ao fundo do rio e de mim, desce como um lento e
firme pulsar do coração.*

Agora o céu está mais perto e mudou de cor.

É todo ele verde e sonoro porque de ramo em ramo

acorda o canto das aves.

E quando num largo espaço o barco se detém, o meu

corpo despido brilha debaixo do sol, entre o

esplendor maior que acende a superfície das águas.

Aí se fundem numa só verdade as lembranças confusas

da memória e o vulto subitamente anunciado do

futuro.

Uma ave sem nome desce donde não sei e vai pousar

calada sobre a proa rigorosa do barco.

Imóvel, espero que toda a água se banhe de azul e que

as aves digam nos ramos por que são altos os

choupos e rumorosas as suas folhas.

Então, corpo de barco e de rio na dimensão do homem,

sigo adiante para o fulvo remanso que as espadas

verticais circundam.

Aí, três palmos enterrarei a minha vara até à pedra

viva.

Haverá o grande silêncio primordial quando as mãos se

juntarem às mãos.

Depois saberei tudo.

(José Saramago, em *Provavelmente Alegria*, 1987)

RESUMO

O núcleo reuniens (NR) do tálamo é o maior dos núcleos da linha média do tálamo, localizado acima do terceiro ventrículo. Possui um perfil de conectividade funcional que inclui o hipocampo e o córtex pré-frontal, tornando-se uma área de especial interesse no estudo do processamento cognitivo. Estudos recentes têm mostrado que o NR parece ter um papel modulatório em diversas etapas do processamento mnemônico. O objetivo principal deste trabalho foi investigar a participação do NR no processo de desestabilização e reconsolidação de memórias aversivas contextuais em ratos. Para tanto, utilizamos ferramentas farmacológicas com objetivos específicos, como inativar a região, ou impedir a degradação proteica e a ativação dos receptores NMDA-N2B, dois passos importantes para a desestabilização sináptica de memórias. Também utilizamos a anisomicina e a clonidina, em doses amnésicas, como controle positivo para os efeitos das demais drogas, tanto na desestabilização quanto na reconsolidação, em ratos Wistar machos submetidos à cirurgia estereotáxica. Tanto a inativação quando o bloqueio da degradação proteica e da ativação dos receptores NMDA-N2B foram capazes de impedir a desestabilização da memória aversiva contextual em um protocolo de reativação, quando as drogas foram infundidas antes da sessão de reativação. O muscimol e o TCN-201, um antagonista de receptores NMDA-N2A, reconhecidamente importantes para a restabilização de uma memória após sua desestabilização, foram injetados após a sessão de reativação. Ambas as drogas foram capazes de impedir a reconsolidação da memória, provocando uma queda nos níveis de congelamento no teste subsequente, assim como a anisomicina e a clonidina. O marcador *Egr1/Zif268* é bastante utilizado como marcador da plasticidade necessária para o processo de desestabilização-reconsolidação de memórias. Utilizando tal marcador, investigamos a plasticidade em diversas regiões do encéfalo quando o NR se encontrava ativo (veículo) e inativo (muscimol) durante a sessão de reativação. O número de células *Egr1/Zif268* positivas diminuiu em relação ao grupo veículo no próprio NR, comprovando a eficácia da inativação com o muscimol, no hipocampo dorsal e nos córtices pré-límbico e infralímbico. Já na amígdala basolateral e no hipocampo ventral, houve aumento do número de células *Egr1/Zif268* positivas. Esses resultados indicam que o NR é parte essencial da circuitaria necessária para a desestabilização e a reconsolidação de memórias aversivas contextuais, e nos dão pistas de como essa circuitaria interage, já que sua atividade influencia a plasticidade em diversas regiões.

Palavras-chave: memória; desestabilização; reconsolidação; núcleo reuniens; plasticidade

ABSTRACT

The nucleus reuniens (NR) is the major nucleus of the midline thalamus, located right above the third ventricle. It has functional connectivity with the hippocampus and the prefrontal cortex, making it a particular area of interest to study cognitive processes. Recent studies have shown that the NR seems to have a modulatory role in several steps of mnemonic processing. The main objective of this work was to investigate NR's role in destabilization and reconsolidation of contextual aversive memories in rats. We used pharmacological tools to achieve specific objectives. The NR was inactivated, the protein degradation was inhibited, or NMDA-N2B receptors were antagonized, the last two being necessary steps for synaptic memory destabilization. We have also used anisomycin and clonidine at amnesic doses, as positive controls for the effect of the other drugs on memory destabilization and reconsolidation, in male Wistar rats submitted to stereotaxic surgery aiming the NR. Inactivation of the NR, blockade of protein degradation, or antagonism of NMDA-N2B receptors were all capable of preventing memory destabilization when used before the reactivation session in our protocol. Both muscimol and TCN-201, an antagonist of NMDA-N2A receptors, known to be required for memory restabilization after destabilization, were infused right after the reactivation session. Both drugs hindered memory reconsolidation, like anisomycin or clonidine, causing decreased freezing times in subsequent testing. *Egr1/Zif268* is vastly used as a marker of the plasticity needed for memory destabilization-reconsolidation. Using it, we investigated the occurrence of plasticity in several encephalic areas when NR was active (vehicle) or temporarily inactive (using muscimol) during the reactivation session. *Egr1/Zif268* positive cells were diminished in the muscimol group compared to the vehicle group in the NR, showing the effectiveness of this inactivation and the dorsal hippocampus prefrontal and infralimbic cortices. In contrast, there was an increase in *Egr1/Zif268* positive cells in the basolateral amygdala and ventral hippocampus. Our results suggest that the NR is an essential piece of the circuitry needed for contextual aversive memories destabilization and reconsolidation, also giving us some clues on how this circuitry behaves, given that NR activity influenced plasticity in several areas.

Key words: memory; destabilization; reconsolidation; nucleus reuniens; plasticity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do sítio de injeção considerado como correto para o núcleo reuniens do tálamo em cortes transversais do cérebro de ratos Wistar.....	41
Figura 2 - Esquema representativo do protocolo comportamental utilizado.....	43
Figura 3. Esquema representativo das intervenções utilizadas e sua potencial ação sobre o congelamento no teste A.....	43
Figura 4 A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não prejudica a expressão da memória aversiva, mas impede a sua desestabilização..	49
Figura 5 A inibição da degradação protéica no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não prejudica a expressão da memória aversiva, mas impede a sua desestabilização.....	51
Figura 6. O antagonismo dos receptores NMDA que contém a subunidade NR2B no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não prejudica a expressão da memória aversiva, mas impede a sua desestabilização.	53
Figura 7. Os pré-tratamentos e tratamentos utilizados nos experimentos anteriores não são capazes de influenciar a desestabilização e a reconsolidação de memórias aversivas quando a sessão de reativação é omitida.....	55
Figura 8.A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação prejudica sua reconsolidação.	57
Figura 9. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade NR2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação prejudica sua reconsolidação.	59
Figura 10. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo não é capaz de influenciar a reconsolidação de memórias aversivas quando a sessão de reativação é omitida. ..	61
Figura 11. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade NR2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo não é capaz de influenciar a reconsolidação de memórias aversivas quando a sessão de reativação é omitida.....	62
Figura 12. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo 10 minutos antes da sessão de reativação influencia o número de células Egr1/Zif268 positivas no NR, hipocampo dorsal, hipocampo ventral, córtices pré-limbico e infralimbico, e amígdala basolateral	64

Figura 13. A infusão de Veículo ou Muscimol 10 minutos antes da sessão de reativação não influenciou a porcentagem de congelamento dos grupos reativados durante a sessão. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B).....	49
Tabela 2. A inibição da degradação protéica no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B).....	51
Tabela 3. O antagonismo dos receptores NMDA que contém a subunidade NR2B no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B) ...	53
Tabela 4. Os pré-tratamentos e tratamentos utilizados nos experimentos anteriores no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes ou após uma sessão de reativação não influenciam a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B).	55
Tabela 5. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B)	57
Tabela 6. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade NR2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B).. .	59
Tabela 7. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de não-reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B).....	61
Tabela 8. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade NR2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de não-reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B) ...	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Memória: conceito e história	15
1.2. Análise de comportamento aversivo como ferramenta para o estudo das memórias.....	18
1.3. Etapas do processamento mnemônico	19
1.4. Plasticidade mnemônica e neurotransmissão glutamatérgica.....	26
1.5. Plasticidade sináptica e genes de expressão imediata: Egr1/Zif268.....	29
1.6. Sistema límbico, núcleo reuniens e memórias	31
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	37
2.1. Objetivos específicos	37
3. METODOLOGIA	38
3.1. Animais.....	38
3.2. Drogas.....	38
3.3. Cirurgia estereotáxica	39
3.4. Procedimento de microinjeção central.....	40
3.5. Histologia.....	40
3.6. Condicionamento de medo contextual.....	42
3.7. Imunoistoquímica para EGR-1	44
3.7.1. Perfusão intracardíaca e preparação do tecido cerebral.....	44
3.7.2. Reação imunoistoquímica.....	44
3.7.3. Regiões de interesse e quantificação de células Egr1/Zif268 positivas ...	45
3.8. Análise estatística	45
3.9. Descrição dos experimentos	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. Efeitos da inativação temporária do NR sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais.....	48
4.2. Efeitos da inibição da degradação protéica no NR sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais.....	50
4.3. Efeitos do antagonismo de receptores NMDA-N2B sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais.....	52
4.4. Efeitos dos tratamentos utilizados sobre a sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais em um protocolo de não-reativação	54

4.5. Efeitos da inativação temporária do NR sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais	56
4.6. Efeitos do antagonismo de receptores NMDA-N2A sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais.....	58
4.7. Efeitos do muscimol, da clonidina, e da anisomicina sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais em um protocolo de não-reativação	60
4.8. Efeitos do TCN-201, da clonidina, e da anisomicina sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais em um protocolo de não-reativação	61
4.9. Efeitos da inativação temporária do NR sobre o número de células egr1/Zif268 positivas no NR e em outras áreas recrutadas durante o processo de desestabilização-reconsolidação	63
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. Memória: conceito e história

A busca pelo entendimento de como a memória funciona é mais antiga do que a neurociência e a psicologia. Há pelo menos 2500 anos seres humanos têm se perguntado como somos capazes de perceber e guardar informações sobre o mundo (Cassel et al., 2013; Queenan et al., 2017). Durante grande parte desse período, memórias não eram consideradas entidades físicas, e muito menos armazenadas pelo sistema nervoso central, como as consideramos hoje. Isso influenciou os lugares e formas como procuramos por elas durante a história da humanidade. Descartes, por exemplo, foi um grande expoente do dualismo mente-corpo, e defendia que a matéria física da qual nosso corpo é feito não poderia gerar processos da mente, como a memória (Descartes, 1641; Queenan et al., 2017).

Apenas nos últimos 500 anos as definições sobre memória passaram a depender de evidências adquiridas através de experimentação, voltando-se para a Ciência. Antes disso, muito do que era considerado sobre a memória e a cognição baseava-se completamente em conceitos religiosos e pensamentos filosóficos com validação experimental quase nula (Cassel et al., 2013). Os filósofos gregos Aristóteles e Platão realizaram observações sobre o que consideravam ser a memória. Platão afirmava que lembrar é a capacidade de “recuperar algum conhecimento que o indivíduo tinha antes, ou alguma percepção, ou outra experiência, de um estado de memória” (tradução livre; Ross, 1930).

Andreas Vesalius, considerado o pai da anatomia, pode ser considerado responsável pela mudança conceitual que designou o cérebro como o lugar onde a percepção e a memória aconteceriam. Através de seus estudos de dissecação em corpos humanos, Vesalius realizou descrições detalhadas dos nervos, e pontuou que todos estes se conectavam ao cérebro. Realizou também estudos aprofundados do nervo óptico, ligando conceitualmente a percepção do mundo externo ao cérebro humano. Antes, tais conceitos já haviam sido descritos pelos gregos Herophilus e Erasistratus, mas acabaram suprimidos pela visão Aristotélica preferida pela Igreja Católica durante a Idade Média, vindo novamente à tona durante o Renascimento (Gomes et al., 2015).

Já no século XIX, o cérebro era amplamente considerado o local de origem dos pensamentos e da memória. Pioneiros da psicologia cognitiva, como Paul Broca e Carl Wernicke, já estudavam pacientes que sofreram danos físicos ao sistema nervoso central advindos, por exemplo, de acidentes vasculares cerebrais e epilepsia, para descrever como diferentes áreas do cérebro, quando afetadas, não causavam danos globais irreparáveis à função cognitiva, mas sim danos localizados. Assim, apesar de a classificação do cérebro em áreas ainda ser muito incipiente, desenvolveram o conceito de que nosso cérebro possui diversas áreas com diferentes funções, que muito influenciaria a neurociência do século seguinte (Queenan et al., 2017). No início do século XX, a segunda guerra mundial levou a um aumento significativo de casos de danos cerebrais localizados, e aprofundou ainda mais a noção do cérebro dividido em áreas. Por outro lado, especificamente no campo do estudo da memória, Karl Lashley (1950) chegava à conclusão, após uma busca assídua pelo “engrama” no córtex, que não era possível demonstrar a localização isolada de uma memória no sistema nervoso central, e considerou que o engrama estaria presente em uma região inteira do cérebro. O termo engrama havia sido cunhado por Richard Semon algumas décadas antes, em 1904. Em sua definição, um engrama consistia na “modificação duradoura da substância irritante, produzida por um estímulo de uma experiência” (Schacter et al., 1978).

Em 1953, o neurocirurgião William Scoville, na tentativa de tratar uma epilepsia refratária grave que acometia o paciente Henry Molaison, removeu bilateralmente a maior parte do seu lobo temporal, mais especificamente a parte anterior do hipocampo, a amígdala e grande parte do córtex adjacente. Logo em seguida, Henry Molaison, que viria a ser amplamente conhecido como paciente H.M., desenvolveu uma severa amnésia, tanto anterógrada quanto retrógrada. H.M. tornou-se incapaz de formar novas memórias. Além disso, sua capacidade de lembrar de eventos autobiográficos também havia sido destruída. No entanto, seu intelecto e sua personalidade foram mantidos intactos (Scoville and Milner, 1957; Dossani et al., 2015). Brenda Milner e Suzanne Corkin, pesquisadoras que estudaram os danos causados à capacidade mnemônica de H.M. durante toda a sua vida, foram responsáveis pela inauguração de uma nova era no campo do estudo da memória, descrevendo a importância da formação hipocampal para o processamento mnemônico (Squire, 2009).

Nos anos seguintes às primeiras descrições do déficit mnemônico do paciente H.M., outros tipos de memórias e seus sistemas foram descritos (Squire, 2004). Concluiu-se que nem todas as memórias são iguais, nem criadas e mantidas nos mesmos lugares. No entanto, todas essas descobertas haviam sido feitas em um nível macroscópico do cérebro. Ainda não se sabia exatamente que tipo de tecido ou material seria responsável pela formação das memórias no sistema nervoso central. No século XIX, Santiago Ramon y Cajal, considerado o pai da neurociência moderna, realizou estudos histológicos do cérebro, mostrando que este, assim como outros tecidos, era composto por células: os neurônios. Foi também Ramon y Cajal um dos primeiros neurocientistas a propor que o mecanismo de aprendizado se baseava em mudanças estruturais entre as células do córtex (Ramon y Cajal, 1894). No entanto, somente em 1949 fomos capazes de produzir a primeira teoria de como células próximas seriam capazes de mudar suas estruturas e conexões em conjunto (Hebb, 1949). Donald Hebb postulou que neurônios que se ativam em conjunto acabam por interconectar-se de forma duradoura, o que consistiria na base para a modificação sináptica responsável pelo aprendizado e pela formação de memórias. Evidência experimental de tal teoria foi publicada em 1973 (Bliss e Lomo, 1973), quando os autores demonstraram um aumento sustentado na eficiência sináptica em células granulares do giro denteado de coelhos anestesiados após estimulação elétrica repetida da via perforante. Tal fenômeno foi denominado “potenciação de longo-prazo” e é considerado, até hoje, um mecanismo fundamental para a neurobiologia da memória.

Apesar de todos os avanços anteriores, a possibilidade de observar e estudar as células do cérebro de forma independente é bastante recente. Muito embora em humanos isso ainda não seja possível, em roedores já o é. Podemos criar animais transgênicos, modificar a expressão de proteínas em células específicas de regiões de interesse em seus cérebros, quantificar proteínas e outras moléculas, ativar e desativar receptores específicos, e até mesmo controlar quais neurônios ficarão ativos ou inativos durante determinada tarefa (Queenan et al., 2017; Denny et al., 2017).

Em 2021, completaremos 117 anos da primeira definição de engrama, cunhada por Richard Semon, mas continuamos em busca dos mecanismos da memória e dos engramas. Ainda não compreendemos completamente como as diferentes formas de memórias funcionam, como o cérebro as armazena, nem como podemos modificá-las durante a vida. O conceito de memória, hoje, não é menos elusivo do que há 500 anos:

memória é o mecanismo pelo qual armazenamos, modificamos, e utilizamos informações adquiridas através de experiências.

1.2. Análise de comportamento aversivo como ferramenta para o estudo das memórias

O aprendizado de medo é um processo adaptativo altamente conservado na escala evolutiva, e permite aos indivíduos adquirir informações sobre pistas e contextos envolvidos em situações de alto valor biológico, como situações de perigo e risco de vida. Assim, essas informações podem ser, posteriormente, utilizadas na produção de uma resposta comportamental apropriada.

O condicionamento aversivo contextual (CAC) é derivado do condicionamento clássico descrito por Ivan Pavlov, que consiste no pareamento de um estímulo neutro com um estímulo saliente, alterando assim a valência desse estímulo neutro de forma que ele, sozinho, passe a provocar respostas de medo. Tal mudança de valência indica um aprendizado associativo dessas informações (Pavlov, 1927). Esse tipo de aprendizado tornou-se essencial para o estudo da neurobiologia das memórias aversivas, assim como dos mecanismos celulares e moleculares que suportam tais processos (Fendt e Fanselow, 1999). No caso de Pavlov, o estímulo pareado era um sinal sonoro que ocorria logo antes da apresentação de alimento para cães. Após associar este sinal sonoro com a comida, os cães passaram a salivar ao ouvir somente o sinal sonoro, não sendo mais necessária a apresentação do alimento para que a salivação ocorresse. No condicionamento aversivo contextual, o indivíduo aprende que certas informações e estímulos são preditores de eventos aversivos, como um choque nas patas. A resposta comportamental mais utilizada para mensurar o aprendizado, nesse caso, é a imobilidade, ou “congelamento”, frente à apresentação do estímulo condicionado, ou seja, aquele que previamente era neutro e teve sua valência alterada pela associação com um estímulo incondicionado aversivo (choque nas patas). Frente à impossibilidade de escapar da apresentação do estímulo incondicionado (já que os choques são aplicados numa caixa fechada em que não há possibilidade de fuga), a imobilidade é uma resposta inata de roedores (Blanchard e Blanchard, 1969).

A definição de contexto, para fins de experimentação comportamental em animais, é bastante ampla. Segundo Maren e colaboradores, contextos contêm tanto informações internas do indivíduo, como estados psicológicos, emocionais e hormonais, quanto informações externas, como as ambientais e sociais, com as quais interagem os processos cognitivos em determinada tarefa. Além disso, a representação contextual inclui a representação do tempo como percebida pelo indivíduo, o que é de essencial importância para a avaliação interna da experiência e para as expectativas do indivíduo em relação a futuras experiências que sejam semelhantes. Dessa forma, a contextualização suporta a flexibilidade comportamental e a reativação de informações relacionadas como um todo, processos extremamente necessários para que haja um comportamento adaptativo. (Maren et al., 2013). Embora não tenham sido explorados neste trabalho, é sabido que outros parâmetros são utilizados como marcadores de experiências aversivas, como variações neuroendócrinas e autonômicas, especialmente de “hormônios do estresse”, um grupo de substâncias relacionada também ao estado interno do indivíduo submetido ao CMC (Izquierdo et al., 2016). Devido à essas características, o condicionamento de medo contextual é uma ferramenta importante para o estudo de memórias que possuem uma valência emocional importante.

1.3. Etapas do processamento mnemônico

Para fins de organização do conhecimento, costumamos dividir o processamento mnemônico em etapas, muito embora saibamos que não são processos que ocorrem de forma isolada no sistema nervoso central. Tais processos são: aquisição, consolidação, reconsolidação e extinção.

A aquisição e a consolidação foram os primeiros processos mnemônicos a serem estudados, pois poderiam explicar como armazenamos informações e aprendemos. Müller e Pilzecker (1900) foram os primeiros a propor uma hipótese sobre a consolidação de memórias. Eles descobriram que, em humanos, um novo aprendizado era prejudicado se seguido pelo aprendizado de outra informação, sugerindo que uma nova memória inicialmente existe em um estado frágil e se consolida durante o tempo (McGaugh, 2000). Seguindo esta lógica, podemos definir a consolidação como o processo de armazenamento de longo termo da memória no cérebro. De fato, já existiam estudos

anteriores mostrando que traumas físicos cerebrais provocavam a perda de memórias, e a teoria de Muller e Pilzecker oferecia uma explicação plausível para a amnésia retrógrada observada nos pacientes estudados (McDougall, 1901). Em 1966, utilizando peixinhos dourados, Agranoff e colaboradores demonstraram que tanto choques eletroconvulsivos (já utilizados em estudos anteriores), quanto a puromicina e o cicloheximide (ambos inibidores de síntese protéica), quando aplicados após o treino, bloqueavam o aprendizado dos peixes em uma tarefa aversiva (Agranoff et al., 1966). Estudos subsequentes encontraram mais e mais evidências da existência da consolidação em diversas espécies (McGaugh, 2000). No entanto, certos pontos permaneciam elusivos: Uma vez consolidada, essa memória é imutável? Ou existiria um processo capaz de modificá-la?

Considerando que os achados, por muitos anos, indicavam que a consolidação era um processo de estabilização de memórias, e que uma vez estáveis, procedimentos que antes geravam amnésia não eram mais capazes de fazê-lo, a ideia de que uma memória consolidada não poderia mais ser modificada não parecia absurda (McGaugh, 1966; Squire et al., 1984). No entanto, tal ideia estava longe de ser um consenso entre os pesquisadores. Em 1968, Misanin e colaboradores demonstraram que, após uma breve sessão de reexposição a um contexto pareado, era possível provocar amnésia em animais se utilizados eletrochoques, mesmo que essa memória tenha sido consolidada muito tempo antes (Misanin et al., 1968). Em 1979, considerando as evidências disponíveis na época, Lewis publicou uma revisão em que definia dois estados de uma memória: o ativo e o inativo. Além disso, afirmava que a plasticidade necessária para interferir em uma memória era transitória, durando pouco tempo após a sua ativação, mas independia do tempo transcorrido entre a ativação e a consolidação inicial da memória. Lewis também salientou que tal plasticidade parecia basear-se na reestruturação de proteínas, abrindo caminho para o que pautaria grande parte do estudo da memória em décadas subsequentes: metabolismo protéico (Lewis, 1979). Outros pesquisadores, porém, na mesma época, acreditavam que a lembrança de uma memória, mesmo que influenciasse o comportamento do indivíduo, era apenas uma leitura passiva das informações consolidadas anteriormente, não abrindo qualquer janela para sua modificação. O termo reconsolidação (ou *reconsolidation*, em inglês) só veio a ser utilizado nos anos 1990 (Dudai, 2012). Em 1997, Jean Przybylski e Susan Sara demonstraram experimentalmente que a administração do antagonista de receptores NMDA MK-801

induzia amnésia em roedores quando administrado até 120 minutos após a reativação de uma memória previamente consolidada. Dessa forma, demonstraram experimentalmente a possibilidade de reconsolidação de uma memória. Além disso, demonstraram que a reconsolidação envolvia, ao menos em parte, os mesmos processos intracelulares subsequentes à ativação dos receptores NMDA que já eram conhecidos durante a consolidação (Przybylowski e Sara, 1997). Já nos anos 2000, Nader, Schafe e Le Doux demonstraram que a anisomicina, um inibidor de síntese protéica, se infundida diretamente na amígdala basolateral de roedores logo após uma sessão de reativação da memória previamente consolidada, provocava amnésia duradoura. Demonstraram, ainda, que caso a reativação não fosse realizada, o efeito amnésico não era induzido (Nader et al., 2000). Após esta publicação o interesse pela reconsolidação aumentou significativamente, e anos de pesquisa utilizando as mais variadas espécies, incluindo a humana, em diversas tarefas comportamentais e com diferentes drogas e interferentes, demonstraram que o fenômeno da reconsolidação acontece, essencialmente, em todos os animais (Haubrich e Nader, 2016).

Após o aumento do interesse científico sobre a reconsolidação de memórias no começo dos anos 2000, diversos pesquisadores começaram a descrever que, muitas vezes, a sessão de reativação não levava à ocorrência da reconsolidação, e a memória estudada permanecia imutável apesar dos interferentes utilizados. Sabemos, hoje, que memórias possuem condições limitantes que devem ser superadas durante a reativação para que desestabilizem e sejam reconsolidadas, e vários parâmetros dessas condições limitantes têm sido estudados e descritos na literatura científica na última década (Schroyens et al., 2017). Primeiramente, a desestabilização de uma memória depende da interação entre o aprendizado inicial e as condições da reativação. Isso significa que deve existir uma condição razoável de diferença entre o aprendizado inicial e a sessão de reativação: as condições não podem ser nem extremamente diferentes, nem exatamente iguais (Sevenster et al., 2013; Almeida-Corrêa e Amaral, 2014; Beckers e Kindt, 2017; Junjiao et al., 2019). Para que haja desestabilização, a reativação deve conter novidades suficientes para que o indivíduo seja obrigado a atualizar as informações já adquiridas sobre determinada situação ou contexto, gerando assim um sinal que permite a desestabilização das informações associadas. Porém, o estímulo não pode ser extremamente diferente, de forma que uma nova memória seria formada, já que a

memória anterior não seria recrutada (Lee, 2010; Finnie e Nader, 2012; Fernandez et al., 2017; Junjiao et al., 2019).

Outro fator decisivo na ocorrência da desestabilização de uma memória são as características de sua consolidação, como a sua força. Existem relatos consistentes na literatura de que protocolos de aprendizado muito intensos geram memórias fortes que não são tão facilmente desestabilizadas quanto memórias geradas por protocolos menos intensos. Em 2009, Wang e colaboradores demonstraram que uma memória aversiva formada por um treino de intensidade alta não apresentava capacidade de desestabilização frente a uma sessão de reativação, e correlacionaram sua força e sua incapacidade de desestabilização com a diminuição da expressão de receptores NMDA contendo a subunidade N2B na amígdala basolateral após a consolidação dessa memória intensa (Suzuki et al., 2004; Wang et al., 2009; Winters et al., 2009). Ainda, a idade da memória também tem importância nesse processo. Quanto mais longo o período de espera entre o condicionamento e a sessão de reativação, mais difícil tende a ser a desestabilização dessa memória (Milekic e Alberini, 2002; Suzuki et al., 2004; Eisenberg e Dudai, 2004; Frankland et al., 2006; Baratti et al., 2008; Bustos et al., 2009; Haubrich et al., 2015). As condições neurobiológicas em que essa memória é consolidada tendem a influenciar posteriormente a sua capacidade de desestabilização. Por exemplo, em 2018, demonstramos que a atividade do núcleo reuniens do tálamo (NR) durante a consolidação de uma memória aversiva contextual determinou, posteriormente, a sua capacidade de desestabilização e suscetibilidade a um agente amnésico (Troyner et al., 2018). Ainda, foi reportado que a atividade do córtex pré-frontal durante a consolidação de uma memória influencia a sua reativação, interferindo na capacidade de desestabilização do traço mnemônico (Guise e Shapiro, 2017). As características da sessão de reativação também são muito importantes para que seja estabelecido um protocolo efetivo: sessões de reativação muito curtas falham em induzir a desestabilização da memória (Bustos et al., 2009), enquanto sessões muito longas tendem a levar a memória a extinção, um processo diferente da reconsolidação (Pedreira e Maldonado, 2003; Lee et al., 2006; Perez-Cuesta e Maldonado, 2009; Zhu et al., 2018; Cahill et al., 2019). Mais recentemente, exploramos a possibilidade de que a especificidade e generalização de uma memória aversiva contextual também seja um fator determinante para a ocorrência da desestabilização. Sabemos que memórias generalizadas são aparentemente menos suscetíveis à interferentes durante a reconsolidação, o que se deve provavelmente a uma falha de

desestabilização (Gazarini et al., 2014; Troyner et al., 2018; Marin et al., 2020; Flavell et al., 2020). Apesar dos estudos publicados, este é um campo que deve ser ainda mais explorado nos próximos anos, pois a mecânica da correlação entre generalização e resistência a interferentes durante a reconsolidação ainda não foi completamente desvendada (Alfei et al., 2020; Flavell et al., 2020).

No entanto, é preciso observar que nenhum desses limitantes é intransponível. Durante os anos, algumas formas de superá-los foram descritas na literatura: o aumento do tempo da sessão de reativação (Suzuki et al., 2004; Frankland et al., 2006), a apresentação de estímulos novos durante a sessão de reativação (Winters et al., 2009; Lee, 2010; Haubrich et al., 2015), e o uso de “reguladores” de plasticidade neuronal. Durante a sessão de reativação, a plasticidade neuronal pode ser aumentada de forma a induzir a desestabilização da memória, superando os limitantes neurobiológicos que ela possa ter. Por exemplo, através de manipulações epigenéticas, Gräff e colaboradores demonstraram que memórias remotas (nas quais um longo tempo passa entre a sessão de condicionamento e a de reativação) podem tornar-se novamente suscetíveis a desestabilização através do uso de inibidores da HDAC-2 (histona deacetilase 2), aumentando a expressão de genes relacionados à neuroplasticidade (Gräff et al., 2014). A neurotransmissão glutamatérgica, classicamente envolvida em processos de plasticidade neuronal (Lynch e Baudry, 1984; Kim et al., 1991; Rodrigues et al., 2001; Morris, 2013), também foi explorada nesse sentido. A D-cicloserina, um agonista parcial de receptores NMDA, foi utilizado em diversos protocolos mnemônicos como facilitador da desestabilização e da reconsolidação (Gazarini et al., 2014; Ortiz et al., 2016; Saitoh et al., 2017; Ortiz et al., 2019) e tem sido testado inclusive na prática clínica para o tratamento do TEPT (transtorno de estresse pós-traumático). O TEPT, em partes, é uma condição patológica que se instala após traumas que geram memórias aversivas que são muito difíceis de serem desestabilizadas e esquecidas (Kida, 2019). Também demonstramos que uma infusão do agonista glutamatérgico NMDA diretamente no núcleo reuniens do tálamo se mostrou capaz de resgatar a capacidade de desestabilização de uma memória aversiva contextual consolidada sob a influência do agonista adrenérgico alfa-2 ioimbina, que leva à formação de memórias fortes através da supra ativação da neurotransmissão noradrenérgica, inibindo sua capacidade de desestabilização (Troyner, 2017).

De forma geral, a ocorrência da reconsolidação no CAC é atestada por modificações comportamentais após uma sessão de reativação da memória. Após ou durante essa sessão de reativação, intervenções farmacológicas ou comportamentais são aplicadas para que tenham ação sobre a reconsolidação da memória. Na maior parte dos casos, drogas amnésicas como inibidores de síntese proteica ou antagonistas NMDA são utilizados logo após a sessão de reativação para que a reconsolidação seja bloqueada. Dessa forma, uma diminuição significativa nos comportamentos defensivos frente ao contexto condicionado será observada em testes subsequentes. Em outros casos, drogas que potencializam a reconsolidação da memória podem ser utilizadas, aumentando assim a expressão de comportamentos defensivos nos testes. De qualquer forma, para que as intervenções sobre a reconsolidação tenham efeito, é necessário que a desestabilização da memória ocorra durante a sua reativação. Já que a expressão de comportamentos defensivos durante a sessão de reativação não é um preditor da ocorrência da desestabilização, e não existem outros meios diretos para a verificação de sua ocorrência, é comum que pesquisadores utilizem intervenções durante a reconsolidação para determinar se a sessão de reativação foi suficiente para a ocorrência da desestabilização (Kida, 2019; Zhang et al., 2018; Wideman et al., 2018). As condições para a ocorrência da desestabilização de memórias são relevantes para que protocolos de modificações de memórias possam ser utilizados na clínica. A possibilidade de interferir com memórias apresentou-se como uma tentadora oportunidade de tratamento para pacientes com patologias psiquiátricas relacionadas à manutenção de memórias traumáticas, aversivas e negativas, como fobias, o TEPT e ansiedade generalizada (Krawczyk et al., 2017), por exemplo. Para tanto, é necessário entender quais são os mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos envolvidos nessa desestabilização, para que possamos então aumentar a eficácia das intervenções voltadas à auxiliar esses pacientes.

O estudo da mecanística da ocorrência da desestabilização de memórias é muito mais recente do que a da reconsolidação. Mamou e colaboradores, em 2006, hipotetizaram que receptores glutamatérgicos NMDA na amígdala basolateral poderiam ser importantes para o processo de desestabilização de memórias auditórias, visto que a literatura já descrevia a importância desses receptores durante a sua aquisição e consolidação (Miserendino et al., 1990; Kim et al., 1993; Rodrigues et al., 2001; Walker e Davis, 2002). Segundo os autores, se tais receptores fossem importantes para esse processo, a utilização de antagonistas NMDA na amígdala basolateral antes de uma

sessão de reativação deveria manter tais memórias imutáveis, ou seja, essas memórias não seriam posteriormente afetadas pelo efeito amnésico do inibidor de síntese proteica anisomicina. Essa hipótese foi confirmada com o uso do antagonista NMDA AP5 ou do antagonista seletivo de receptores NMDA que contém a subunidade N2B ifenprodil. Em ambos os casos, a infusão destas drogas antes da reativação não impediu a expressão da memória de medo durante a reativação, mas impediu o efeito amnésico da anisomicina, indicando que a memória não havia sido desestabilizada (Mamou et al., 2006). Em 2008, Suzuki e colaboradores demonstraram que a ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes e receptores CB1 eram necessários para a desestabilização de memórias contextuais aversivas (Suzuki et al., 2008). Do ponto de vista celular e molecular, os achados são ainda mais recentes. Pesquisadores demonstraram que, além do efeito já bem reconhecido da neurotransmissão adrenérgica sobre a reconsolidação de memórias, para que estas sejam desestabilizadas há a necessidade de um aumento na excitabilidade das membranas dos neurônios envolvidos com essa memória no hipocampo de roedores. Ainda, no mesmo artigo, Lim e colegas demonstraram que a administração do beta-bloqueador propranolol e de um antagonista NMDA impediram o aumento dessa excitabilidade celular e bloquearam o efeito da anisomicina após a reativação, indicando que não houve desestabilização do traço mnemônico (Lim et al., 2018). Em 2019, Pignatelli e colegas demonstraram que, para que haja a desestabilização de memórias de medo contextuais, há um aumento transitório da excitabilidade das células envolvidas no engrama dessa memória (Pignatelli et al., 2019). Ou seja, para que a memória seja reativada e desestabilizada, é necessário que as mesmas células e regiões encefálicas que foram recrutadas durante a sua aquisição e consolidação sejam recrutadas durante a sua reativação. Sabendo que a reconsolidação de memórias aversivas é dependente da síntese proteica, pesquisadores da área passaram a se perguntar se a desestabilização dessas memórias seria, então, dependente do passo bioquímico anterior, ou seja, da degradação de estruturas proteicas nas células que subsidiam essa memória. De fato, em 2008, Lee e colaboradores demonstraram que a desestabilização de memórias é dependente de degradação proteica no hipocampo de roedores através do sistema ubiquitina-proteassoma. Com a infusão do inibidor específico do proteassoma, β -lactona (clasto-lactacystin- β -lactone), eles demonstraram que a ubiquitinação de proteínas presentes nas sinapses das memórias estudadas foi diminuída, e assim a suscetibilidade da memória à ação amnésica do inibidor de síntese proteica anisomicina foi anulada (Lee et al., 2008).

O mesmo fenômeno também foi demonstrado, posteriormente, na amígdala (Jarome et al., 2011). Também sabemos que a ativação de receptores NMDA, em especial contendo a subunidade N2B, aumenta a atividade do proteassoma tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bingol e Schuman, 2006, Jarome et al., 2011). Esse mecanismo não é regulado diretamente pelo influxo de cálcio promovido pela ativação dos receptores NMDA, mas sim pela CaMKII (proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina) (Jarome et al., 2016), e estudos bioquímicos demonstraram que o domínio catalítico da CaMKII tem uma alta seletividade de ligação pela cauda C-terminal da subunidade reguladora N2B do receptor NMDA (Strack e Colbran, 1998; Strack et al., 2000; Mayadevi et al., 2002), o que demonstra a ligação da ativação dessa subunidade para a ativação do proteassoma e consequente desestabilização da memória.

1.4. Plasticidade mnemônica e neurotransmissão glutamatérgica

A grande maioria das sinapses excitatórias do cérebro utiliza o glutamato como neurotransmissor. Receptores AMPA e NMDA são canais ionotrópicos glutamatérgicos. Enquanto os receptores AMPA mediam a transmissão glutamatérgica rápida, os receptores NMDA são conhecidos por apresentarem uma cinética muito mais lenta, em comparação. O poro iônico dos receptores NMDA encontra-se, enquanto a membrana celular estiver em potencial de repouso, bloqueado por um íon magnésio em sua porção extracelular. Para que o poro iônico dos receptores NMDA seja desbloqueado, é necessário que haja a despolarização da membrana através da ativação de receptores AMPA e que, ao mesmo tempo, glutamato e glicina se liguem ao receptor. Ainda, essa despolarização é mais eficaz em abrir os poros NMDA quando uma série de eventos sinápticos acontece em um curto espaço de tempo (Hansen et al., 2018). Devido a esses mecanismos, os receptores NMDA são considerados detectores de coincidência entre a atividade pré e pós-sináptica, evento essencial para a ocorrência de plasticidade sináptica (Seeburg et al., 1995; Baez et al., 2018). Receptores NMDA são tetrâmeros, ou seja, estruturas proteicas compostas por quatro subunidades. Duas dessas subunidades são obrigatoriamente subunidades denominadas NR1, que compõe um grupo com oito variantes, todas codificadas pelo mesmo gene, e as outras duas são subunidades reguladoras que contém o sítio de ligação do glutamato. Há quatro variantes das subunidades NR2 (A, B, C e D) e duas variantes das subunidades NR3 (A e B) (Paupard

et al., 1997; Goebel e Poosch, 1999). No hipocampo, na amígdala e no córtex pré-frontal, assim como em outras regiões do sistema nervoso central envolvidas em funções cognitivas, as subunidades reguladoras N2A e N2B são a grande maioria (Jin et al., 1997; Sanz-Clemente et al., 2013; Paoletti et al., 2013).

As subunidades reguladoras dos receptores NMDA determinam suas características fisiológicas e farmacológicas (Dingledine et al., 1999; Paoletti et al., 2013). A potência de ação do glutamato, por exemplo, é influenciada pela composição das subunidades NR2 nos receptores NMDA (Erreger et al., 2005; Hansen et al., 2008). O grande influxo de cálcio mediado pela ativação dos receptores NMDA gera cascatas de comunicação intracelulares que produzem aumentos duradouros na força sináptica, um fenômeno teorizado primeiramente por Donald Hebb (Hebb, 1949) e demonstrado experimentalmente por Bliss e Lomo (1973), e chamado de potenciação de longo-prazo (LTP, do inglês *long-term potentiation*). No entanto, a ativação prolongada e fraca desses mesmos receptores leva a um pequeno, porém duradouro, influxo de cálcio que diminui a força sináptica. Esse evento no sentido contrário da LTP é comumente chamado de depressão de longo prazo (LTD, do inglês *long-term depression*). Em suma, a direção da plasticidade (LTP ou LTD) pode ser determinada pela modulação da frequência do estímulo e de sua intensidade, o que recruta tipos diferentes de receptores NMDA, contendo subunidades reguladoras diferentes, já que estas apresentam estruturas e funcionalidades diferentes e ativam vias de comunicação intracelulares distintas. Achados farmacológicos indicam que, em geral, a ativação de NMDA-N2A é especialmente importante para a indução da LTP, enquanto que a ativação de NMDA-N2B está envolvida na LTD (Massey et al., 2004; Liu et al., 2004; Chen et al., 2007). Ainda, quando o glutamato se liga aos receptores NMDA-N2A, é mais provável que eles se abram do que quando o glutamato se liga a receptores NMDA-N2B (Paoletti et al., 2013). Considerando que as subunidades N2A são altamente expressas nas sinapses dos cérebros de mamíferos adultos (Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004), é bastante plausível que receptores NMDA-N2A sejam responsáveis pela maior parte da LTP mediada pela sinalização de cálcio. Em adição a isso há o fato de que estimulações de alta frequência que induzem LTP ativam predominantemente NMDA-N2A (Erreger et al., 2005). Resultados discrepantes presentes na literatura, no entanto, indicam que a mera ativação das subunidades N2A ou N2B não é determinante na orientação da plasticidade (ocorrência de LTP ou LTD) (Barria e Malinow, 2005; Bartlett et al., 2007). Assim, em

2010, Foster e colaboradores demonstraram que, mais do que a estrutura do poro iônico, a estrutura das caudas citoplasmáticas dessas subunidades é de extrema importância nesse processo. Utilizando estruturas quiméricas, eles desenvolveram um receptor que continha a estrutura do canal dos receptores NMDA que contém subunidades N2A, porém com a cauda citoplasmática característica das subunidades N2B. Com esses receptores, eles demonstraram que a cauda citoplasmática N2B é uma importante mediadora na interação de proteínas intracelulares e ativação de segundo-mensageiros, e que sua presença, independente da estrutura do canal iônico, é imprescindível para a ocorrência da LTP. Já a cauda citoplasmática das subunidades N2A não é essencial para a sua ocorrência, e ainda, parece inibi-la (Foster et al., 2010). Em suma, embora ambos os subtipos de receptores NMDA (N2A ou N2B) contribuam para a ocorrência de plasticidade, a generalização de que as subunidades N2A produzem plasticidade no sentido da LTP, enquanto subunidades N2B produzem plasticidade no sentido da LTD, parece uma simplificação da realidade biológica da função desses subtipos de receptores NMDA.

Independentemente de toda a discussão sobre a funcionalidade das subunidades N2A e N2B durante a indução de plasticidade, a proporção entre elas contribui para a regulação metaplástica da indução de desestabilização em memórias de medo. Em 2013, Milton e colaboradores demonstraram que há uma dissociação funcional entre os receptores NMDA contendo as subunidades N2A e N2B na amígdala basolateral de roedores. Ao passo que os receptores NMDA-N2B seriam necessários para a desestabilização da memória de medo, os receptores NMDA-N2A são necessários para a sua restabilização após a reativação (Milton et al., 2013). Em 2016, um grupo de pesquisa da Universidade do Texas em Dallas publicou o achado de que uma linhagem de camundongos que expressavam mais receptores NMDA contendo a subunidade N2A em neurônios alfa-CaMKII (porção alfa da proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina) positivos na amígdala basolateral, de forma relativa à expressão de receptores NMDA que contém a subunidade N2B, eram incapazes de desestabilizar uma memória de medo (Holehonnur et al., 2016). Utilizando-se do fato de que subunidades N2B apresentam muito maior afinidade pela CaMKII (Strack e Colbran, 1998; Strack et al., 2000; Mayadevi et al., 2002), uma molécula segundo-mensageira importante para a indução de plasticidade sináptica, do que pelas subunidades N2A, Barria e Malinow demonstraram que a substituição de subunidades N2B por subunidades N2A reduziu drasticamente a indução de plasticidade. No entanto, quando as subunidades N2A foram

modificadas de forma que se ligassem à CaMKII com a mesma afinidade das subunidades N2B, a plasticidade sináptica foi resgatada. Ainda, quando subunidades N2B foram modificadas de forma a perder a sua afinidade pela CaMKII, a plasticidade foi novamente reduzida. Esses dados indicam que a interação entre as subunidades N2B dos receptores NMDA e a CaMKII são imprescindíveis para a desestabilização de memórias (Barria e Malinow, 2005). Diversos outros grupos têm utilizado essa dissociação entre os receptores NMDA que contém as subunidades N2A e N2B como ferramenta para estudar processos de desestabilização e reconsolidação em roedores em diversos protocolos mnemônicos (Crestani et al., 2015; Yu et al., 2016; Monti et al., 2016; Nakayama et al., 2016). Em revisão sistemática, Amorim e colaboradores (2021) encontraram indícios de mecanismos em comum descritos tanto para suportar a desestabilização de memórias quanto para suportar a regulação homeostática da plasticidade no sistema nervoso central. Dessa forma, a plasticidade homeostática, um mecanismo mais complexo do que a plasticidade hebbiana, pode ser um mecanismo importante para o controle da desestabilização, o que ajudaria a entender a necessidade de uma sessão de reativação para a sua ocorrência. Ainda, os autores demonstraram teoricamente, utilizando dois modelos computacionais, que a plasticidade sináptica homeostática pode ser um dos mecanismos para o controle da desestabilização de memórias. (Amorim et al., 2021).

1.5. Plasticidade sináptica e genes de expressão imediata: Egr1/Zif268

Já há algumas décadas, os genes de expressão imediata (do inglês “*immediate early genes*”, IEGs) são utilizados como marcadores de atividade neuronal, muito embora suas funções ainda não tenham sido completamente compreendidas.

Após a sinalização de um estímulo indutor de plasticidade sináptica, íons cálcio adentram a célula através do poro dos receptores NMDA, uma etapa essencial da plasticidade sináptica, pois facilita o recrutamento de receptores AMPA para as sinapses potenciadas (Collindridge et al., 1983; Kessels e Malinow, 2009). Além disso, os receptores NMDA da membrana plasmática mantêm um fluxo de cálcio estável para que a sinalização necessária para a potenciação de longo prazo se mantenha, fortalecendo assim a plasticidade entre as células envolvidas, e sinalizando para que haja a produção de RNA mensageiro e síntese protéica (Kandel et al., 2014). A expressão de IEGs como

c-fos, *egr1* e *arc*, é seletivamente e imediatamente suprarregulada durante etapas do processamento mnemônico em subpopulações de neurônios dentro de regiões que subsidiam processos de aprendizagem e memória (Gallo et al., 2018).

A proteína *Egr1* também é conhecida como Krox-24, NGF1-A, Zif268, TIS8 e Zenk, e pertence à família de proteínas EGR (do inglês “*early growth response*”), tendo sido descoberta no final da década de 1980 (Curran et al., 1988). Embora tanto o gene quanto a proteína estejam presentes em todo o sistema nervoso central, sua expressão basal é variável, sendo que os níveis maiores são observados no neocórtex, em estruturas olfatórias primárias, no hipocampo, na amígdala, no estriado, no tálamo, e no córtex cerebelar. No córtex, sua maior expressão se concentra nas camadas IV e VI, e no hipocampo pode ser encontrada em maior quantidade na região CA1 (Worley et al., 1991; Beckman e Wilce, 1997; Hall et al., 2001; James et al., 2006; Veyrac et al., 2014). Sabemos que a expressão basal de Zif268/*Egr1* é estritamente regulada pela atividade de receptores NMDA, sendo também responsivas à atividade de receptores AMPA e canais de cálcio voltagem dependentes (Murphy et al., 1991; Worley et al., 1991; Wang et al., 1994). No hipocampo, a indução de plasticidade sináptica leva ao aumento na expressão de *Egr1*/Zif268, e aumento da duração da potenciação de longo prazo (LTP), que leva a mudanças consistentes que suportam a plasticidade e a formação de memórias. A indução do RNA mensageiro de Zif268 ocorre entre 10 e 120 minutos após o estímulo que induziu a plasticidade (Wisden et al., 1990; Abraham et al., 1991; Richardson et al., 1992). O envolvimento de Zif268/*Egr1* na plasticidade decorrente da reativação de uma memória em roedores foi demonstrado de diversas formas. Utilizando camundongos nocaute para *egr-1*, Bozon e colegas demonstraram que sua expressão é necessária para a consolidação e a reativação de memórias de reconhecimento de objetos em roedores (Bozon et al., 2003). Estudos demonstram que a expressão do gene Zif268 no hipocampo de roedores é necessária para a ocorrência da reconsolidação de uma memória aversiva contextual (Cole et al., 1989; Hall et al., 2001; Besnard et al., 2013). O envolvimento do Zif268 na reconsolidação de memórias não se restringe ao hipocampo, tendo também sido demonstrado na amígdala (Hall et al., 2001; Lee et al., 2005; Espejo et al., 2016; Marin et al., 2020). Diversos estudos demonstraram que a expressão de IEGs durante o processamento mnemônico é relevante para a integração de conjuntos de células ativadas à circuitaria necessária para suportar determinada memória (Hashikawa et al., 2011; Tonegawa et al., 2015; Minatohara et al., 2016; Salery et al., 2021). Em específico, a

expressão de *egr-1* é dependente da ativação de receptores NMDA e está associada a persistência da fase tardia de indução de LTP, majoritariamente responsável pela síntese proteica associada à plasticidade mnemônica durante a reconsolidação (Abraham et al., 1991; Abraham et al., 1993; Richardson et al., 1992; Dragunow, 1996). Em 2013, Besnard e colaboradores demonstraram que camundongos nocaute para *egr-1* apresentam um grande prejuízo de consolidação, enquanto que camundongos heterozigotos (que expressam parcialmente *egr-1*) demonstraram maior prejuízo na fase de reconsolidação de memórias. Tais dados demonstram que a quantidade da expressão de *egr-1* pode ser um ponto importante na determinação dos processos mnemônicos (Besnard et al., 2013).

1.6. Sistema límbico, núcleo reuniens e memórias

Desde a primeira descrição da amnésia sofrida pelo paciente H.M. na década de 50, o hipocampo é provavelmente a região mais estudada no que se refere ao processamento mnemônico (Scoville and Milner, 1957; Eichenbaum, 1993). Organizada em algumas sub regiões distintas, como o giro denteado, e os *cornus ammonius* 1, 2 e 3, essa região possui ainda uma diferenciação anátomo-funcional através do eixo longitudinal do encéfalo, indo da região anterior até a posterior. Tal distinção regional inclui diferenças na expressão gênica e na conectividade funcional relacionadas ao processamento mnemônico (Moser e Moser, 1998). Existe praticamente um consenso de que o hipocampo é essencial para a representação espacial e para a memória episódica, ou seja, a capacidade de lembrar de eventos específicos. Diz-se que o hipocampo é capaz de executar tais funções ao criar um mapa espacial e temporal detalhado, chamado de mapa cognitivo, de diversas situações, e correlaciona-las entre si (O'Keefe e Nadel, 1978). Ainda, em se tratando de memórias contextuais, essa característica é essencial para explicar a importância do hipocampo no comportamento de mamíferos. O hipocampo é capaz de integrar informações sensoriais sobre o contexto, fazendo com que, num novo contexto, um novo mapa cognitivo seja formado. Já num contexto conhecido, o mapa já formado é reativado, de forma que o animal se comporte de forma adequada àquela situação. Novidades em mapas cognitivos já adquiridos anteriormente podem gerar transformações nessas memórias, levando à sua desestabilização e atualização (Lisman et al., 2017).

A amígdala é a região do cérebro relacionada ao processamento emocional. É composta por múltiplos pequenos núcleos que se interconectam, sendo os núcleos basal e central da amígdala os mais estudados em relação ao processamento mnemônico (Duvarci e Pare, 2014). É uma estrutura altamente conservada dentre as mais diversas espécies, incluindo mamíferos, répteis, aves e peixes (McDonald, 1998; Jarvis et al., 2005). Há muito sabemos que lesões amigdalares experimentais causam prejuízos no reconhecimento de estímulos aversivos, como choques nas patas (Blanchard e Blanchard, 1972). O acesso a informações sensoriais primárias faz com que a amígdala seja uma região de processamento rápido de valências, positivas ou negativas, que acabam por guiar o comportamento de forma adaptativa. Além do processamento de medo, a amígdala está intimamente relacionada em comportamentos ligados à recompensas positivas, como a alimentação e a adição, e à ansiogênese (Janak e Tye, 2015).

O córtex pré-frontal medial (CPFm) de roedores consiste em três córtices, o anterior cingulado, mais dorsal, o pré-límbico, e o infralímbico, mais ventral (Nieuwenhuis e Takashima, 2011). O papel funcional do córtex pré-frontal medial no condicionamento aversivo contextual é assumido devido à sua importância no controle emocional do comportamento (Quirk e Beer, 2006). Estudos indicam que o CPFm tem um papel importante tanto em memórias recentes (Corcoran e Quirk, 2007; Stern et al., 2013), quanto em memórias remotas (Frankland et al., 2004; Stern et al., 2013). Anatomicamente, o CPFm possui conexões que o permitem acesso a estímulos que funcionam como motivadores do comportamento, como dor e recompensa, além de exercer controle sobre a atividade autonômica e ter um papel importante na formação de estratégias e tomada de decisão (Euston et al., 2012).

O núcleo reuniens do tálamo (NR) situa-se, anatomicamente, logo acima do terceiro ventrículo (Van der Werf et al., 2002). O tálamo subdivide-se em diversos tipos de núcleos de acordo com suas características anatômicas e funcionais: os núcleos principais (ou de retransmissão), os núcleos de associação, os núcleos da linha média e os núcleos intralaminares. O NR pertence ao grupo dos núcleos da linha média, assim como os núcleos paratênial, paraventricular e rombóide (Groenewegen e Witter, 2004). Os neurotransmissores principais encontrados no núcleo reuniens são os excitatórios arpartato e glutamato (Bokor et al., 2002; Cruikshank et al. 2012).

Dentre os núcleos da linha média, o NR é o mais estudado. Isso se deve ao fato de que, já em 1978, Herkenham demonstrou que ele é a maior fonte talâmica de aferentes ao hipocampo. Depois desse estudo, vieram outros que descreveram aferentes massivos e altamente organizados do NR ao hipocampo (Su e Bentivoglio, 1990; Dolleman-Van der Weel and Witter, 1996; Vertes et al., 2006, 2007). Os aferentes do NR inervam de forma proeminente a região CA1 dos hipocampos dorsal e ventral, assim como a camada molecular do subículo e do parasubículo (Vertes et al., 2006). No entanto, há evidências de que o NR inerve até 10 vezes mais a região ventral do hipocampo do que a região dorsal (Hoover e Vertes, 2012; Scheel et al., 2019). Em 1999, Bertram e Zhang demonstraram uma ativação direta e poderosa da região CA1 do HPC após estimulação elétrica do NR, em alguns casos maior do que a gerada pela mesma estimulação elétrica da região CA3. Até então, a via trissináptica do hipocampo era considerada a única fonte de conexões excitatórias à região CA1 (Bertram e Zhang, 1999). Neurônios provenientes do NR formam sinapses exclusivamente excitatórias tanto com as células piramidais da região CA1, quanto com interneurônios gabaérgicos (Dolleman Van der Weel e Witter, 2000). Tal arranjo sugere que o NR não exerce apenas influências excitatórias sobre o HPC, mas também inibitórias via conexões excitatórias com interneurônios inibitórios. Quanto às regiões CA2, CA3 e giro denteado, há uma ausência significativa de conexões advindas do NR (Wouterlood et al., 1990).

Todas as subdivisões do CPFm projetam-se, em grande quantidade, a todo eixo rostrocaudal do núcleo reuniens. Não parece haver diferenças nas quantidades e tipos dessas conexões entre essas subdivisões (Vertes, 2002). Tais regiões são, por sua via, também densamente inervadas por eferentes do NR (Vertes et al., 2006). Viana di Prisco e Vertes demonstraram que a estimulação elétrica do NR promove respostas monossinápticas no CPFm, em especial das regiões dos córtices pré-límbico e infralímbico (Viana Di Prisco e Vertes, 2006). Há descrições de fibras do NR que se projetam bilateralmente tanto para o HPC quanto para o CPFm, assim como de células do NR que se projetam ao HPC e são inervadas por fibras provenientes do CPFm (Vertes et al., 2007; Hoover e Vertes, 2012; Varela et al., 2014; Zimmerman e Grace, 2018; Viana et al., 2020). Enquanto sabemos que o hipocampo inerva o CPFm densamente (Carr e Sesack, 1996; Hoover e Vertes, 2007), não há projeções diretas de retorno do CPFm para o HPC (Laroche et al., 2000; Vertes, 2004). Tal fato sugere que o NR pode ser a principal rota de transferência de informação do CPFm para o HPC. De fato, achados funcionais e

eletrofisiológicos indicam que o NR tem papel importante na sincronização da atividade entre HPC e CPFm em diversas tarefas (Cassel et al., 2013; Xu e Südhof, 2013; Ferraris et al., 2018).

Outras áreas do sistema límbico são inervadas pelo NR. A amígdala basolateral (BLA) é uma delas, embora as conexões sejam significativamente menos densas do que as relatadas com o HPC e o CPFm (Vertes et al., 2006). Foram descritas células do NR que se projetam tanto para o HPC quanto para a amígdala basolateral, em pequeno número. Comparativamente, o número de células do NR que se projetam para o HPC é significativamente maior do que aquelas que se projetam para a BLA. No entanto, até a data não há descrições detalhadas dos tipos de conexões entre ambas as regiões (Su e Bentivoglio, 1990).

As evidências indicam que o NR organiza interações diretas e indiretas entre diversas regiões encefálicas que são recrutadas durante diversas tarefas cognitivas, como o processamento mnemônico, motivação e ações direcionadas por avaliações de situação e formação de estratégias comportamentais. Isso acontece porque o NR modula, de forma específica e temporalmente controlada, os padrões de atividades neuronais nessas regiões (Dolleman-van der Weel et al., 2019). Por exemplo, a estimulação de baixa frequência do NR sobre as células piramidais do HPC parece controlar a sincronização entre o HPC e o CPF, importante para a consolidação de memórias (Dolleman-van der Weel et al., 2017). De forma complementar, Hauer e colaboradores (2019) demonstraram, através de inativação optogenética que a atividade do NR é essencial para a coordenação de ondas de baixa frequência entre o HPC e o CPF, que são importantes para a consolidação de memórias episódicas.

Uma das capacidades cognitivas que dependem da interação entre o CPF e o HPC é a formação de mapas internos capazes de orientar o indivíduo através de tarefas em determinado espaço. O NR apresenta células, chamadas de *head direction cells*, que potencialmente influenciam mapas mentais formados no HPC (Jankowski et al., 2014). Em 2013, Xu e Südhof demonstraram que um circuito formado pelo CPFm-NR-CA1 controla a especificidade e generalização de contextos no condicionamento aversivo contextual. Mais tarde, foi demonstrado que lesões no NR prejudicam a estabilidade e a taxa de disparo das *place cells* hipocampais. (Cholvin et al., 2018). Dessa forma, o NR parece ter um papel importante na cognição espacial, que acaba por influenciar a tomada

de decisões do indivíduo através de mapas mentais. Diversos estudos também apontam para um papel do NR na memória de trabalho. Hallock e colaboradores demonstraram, em 2016, que a sincronização das ondas teta entre HPC e CPF é essencial para tarefas que recrutam a memória de trabalho, e que o NR é responsável por essa sincronização (Hallock et al., 2016).

Eventos que acontecem em contextos iguais ou muito semelhantes são organizados temporalmente na memória. É amplamente reconhecido que memórias para sequências de eventos são dependentes da atividade síncrona entre HPC e CPF (Euston et al., 2007; DeVito e Eichenbaum, 2011). Em 2019, Jayachandran e colaboradores demonstraram, utilizando uma tarefa de sequência de odores, que a inativação da via CPFm-NR aboliu a capacidade dos roedores de lembrarem dos odores em sequência (Jayachandran et al., 2019). Esse estudo demonstrou um papel do NR na capacidade de lembrar de eventos em sequência, embora outros estudos sejam necessários para confirmá-lo. Outro ponto importante é a participação do NR em tarefas executivas, creditadas majoritariamente ao CPF, como o comportamento direcionado a objetivos, atenção, e flexibilidade comportamental. Animais com lesão no NR no labirinto aquático de Morris não demonstraram dificuldades de aquisição nem retenção da memória. Porém, em contraste com os animais SHAM, que persistiram na busca pela plataforma quando esta foi retirada do quadrante correto, os animais com lesão no NR rapidamente desistiram do quadrante correto e passaram a procurar pelo aparato inteiro. Essa rápida mudança pode ser interpretada como dificuldade em adotar uma estratégia mais eficiente de busca (Dolleman-van der Weel et al, 2009). Consonante com essa ideia, Viena e colaboradores (2018) demonstraram que, em um labirinto em T, animais com inativação temporária do NR demonstraram comportamento repetitivo de busca no local errado mesmo após diversos erros e ausência de recompensa. Tal comportamento demonstra uma incapacidade de mudança de estratégia, reconhecida como falta de flexibilidade comportamental (Viena et al., 2018). Também há evidências de que o NR participe do controle inibitório de respostas prematuras e inapropriadas frente a estímulos visuais, mais especificamente respostas inapropriadas frente à antecipação de um estímulo visual. Animais com lesões no NR apresentaram respostas impulsivas e inapropriadas frente a estes estímulos (Prasad et a., 2019).

Loureiro e colaboradores foram os primeiros a descrever o envolvimento do NR na persistência de memórias. Eles descreveram que, em ratos submetidos ao treinamento

no labirinto aquático de Morris que sofreram lesão no NR, a aquisição da memória foi normal, assim como sua expressão 5 dias depois, mas não houve expressão dessa memória 25 dias após o aprendizado. Quando utilizada uma inativação temporária do NR, a expressão da memória não foi afetada nem 5, nem 25 dias após o aprendizado (Loureiro et al., 2012). Tais dados indicam que o NR participa do processo de consolidação de memórias a longo prazo, o que interfere diretamente na sua persistência. Evidências mais recentes apontam também para um papel importante do NR na persistência de memórias aversivas contextuais (Quet et al., 2020). Além disso, há evidências de que o NR participe ativamente do controle da generalização e especificidade de memórias aversivas contextuais, além da sua intensidade (Xu e Südhof, 2013; Troyner et al., 2018). Em 2019, Ramanathan e Maren demonstraram o envolvimento deste núcleo também na extinção de uma memória aversiva contextual. Em 2018, Ramanathan e colaboradores já haviam demonstrado, através de inibição optogenética, que fibras provenientes do CPF para o NR são essenciais para que ocorra a extinção de uma memória contextual de medo (Ramanathan et al., 2018).

Em humanos, estudos envolvendo o NR ainda são incipientes, muito embora sugeriram similaridades importantes entre o NR de roedores e humanos (Reagh et al., 2017; Thielen et al., 2018; Wagner et al., 2019; Romeo et al., 2019). Ainda, o NR parece estar envolvido em algumas patologias, como a doença de Alzheimer (Braak and Braak, 1991; Hardenacke et al., 2013, Walsh et al., 2020), a síndrome de Korsakoff (Visser et al., 1999; Bobal e Savage, 2005), autismo (Ray et al., 2005), depressão (Kafetzopoulos et al., 2018; Kafetzopoulos et al., 2021), epilepsia (Hirayasu and Wada, 1992a, 1992b; Bertram et al., 2001; Sloan and Bertram, 2009; Graef et al., 2009; Wang et al., 2009; Drexel et al., 2011; Romeo et al., 2019; Dolleman-van der Weel e Witter, 2020), e esquizofrenia (Cohen et al., 1998; Lambe et al., 2007; Lisman et al., 2010; Lisman 2012; Zhang et al., 2012; Saalman, 2014; Duan et al., 2015; Dolleman-van der Weel e Witter, 2020).

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

As características neuroanatômicas, eletrofisiológicas e bioquímicas do núcleo reuniens, quando somadas às descobertas sobre a desestabilização e a restabilização de memórias no sistema nervoso central de mamíferos, contribuem para que hipotetizemos que o núcleo reuniens promove a desestabilização de traços mnemônicos de forma sistêmica, através da sua atividade em conjunto com outras regiões do encéfalo e da neurotransmissão glutamatérgica através dos receptores NMDA que contém as subunidades N2A e N2B, assim como sua reconsolidação. Portanto, o objetivo principal deste trabalho é investigar a participação do núcleo reuniens na desestabilização e na reconsolidação de memórias aversivas contextuais, utilizando-se de ferramentas já conhecidas na literatura científica, através de um protocolo comportamental bem definido.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar a participação do núcleo reuniens do tálamo na desestabilização de memórias aversivas contextuais.
- Investigar a necessidade da degradação de proteínas no NR para a desestabilização de memórias aversivas contextuais.
- Investigar a participação dos receptores NMDA-N2B do NR na desestabilização de memórias aversivas contextuais.
- Investigar a participação do NR na reconsolidação de memórias aversivas contextuais.
- Investigar a participação dos receptores NMDA-N2A do NR na reconsolidação de memórias aversivas contextuais.
- Investigar a necessidade de síntese protéica no NR para a reconsolidação de memórias aversivas contextuais.
- Investigar a participação do tônus noradrenérgico na reconsolidação de memórias aversivas contextuais subsidiadas pelo NR.
- Investigar a influência da atividade do NR durante a desestabilização de memórias aversivas contextuais em outras regiões encefálicas: hipocampo dorsal, hipocampo ventral, córtex pré-frontal e amígdala basolateral.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados quatrocentos e quatorze ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 2 a 4 meses de idade e peso entre 220 e 320 g. Durante sua permanência no biotério, os animais foram alojados em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm) contendo até 5 ratos cada. Eles tiveram água e comida *ad libitum* e a temperatura ambiente foi mantida em 21 ± 2 °C, com ciclo de luz claro/escuro de 12 h com início às 07 h. Todos os procedimentos foram realizados mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA 6335220419).

3.2. Drogas

Muscimol (0,48 µg/µl; Tocris, EUA) foi dissolvida em PBS 0,01 M. O muscimol é uma ferramenta bem estabelecida na literatura, utilizada para induzir a inativação temporária de regiões encefálicas por meio da potencialização gabaérgica através de agonismo GABAa. Estima-se que o muscimol suprima a atividade de uma região de 0,5 até 1 mm de diâmetro do ponto de infusão (Allen et al., 2008). A dose utilizada neste trabalho foi baseada em estudos prévios publicados pelo nosso laboratório (Stern et al., 2014).

Cloridrato de clonidina (CLO; 0,3 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), dissolvida em água destilada e administrada de forma sistêmica através de injeção intraperitoneal em um volume de 1,0 mL/kg. A dose utilizada baseia-se em trabalhos prévios do laboratório (Gazarini et al., 2013, 2014; Troyner et al., 2018; Marin et al., 2020; Troyner e Bertoglio, 2020). A clonidina é um agonista de receptores α_2 adrenérgicos, reconhecida como agente amnésico e bloqueador da reconsolidação de memórias (Gamache et al., 2012).

Tartarato de ifenprodil (IFE; 0,25 nmol/µl; Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em PBS 0,01 M. O ifenprodil é um antagonista específico dos receptores NMDA que contém a subunidade N2B, prevenindo a desestabilização de memórias em diversos

trabalhos da literatura (Ben Mamou et al., 2006; Milton et al., 2013; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015; Monti et al., 2016; Shehata et al., 2018)

β -lactona (clasto-lactacystin β -lactone; β -lac; 7,4 ng/ μ l; Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em PBS 0,01 M contendo 2% dimetilsulfóxido (DMSO). A β -lactona é um inibidor do sistema ubiquitina-proteassoma e utilizado para bloquear a degradação protéica relacionada à desestabilização de memórias (Lee et al., 2008; Jarome et al., 2011, 2016; Shehata et al., 2018).

Anisomicina (16 μ g/ μ l; Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvida em PBS 0,01 M. É um bloqueador de síntese protéica comumente utilizado como bloqueador de reconsolidação (Nader et al., 2000; Lee et al., 2008).

TCN-201 (1 nmol/ μ L, Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em PBS 0,01 M. É um antagonista específico dos receptores NMDA que contém a subunidade N2A (Edman et al., 2012), envolvidos na reconsolidação de memórias (Milton et al., 2013).

Todas as drogas infundidas intra-NR estavam no volume de 0,2 μ L. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, sendo que a anisomicina e a β -lactona tiveram o pH corrigido para 7,4. O volume da infusão intraperitoneal de clonidina foi de 1 mL/kg.

3.3. Cirurgia estereotáxica

Os animais foram primeiramente pesados e então receberam uma injeção intraperitoneal de quetamina (100 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) para anestesia. Após atingir plano anestésico adequado, os animais tiveram os pêlos do topo da cabeça cortados e foram posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) com o suporte de duas barras auriculares. A assepsia do campo cirúrgico foi realizada com solução de álcool iodado 2% e, posteriormente, uma solução anestésica de lidocaína 3% com epinefrina 1:50000 (Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea no local da incisão. Um corte longitudinal da pele acima do crânio permitiu a exposição e raspagem do perióstio para a exposição do crânio e das suturas lambdoide e coronal. Após perfuração com broca odontológica, dois parafusos de aço inoxidável foram afixados ao crânio do animal para oferecer suporte à

prótese de acrílico posteriormente utilizada. Uma cânula-guia de 15 mm confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas (22 G; 25,0 x 7,0 mm) foi implantada unilateralmente em ângulo de 15° nas coordenadas obtidas através de consulta ao atlas do cérebro de ratos Paxinos e Watson (2009) referentes ao núcleo reuniens do tálamo (AP: - 1,8 mm from Bregma, ML: - 1,9 mm, DV: - 6,5 mm). Por fim, uma camada de acrílico odontológico auto-polimerizável de secagem rápida foi aplicada para cobrir toda a superfície exposta do crânio e afixar todas as peças em uma prótese sólida. O tratamento pós-operatório consistiu de uma injeção subcutânea de flunixin meglumina (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), uma substância antipirética e antiinflamatória. Após o término da cirurgia, os animais foram mantidos em uma cama aquecida por 30 minutos para diminuir o risco de hipotermia. Em seguida, foram levados ao biotério e mantidos em suas caixas-moradia num número máximo de 4 animais por caixa por 10 dias para recuperação e posterior utilização experimental.

3.4.Procedimento de microinjeção central

A microinjeção de drogas ou veículo no núcleo reuniens do tálamo foi executada através de agulhas com 15,5 mm de comprimento confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30 G, 13 mm) conectadas a um tubo de polietileno acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) preenchida com água destilada. Uma bolha de ar foi interposta entre a água e a solução a ser injetada, de forma a facilitar a visualização do deslocamento da solução durante a infusão. No momento da microinjeção o animal foi deixado livre dentro de uma caixa de transporte de pequenas proporções. A agulha foi introduzida na cânula e a infusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), no volume de 0,2 µL durante 60 segundos. Após a injeção, a agulha foi mantida em posição por mais 30 segundos para assegurar a infusão total da droga e reduzir o fluxo retrógrado da solução.

3.5.Histologia

Ao término dos experimentos, os animais receberam uma solução anestésica de quetamina (100 mg/ml/kg) e xilazina (10 mg/ml/kg) por via intraperitoneal. Após

atingirem plano anestésico adequado, os animais receberam uma solução contendo cloral hidratado (15%; 3,0 ml/kg; Vetec, Brasil) através de injeção intraperitoneal, seguida pela microinjeção central de corante azul de Evans (0,2 µl). Após a decapitação, os encéfalos foram retirados e conservados individualmente em solução de formalina 10% por 48 horas, sendo posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% por, no mínimo, 48 horas antes da realização dos cortes histológicos. Para a verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais de 20 µm de espessura foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -25 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram submetidas à coloração por Hematoxilina-Eosina, montadas com resina sintética e cobertas com lamínulas. Imagens histológicas representativas foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, EUA) equipado com câmera digital. Os cortes foram comparados a diagramas do cérebro de ratos (Paxinos e Watson, 2009) e apenas os animais com histologia confirmada para o NR foram incluídos na análise estatística dos dados. A figura 1 é uma imagem representativa do NR com o sítio de infusão considerado como correto para a análise histológica. A localização das injeções variou entre 1,8 e 2,3 mm posterior ao bregma. Animais que receberam injeções fora do NR (aproximadamente 23%) foram excluídos das análises estatísticas.

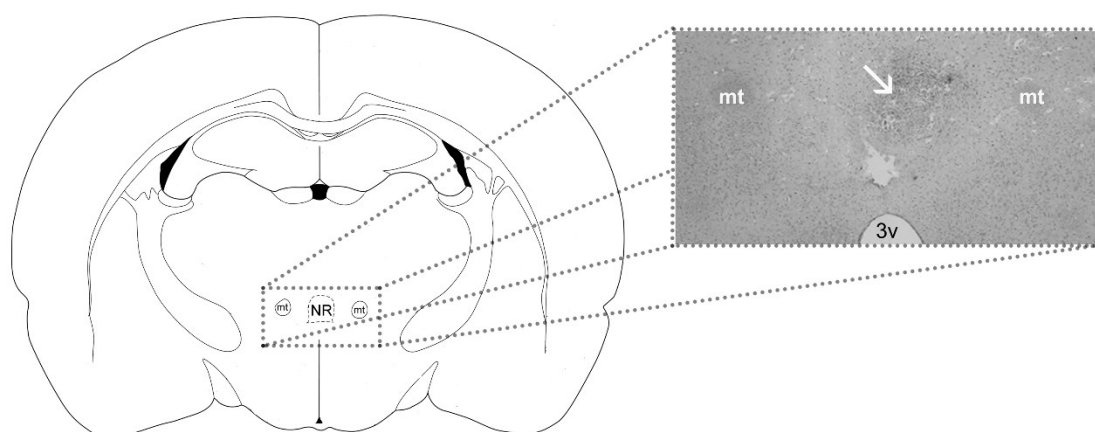


Figura 1. Esquema ilustrativo do sítio de injeção considerado como correto para o núcleo reuniens do tálamo em cortes transversais do cérebro de ratos Wistar. Fonte: compilação do autor: Paxinos, et al., 2019, e figura de própria autoria.

3.6. Condicionamento de medo contextual

O condicionamento de medo contextual foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais e posterior de alumínio e parede frontal de acrílico, assim como sua tampa. O piso gradeado, feito com barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, com 9 mm de espaçamento) encontrava-se conectado a um gerador digital de choques elétricos (Insight, Brasil). Esta caixa será doravante denominada de contexto pareado ou contexto A. Outro contexto, denominado contexto C, redondo, feito de plástico opaco com paredes de 20 cm de altura e uma grade de cobertura, foi utilizado quando o objetivo era omitir a sessão de reativação. Os experimentos comportamentais foram realizados sob condições de luminosidade controlada (70 lux) e ocorreram entre as 10:00 e as 17:00. Cada animal passou por uma sessão de familiarização, na qual foi permitido explorar o contexto A livremente por 3 minutos. No dia seguinte, ocorreu a sessão de condicionamento ou pareamento, durante a qual o animal recebeu, após 30s de livre exploração, 3 choques elétricos nas patas (0,8 mA, 60 Hz, por 3 segundos), com intervalo de 30 segundos entre cada choque. A intensidade dos choques elétricos foi definida com base em padronização utilizando animais que passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a injeção de drogas após o condicionamento. Foi considerada adequada a intensidade que provocava intenso aprendizado, sugerido por níveis de congelamento entre 60% e 85% na primeira reexposição ao contexto pareado. Após a aplicação dos choques elétricos, o animal foi deixado por mais 30 segundos no contexto A e então retirado e devolvido à caixa-moradia. Um dia após o condicionamento, os animais foram reexpostos ao contexto pareado (contexto A) durante 5 minutos, sem a apresentação de choques, para a reativação da memória aversiva (Reativação). Em alguns casos, utilizamos o contexto C, completamente diferente do contexto A, para uma sessão denominada de não-reativação, na qual a memória aversiva original não apresenta desestabilização e reconsolidação. O tempo de exposição a esse contexto também foi de 5 minutos. Tratamentos que visavam interferir com a desestabilização da memória foram aplicados 10 minutos antes da sessão de reativação / não-reativação. Tratamentos que visavam interferir com a reconsolidação da memória foram aplicados logo após a sessão. Um dia depois, os animais foram expostos novamente ao contexto pareado (contexto A) durante 3 minutos, a fim de avaliar o impacto dos tratamentos e da sessão de reativação / não-reativação sobre o comportamento aversivo e a memória. Um dia após o teste A, os

animais foram expostos por 3 minutos a um contexto quadrado feito de vidro e com tampa gradeada, denominado contexto B, com o objetivo de investigar a especificidade e a generalização da memória aversiva contextual. De forma geral, os testes tiveram um espaçamento de 24 horas entre si.

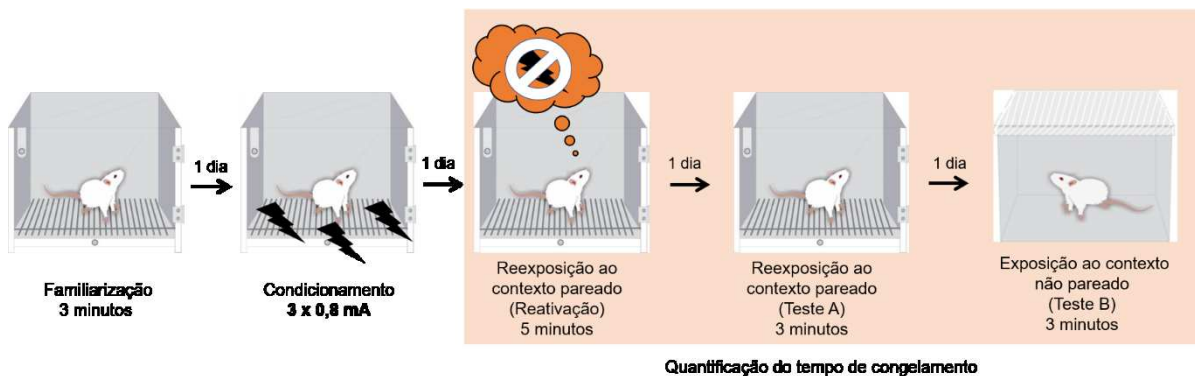


Figura 2 - Esquema representativo do protocolo comportamental utilizado.



Figura 3. Esquema representativo das intervenções utilizadas e sua potencial ação sobre o congelamento no teste A. (1) Quando não há qualquer intervenção antes ou após a sessão de reativação, a memória permanece gerando respostas defensivas quando da exposição dos animais ao contexto pareado durante o teste A, mantendo o nível de congelamento semelhante àquele apresentado durante a sessão de reativação. (2) Quando há intervenções farmacológicas utilizadas antes da sessão de reativação, estas são destinadas a interferir com a desestabilização da memória. Não havendo desestabilização, tampouco há reconsolidação dessa memória. Dessa forma, interferentes utilizados para bloquear a reconsolidação, como a anisomicina ou a clonidina, não são capazes de diminuir a resposta de congelamento do animal frente ao contexto pareado. Dessa forma, a porcentagem de congelamento se mantém. (3) Quando há desestabilização, intervenções farmacológicas utilizadas que interfiram com a reconsolidação da memória são capazes de

prejudicá-la. Assim, o nível de congelamento destes animais durante o teste A tende a ser significativamente menor do que o nível apresentado durante a sessão de reativação. Fonte: Própria autoria.

3.7. Imunoistoquímica para EGR-1

3.7.1. Perfusão intracardíaca e preparação do tecido cerebral

Noventa minutos após a infusão dos tratamentos e sessão de reativação, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado 15% (p/v) (2,3 mg/ml/kg; Vetec, Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Syntec, Brasil) por via sistêmica através de injeção intraperitoneal, seguida de perfusão intracardíaca. Inicialmente foi estabelecido um fluxo com solução salina (0,9% NaCl; aproximadamente 300 mL por animal) e posteriormente com uma solução de paraformaldeído 4% em PBS 0,01 M (pH 7,4; aproximadamente 200 mL por animal). Os encéfalos foram retirados e conservados em solução tamponada de paraformaldeído 4 % por 48 h. Posteriormente, foram transferidos para uma solução de álcool 50 % (v/v), onde permaneceram por até 48 h e, depois, para uma solução de álcool 70 % (v/v) onde permaneceram até seu processamento (Processador de amostras Leica TP1020). Após o emblocamento em parafina (Emblocador de amostras Leica EG1150H), cortes seriados das regiões de interesse (8 µm) foram obtidos em um micrótomo (Micrótomo rotativo Leica RM2255) e fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas.

3.7.2. Reação imunoistoquímica

A parafina foi derretida em estufa a 100°C por 2 minutos, e as lâminas foram então imediatamente imersas em 3 banhos de xilol (5 min cada), seguidos por 3 banhos de álcool etílico absoluto (5 min cada), e em seguida mergulhadas em dois banhos de PBS 0,01 M. A peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio 3 % (v/v) em metanol absoluto por 20 minutos, em temperatura ambiente, no escuro. Após 3 lavagens (5 min) com PBS 0,01 M (pH 7,4) gelado, a reativação antigênica foi feita com uma solução de tripsina 0,05% em PBS 0,01 M e incubação em estufa a 37°C por 10 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-EGR1 (1:50 em PBS 0,01 M; Santa Cruz Biotechnology, EUA) em câmara úmida a 4°C overnight (14-16 h). Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS 0,01 M gelado e incubadas com anticorpo secundário

IgG-kappa conjugado a HRP (1:500; Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 120 minutos em câmara úmida, temperatura ambiente. Após mais lavagens em PBS gelado (3 x 5 min), os cortes foram incubados com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:500 em PBS-T; Vector Laboratories, EUA) por 60 minutos em câmara úmida, temperatura ambiente. A revelação foi feita com uma solução contendo tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB 0,02%, Sigma Aldrich, EUA), peróxido de hidrogênio, DMSO e PBS 0,01 M durante 120 segundos. As lâminas foram então desidratadas em banhos consecutivos de álcool absoluto e xilol, e montadas com ERV-Mount (Erviagas, Brasil) e lamínulas de vidro.

3.7.3. Regiões de interesse e quantificação de células Egr1/Zif268 positivas

A quantificação de células EGR1/Zif268 positivas foi realizada em porções de 0,4 mm² do núcleo reuniens (2,2 - 3,2 mm posterior ao bregma), CA1 dorsal (2,2 - 3,2 mm posterior ao bregma), CA1 ventral (4,9 - 6,0 mm posterior ao bregma), amígdala basolateral (2,2 - 3,2 mm posterior ao bregma), e córtices pré-límbico e infralímbico (2,5 - 3,7 mm anterior ao bregma). A quantificação foi manual através do software ImageJ (NIH, EUA). Cada área de interesse foi analisada em triplicata, e a média das três amostras foi calculada. Os dados do grupo não-reativado foram utilizados para normalização do número de células EGR1 positivas nos demais grupos. Assim, os resultados foram analisados como porcentagem dos valores dos grupos não-reativados.

3.8. Análise estatística

O tamanho da amostra foi determinado através de análise de poder estatístico, e ficou estabelecida como 6-8 animais por grupo ($\alpha = 0,05$; $\beta = 0,10$ e Cohen's $d = 1,0$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após ter sido assegurada a distribuição normal dos dados e a homogeneidade de variância, estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando reexposições ao mesmo contexto foram analisadas, adotamos a ANOVA de medidas repetidas. Após as análises de variância, o teste post-hoc de Newman-Keuls foi aplicado, adotando-se um valor de significância estatística $P < 0,05$. Quando foi considerada apenas uma exposição ao contexto, como nos testes B, uma ANOVA de duas vias foi utilizada, seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls quando necessário. O tamanho de efeito foi calculado utilizando a fórmula para Hedges' g , de forma a refletir a diferença média entre dois

grupos que podem ser diferentes em tamanho ($n \leq 20$). Um $g \geq 0,8$ foi considerado um tamanho de efeito significativo (Ellis, 2010). Todos os dados obtidos foram analisados com o software Statistica® 13.5 (Dell, StatSoft Inc., EUA) e representados graficamente através do GraphPad Prism® 8 (GraphPad Prism, EUA).

3.9.Descrição dos experimentos

Experimento 1

Cinquenta e dois ratos foram aleatoriamente alocados em 6 grupos ($n= 7-10$ /grupo) baseando-se no pré-tratamento recebido (veículo ou muscimol) 10 minutos antes da sessão de reativação, e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) logo após a sessão de reativação. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 2

Quarenta e sete ratos foram aleatoriamente alocados em 6 grupos ($n= 7-9$ /grupo) baseando-se no pré-tratamento recebido (veículo ou β -lactona) 10 minutos antes da sessão de reativação, e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) logo após a sessão de reativação. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 3

Cinquenta e três ratos foram aleatoriamente alocados em 6 grupos ($n= 7-10$ /grupo) baseando-se no pré-tratamento recebido (veículo ou ifenprodil) 10 minutos antes da sessão de reativação, e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) logo após a sessão de reativação. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 4

Setenta e seis ratos foram aleatoriamente alocados em 12 grupos ($n= 6-8$ /grupo) baseando-se no pré-tratamento recebido (veículo, muscimol, β -lactona ou ifenprodil) 10 minutos antes da sessão de não-reativação, e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) logo após a sessão de não-reativação. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 5

Cinquenta e dois ratos foram aleatoriamente alocados em 6 grupos (n= 7-10/grupo) baseando-se no pré-tratamento (veículo ou muscimol) recebido logo após a sessão de reativação e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) 10 minutos após o pré-tratamento. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 6

Quarenta e quatro ratos foram aleatoriamente alocados em 6 grupos (n= 6-8/grupo) baseando-se no pré-tratamento (veículo ou TCN-201) recebido logo após a sessão de reativação e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) 10 minutos após o pré-tratamento. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 7

Trinta e cinco ratos foram aleatoriamente alocados em 6 grupos (n= 5-6/grupo) baseando-se no pré-tratamento (veículo ou muscimol) recebido logo após a sessão de não-reativação e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) 10 minutos após o pré-tratamento. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 8

Trinta e sete ratos foram aleatoriamente alocados em 6 grupos (n= 6-7/grupo) baseando-se no pré-tratamento (veículo ou TCN-201) recebido logo após a sessão de não-reativação e no tratamento recebido (veículo, anisomicina ou clonidina) 10 minutos após o pré-tratamento. Os testes A e B foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de reativação, respectivamente.

Experimento 9

Dezoito ratos foram aleatoriamente alocados em 3 grupos (n= 6/grupo), baseando-se no pré-tratamento recebido (veículo ou muscimol) 10 minutos antes da sessão, e no tipo de sessão realizada (reativação ou não-reativação). Os animais foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos removidos 90 minutos depois.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da inativação temporária do NR sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais

Uma ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e sessões ($F_{2,46} = 7,5$; $p = 0,001$) sobre o tempo de congelamento na sessão de reativação e no teste. Muito embora os fatores tratamento e pré-tratamento não tenham apresentado efeito quando isolados (Tratamento $F_{2,46} = 1,42$; $p = 0,25$; Pré-tratamento $F_{2,46} = 2,41$; $p = 0,12$) ou combinados ($F_{2,46} = 0,76$; $p = 0,46$), o fator Sessão, que corresponde à repetição da exposição ao contexto na sessão de reativação e no Teste A, mostrou efeito significativo de forma isolada e interagiu com os demais fatores (Sessão $F_{1,46} = 26,78$; $p = 0,00$; Sessão x Tratamento $F_{2,46} = 21,14$; $p = 0,00$; Sessão x Pré-tratamento $F_{1,46} = 37,84$; $p = 0,00$). O post-hoc de Newman-Keuls mostrou que todos os grupos apresentaram valores semelhantes de congelamento durante a sessão de reativação, o que indica que não houve influência do pré-tratamento sobre a expressão da memória durante a reativação da memória. No teste A, no entanto, os grupos VEH-ANI e VEH-CLO tiveram níveis de congelamento significativamente menores do que o grupo VEH-VEH ($p = 0,02$; $g = 1,59$; e $p = 0,05$; $g = 1,21$, respectivamente). Ainda, ambos os grupos tiveram níveis significativamente mais baixos de congelamento em relação a eles mesmos durante a sessão de reativação ($p = 0,0001$; $g = 2,02$; e $p = 0,0001$; $g = 1,63$, respectivamente). Tais dados confirmam que tanto a anisomicina quanto a clonidina, utilizados como controles positivos, tiveram ação amnésica quando utilizados após a sessão de reativação. Além do efeito das drogas, confirmamos que a sessão de reativação realizada é capaz de provocar um processo de desestabilização-restabilização da memória aversiva contextual. Já os grupos MUS-ANI e MUS-CLO não mostraram diferenças significativas nem quanto ao controle durante o teste A ($p = 0,98$; $g = 0,01$; e $p = 0,99$; $g = 0,13$, respectivamente), nem quanto aos seus próprios valores durante a sessão de reativação ($p = 0,98$; $g = 0,032$; e $p = 0,96$; $g = 0,17$, respectivamente). Tais dados demonstram que a inatividade do NR durante a sessão de reativação impediu a desestabilização da memória aversiva, impedindo também a ação amnésica da anisomicina e da clonidina. A tabela 1 indica que não houve efeitos do pré-tratamento nem do tratamento sobre a especificidade e a generalização da memória no teste B.

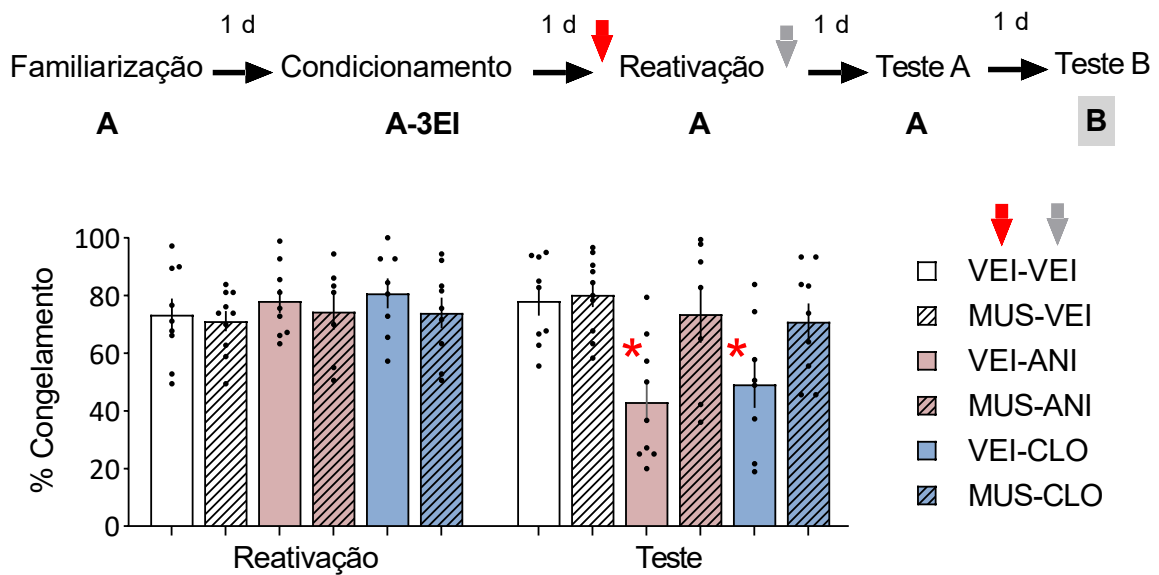


Figura 4 A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não prejudica a expressão da memória aversiva, mas impede a sua desestabilização. Veículo (VEI) ou muscimol (MUS) foram infundidos no NR 10 minutos antes da sessão de reativação. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados logo após a sessão de reativação. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. Asteriscos representam as diferenças significativas descritas abaixo. Fonte: própria autoria.

Tabela 1. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). ANOVA de duas vias.

Teste B			
Grupo	n	Média	EPM
VEI-VEI	9	21	± 6
MUS-VEI	10	13	± 3
VEI-ANI	9	20	± 5
MUS-ANI	7	30	± 8
VEI-CLO	8	17	± 4
MUS-CLO	9	23	± 8

$F_{2,46} = 1,20; p = 0,30$

4.2. Efeitos da inibição da degradação proteica no NR sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais

Uma ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e sessões ($F_{2,43} = 10,7$; $p = 0,0001$) sobre o tempo de congelamento na sessão de reativação e no teste. Isoladamente, tanto o fator Pré-tratamento ($F_{1,42} = 9,50$; $p = 0,003$) quanto Tratamento ($F_{2,42} = 4,68$; $p = 0,014$) apresentaram efeitos significativos, mas não quando combinados ($F_{2,42} = 0,72$; $p = 0,49$). O fator Sessão teve efeito significativo tanto de forma isolada ($F_{1,42} = 50,61$; $p = 0,00$) quanto combinado aos demais fatores (Sessão x Pré-tratamento $F_{1,42} = 26,18$; $p = 0,00$; Sessão x Tratamento $F_{2,42} = 16,35$; $p = 0,00$). O post-hoc de Newman-Keuls mostrou que todos os grupos apresentaram valores semelhantes de congelamento durante a sessão de reativação, o que indica que não houve influência do pré-tratamento sobre a expressão da memória durante a reativação da memória. No teste, no entanto, os grupos VEH-ANI e VEH-CLO tiveram níveis de congelamento significativamente menores do que o grupo VEH-VEH ($p = 0,0001$; $g = 2,68$; e $p = 0,0001$; $g = 2,69$, respectivamente). Ainda, ambos os grupos tiveram níveis significativamente mais baixos de congelamento em relação a eles mesmos durante a sessão de reativação ($p = 0,0001$; $g = 2,19$; e $p = 0,0001$; $g = 1,79$, respectivamente). Como no experimento anterior, esses dados confirmam que tanto a anisomicina quanto a clonidina, utilizados como controles positivos, tiveram ação amnésica quando utilizados após a sessão de reativação. Já os grupos β -lac-ANI e β -lac-CLO não mostraram diferenças significativas nem quanto ao controle durante o teste ($p = 0,90$; $g = 0,17$; e $p = 0,97$; $g = 0,03$, respectivamente), nem quanto aos seus próprios valores durante a sessão de reativação ($p = 0,82$; $g = 0,07$; e $p = 0,44$; $g = 0,23$, respectivamente). Na tabela 2, podemos observar que não há diferenças entre os grupos durante o teste B. Tais dados demonstram que a degradação proteica no NR é necessária para o processo desestabilização-restabilização de memórias aversivas, mas não para a expressão dessa memória aversiva durante a sessão de reativação, e tampouco interfere com a especificidade dessa memória quando testada no contexto B.

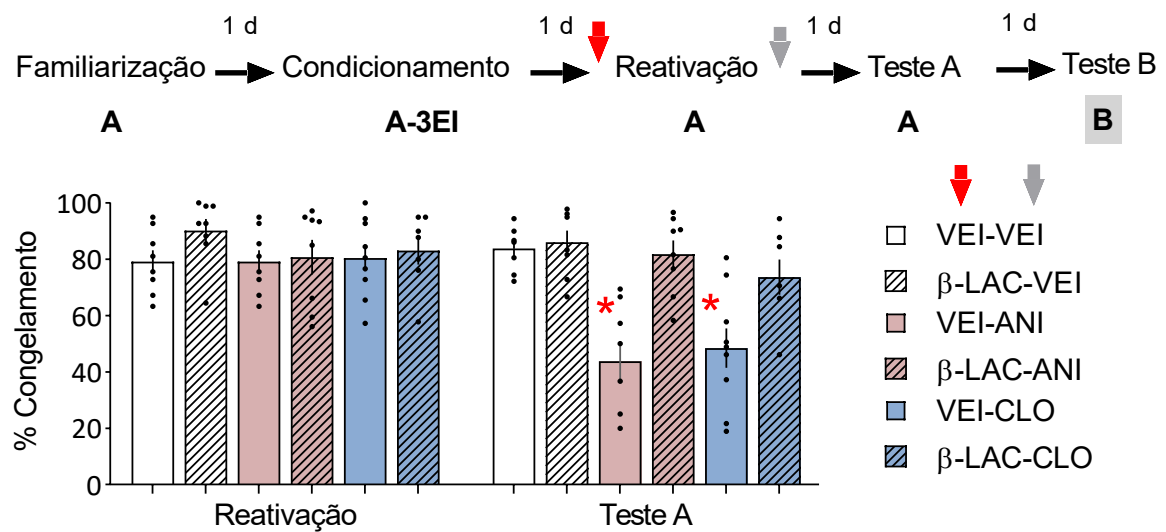


Figura 5 A inibição da degradação protéica no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não prejudica a expressão da memória aversiva, mas impede a sua desestabilização. Veículo (VEI) ou beta-lactona (β -LAC) foram infundidos no NR 10 minutos antes da sessão de reativação. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados logo após a sessão de reativação. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. Asteriscos representam as diferenças significativas descritas abaixo. N= 7-9 / grupo.

Tabela 2. A inibição da degradação protéica no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). ANOVA de duas vias.

Teste B			
Grupo	n	Média	EPM
VEI-VEI	7	14	± 2
B-lac-VEI	8	33	± 6
VEI-ANI	8	17	± 2
B-lac -ANI	8	29	± 7
VEI-CLO	9	17	± 3
B-lac - CLO	7	13	± 3

$F_{2,42} = 2,10; p = 0,134$

4.3. Efeitos do antagonismo de receptores NMDA-N2B sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais

Uma ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e sessões ($F_{2,49} = 13,0$; $p = 0,0001$) sobre o tempo de congelamento na sessão de reativação e no teste. Os fatores Tratamento ($F_{2,49} = 5,96$; $p = 0,004$) e Pré-tratamento ($F_{1,49} = 16,08$; $p = 0,00$) apresentaram efeito significativo de forma isoladas, mas não interagiram entre si ($F_{2,49} = 2,86$; $p = 0,066$). O fator Sessões apresentou efeito significativo tanto de forma isolada ($F_{1,49} = 35,42$; $p = 0,00$), quanto interagiu com os demais fatores (Sessões x Pré-tratamento $F_{1,49} = 52,47$; $p = 0,00$; Sessões x Tratamento $F_{2,49} = 19,48$; $p = 0,00$). O post-hoc de Newman-Keuls mostrou que todos os grupos apresentaram valores semelhantes de congelamento durante a sessão de reativação, o que indica que não houve influência do pré-tratamento sobre a expressão da memória durante a reativação da memória. No teste, no entanto, os grupos VEH-ANI e VEH-CLO tiveram níveis de congelamento significativamente menores do que o grupo VEH-VEH ($p = 0,0001$; $g = 2,84$; e $p = 0,0001$; $g = 3,36$, respectivamente). Ainda, ambos os grupos tiveram níveis significativamente mais baixos de congelamento em relação a eles mesmos durante a sessão de reativação ($p = 0,0001$; $g = 3,24$; e $p = 0,000$; $g = 3,21$, respectivamente). Já os grupos IFE-ANI e IFE-CLO não mostraram diferenças significativas nem quanto ao controle durante o teste ($p = 0,90$; $g = 0,17$; e $p = 0,97$; $g = 0,03$, respectivamente), nem quanto aos seus próprios valores durante a sessão de reativação ($p = 0,97$; $g = 0,18$; e $p = 0,98$; $g = 0,37$, respectivamente). Tais dados demonstram que a ativação de receptores NMDA-N2B no NR é necessária para a desestabilização de uma memória aversiva contextual, muito embora não o seja para sua expressão durante a reativação. Em relação ao teste B, podemos ver na tabela 3 que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que demonstra, mais uma vez, que interferência no NR antes ou após a sessão de reativação não influenciam a especificidade da memória.

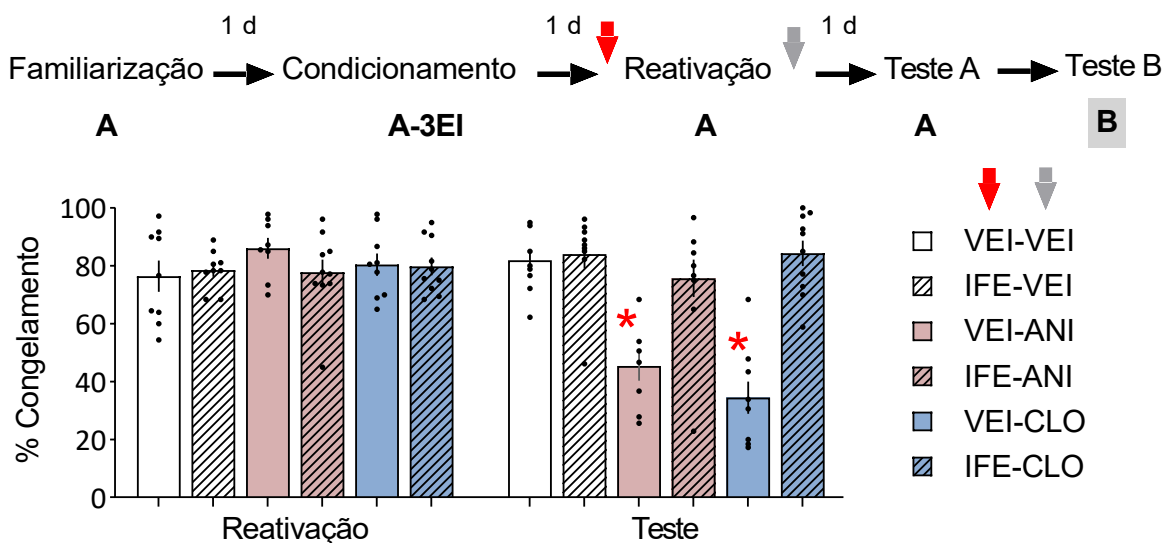


Figura 6. O antagonismo dos receptores NMDA que contém a subunidade N2B no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não prejudica a expressão da memória aversiva, mas impede a sua desestabilização. Veículo (VEI) ou ifenprodil (IFE) foram infundidos no NR 10 minutos antes da sessão de reativação. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados logo após a sessão de reativação. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. Asteriscos representam as diferenças significativas descritas abaixo. N = 8-10 / grupo.

Tabela 3. O antagonismo dos receptores NMDA que contém a subunidade N2B no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes de uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). ANOVA de duas vias.

Teste B			
Grupo	n	Média	EPM
VEI-VEI	9	20	± 5
IFE-VEI	9	11	± 4
VEI-ANI	8	9	± 2
IFE-ANI	10	7	± 2
VEI-CLO	9	12	± 3
IFE-CLO	10	14	± 4

$F_{2,49} = 1,19; p = 0,31$

4.4. Efeitos dos tratamentos utilizados sobre a expressão e a desestabilização de memórias aversivas contextuais em um protocolo de não-reativação

Um ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo das sessões ($F_{1,64} = 2153$; $p = 0,0001$), mas não do pré-tratamento ($F_{3,64} = 1,4$; $p = 0,27$) nem do tratamento ($F_{2,64} = 2,3$; $p = 0,10$), quando comparados os tempos de congelamento dos grupos nas sessões de reativação e teste. Não houve interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e as sessões ($F_{3,64} = 0,69$; $p = 0,65$). Todos os grupos apresentaram níveis significativamente mais altos de congelamento no teste quando comparados a eles mesmos na sessão de não-reativação ($p \leq 0,0001$; $g \geq 4,32$). Não há diferenças entre os grupos na sessão de não-reativação ($p \geq 0,85$; $g \leq 0,61$), nem no teste ($p \geq 0,55$; $g \leq 0,32$). Os dados apontam para a conclusão de que o pré-tratamento e o tratamento não foram capazes de produzir mudanças significativas no comportamento de congelamento dos animais quando uma sessão de não-reativação foi utilizada, indicando que a sessão de não-reativação foi diferente o suficiente para que não provocasse o processo de desestabilização-restabilização da memória aversiva contextual. Também, mostra tanto o pré-tratamento quanto o tratamento não são capazes de agir sobre a memória sem a reativação dela. Em relação ao teste B, podemos ver na tabela 4 que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

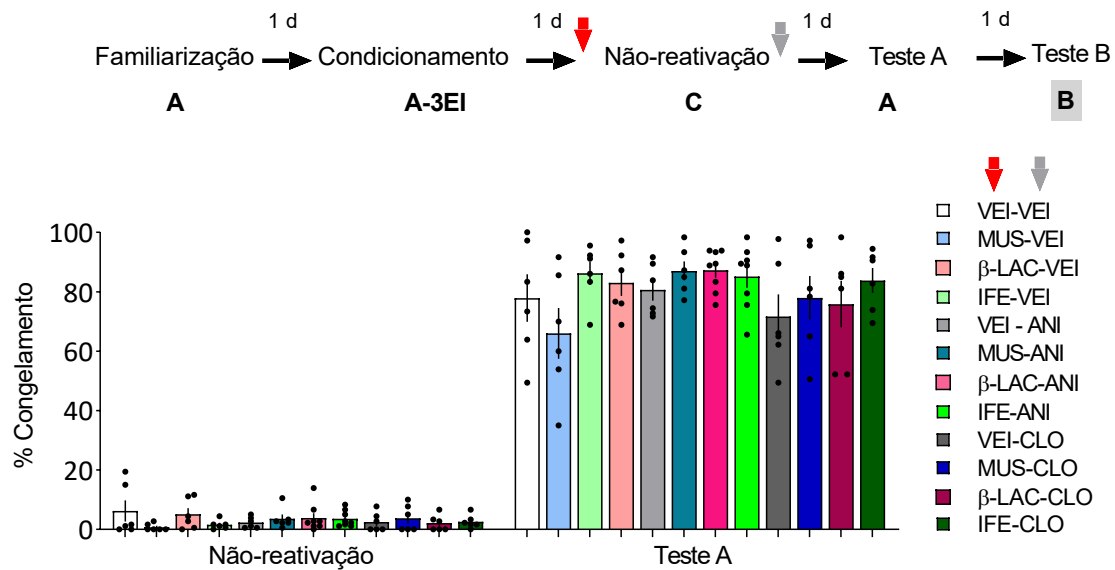


Figura 7. Os pré-tratamentos e tratamentos utilizados nos experimentos anteriores não são capazes de influenciar a desestabilização e a reconsolidação de memórias aversivas quando a sessão de reativação é omitida. Veículo (VEI), muscimol (MUS), beta-lactona (β -LAC), ou ifenprodil (IFE) foram infundidos no NR 10 minutos antes da sessão de não-reativação no contexto C. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados logo após a sessão. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. $N = 6-8$ / grupo.

Tabela 4. Os pré-tratamentos e tratamentos utilizados nos experimentos anteriores no núcleo reuniens (NR) do tálamo antes ou após uma sessão de reativação não influenciam a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). Anova de duas vias.

Teste B			
Grupo	n	Média	EPM
VEI-VEI	6	3	± 1
MUS-VEI	6	9	± 4
β -LAC - VEI	6	5	± 2
IFE-VEI	6	8	± 2
VEI-ANI	6	2	$\pm 0,5$
MUS-ANI	6	1	$\pm 0,2$
β -LAC - ANI	8	3	$\pm 0,8$
IFE-ANI	8	3	$\pm 0,7$
VEI-CLO	6	7	± 2

$F_{6,64} = 2,17; p = 0,057$

MUS-CLO	6	23	±8
β-LAC - CLO	6	3	±1
IFE-CLO	6	4	±12

4.5. Efeitos da inativação temporária do NR sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais

A ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e as sessões ($F_{2,46} = 10,1$; $p = 0,0002$). De forma isolada, o Pré-tratamento não apresentou efeito significativo ($F_{2,46} = 0,84$; $p = 0,361$), mas o Tratamento sim ($F_{2,46} = 6,39$; $p = 0,003$), e quando combinados houve interação significativa ($F_{2,46} = 6,73$; $p = 0,002$). O fator Sessões apresentou efeito de forma isolada ($F_{1,46} = 146,48$; $p = 0,000$), não apresentou interação com o Pré-tratamento ($F_{1,46} = 2,16$; $p = 0,147$), mas apresentou interação com o Tratamento ($F_{2,46} = 3,45$; $p = 0,04$). Como nos experimentos anteriores, não há diferenças entre os grupos durante a sessão de reativação. No teste, o post-hoc de Newman-Keuls mostrou que os grupos VEH-ANI e VEH-CLO apresentaram níveis de congelamento significativamente mais baixos do que o grupo VEH-VEH ($p = 0,03$; $g = 3,40$; e $p = 0,0004$; $g = 5,86$, respectivamente). Houve um efeito significativo da inativação do NR logo após a reconsolidação, já que o grupo VEH-MUS também apresentou níveis de congelamento significativamente reduzidos no teste em relação ao grupo VEH-VEH ($p = 0,01$; $g = 2,24$). De forma similar, os grupos MUS-ANI e MUS-CLO também apresentaram níveis mais baixos de congelamento do que o grupo VEH-VEH ($p = 0,05$; $g = 1,88$; e $p = 0,02$; $g = 2,13$, respectivamente). No entanto, não há diferenças significativas entre os grupos MUS-ANI e MUS-CLO em relação aos grupos MUS-VEH, VEH-ANI e VEH-CLO. Tais dados demonstram que a atividade do NR após a reativação da memória é essencial para a sua reconsolidação, assim como a síntese protéica e a atividade noradrenérgica. No entanto, não há um efeito sinérgico entre a inativação do núcleo e o efeito amnésico da anisomicina ou da clonidina.

Em relação ao teste B, podemos ver na tabela 5 que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar de a ANOVA indicar uma interação entre pré-tratamento e tratamento.

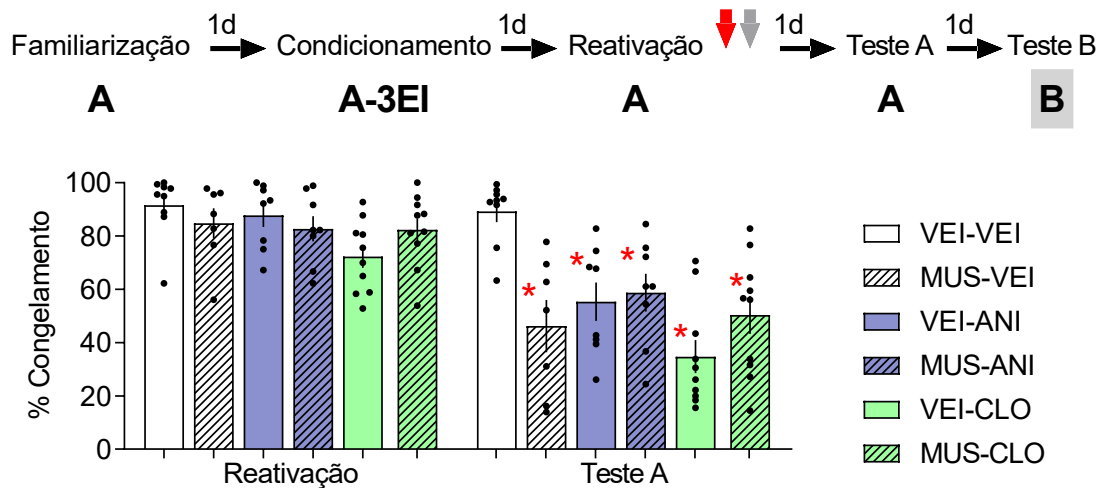


Figura 8.A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação prejudica sua reconsolidação. Veículo (VEI) ou muscimol (MUS) foram infundidos no NR logo após a sessão de reativação. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados 10 minutos após o primeiro tratamento. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. Asteriscos representam as diferenças significativas descritas abaixo. N= 7-10 / grupo.

Tabela 5. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). ANOVA de duas vias seguida por post-hoc de Newman-Keuls.

Teste B

Grupo	n	Média	EPM	
VEI-VEI	9	27	± 6	$F_{2,46} = 3,48; p = 0,039;$ sem diferenças no post-hoc
MUS-VEI	7	11	± 3	
VEI-ANI	8	14	± 6	
MUS-ANI	8	6	± 2	
VEI-CLO	10	11	± 2	
MUS-CLO	10	18	± 6	

4.6. Efeitos do antagonismo de receptores NMDA-N2A sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais

A ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e as sessões ($F_{2,38} = 6,99$; $p = 0,002$). O pré-tratamento não apresentou efeito significativo isoladamente ($F_{1,38} = 0,14$; $p = 0,70$), mas o tratamento sim ($F_{2,38} = 3,28$; $p = 0,04$). A interação entre os dois fatores, no entanto, não foi significativa ($F_{2,38} = 0,52$; $p = 0,59$). O fator sessões foi significativo de forma isolada ($F_{1,38} = 83,32$; $p = 0,000$), e interagiu com o pré-tratamento ($F_{1,38} = 4,05$; $p = 0,05$) e com o tratamento ($F_{2,38} = 7,22$; $p = 0,002$). Como nos experimentos anteriores, não há diferenças entre os grupos durante a sessão de reativação. No teste, o post-hoc de Newman-Keuls mostrou que os grupos VEH-ANI e VEH-CLO apresentaram níveis de congelamento significativamente mais baixos do que o grupo VEH-VEH ($p = 0,03$; $g = 3,40$; e $p = 0,0004$; $g = 5,86$, respectivamente). Houve um efeito significativo da inativação do NR logo após a reconsolidação, já que o grupo VEH-MUS também apresentou níveis de congelamento significativamente reduzidos no teste em relação ao grupo VEH-VEH ($p = 0,01$; $g = 2,24$). De forma similar, os grupos MUS-ANI e MUS-CLO também apresentaram níveis mais baixos de congelamento do que o grupo VEH-VEH ($p = 0,05$; $g = 1,88$; e $p = 0,02$; $g = 2,13$, respectivamente). No entanto, não há diferenças significativas entre os grupos MUS-ANI e MUS-CLO em relação aos grupos MUS-VEH, VEH-ANI e VEH-CLO.

Em relação ao teste B, podemos ver na tabela 6 que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

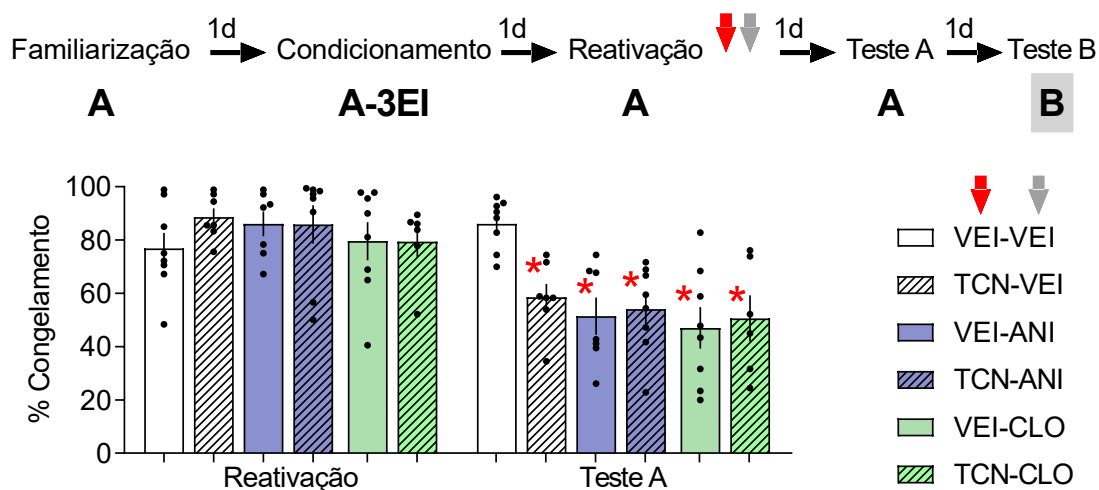


Figura 9. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade N2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação prejudica sua reconsolidação. Veículo (VEI) ou TCN-201 (TCN) foram infundidos no NR logo após a sessão de reativação. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados 10 minutos após o primeiro tratamento. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. N = 6-8 / grupo.

Tabela 6. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade N2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). Anova de duas vias.

Teste B			
Grupo	n	Média	EPM
VEI-VEI	8	5	± 2
TCN-VEI	7	24	± 5
VEI-ANI	7	14	± 5
TCN-ANI	8	22	± 9
VEI-CLO	8	15	± 7
TCN-CLO	6	23	± 5

$F_{2,38} = 0,70; p = 0,50$

4.7. Efeitos do muscimol, da clonidina, e da anisomicina sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais em um protocolo de não-reativação

Uma ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e as sessões ($F_{2,29} = 7,20$; $p = 0,003$). Os fatores pré-tratamento ($F_{1,29} = 0,27$; $p = 0,60$) e tratamento ($F_{2,29} = 0,12$; $p = 0,88$) não foram significativos isoladamente, mas interagem entre si ($F_{2,29} = 3,46$; $p = 0,03$). O fator Sessões foi significativo de forma isolada ($F_{1,29} = 2137,6$; $p = 0,000$), mas não interagiu com o pré-tratamento ($F_{1,29} = 0,79$; $p = 0,38$) nem com o tratamento ($F_{2,29} = 0,45$; $p = 0,64$). Todos os grupos apresentaram níveis significativamente mais altos de congelamento no teste quando comparados a eles mesmos na sessão de não-reativação ($p \leq 0,0001$; $g \geq 16,36$). Não há diferenças entre os grupos na sessão de não-reativação, nem no teste A. Os dados apontam para a conclusão de que o pré-tratamento e o tratamento não foram capazes de produzir mudanças significativas no comportamento de congelamento dos animais quando uma sessão de não-reativação foi utilizada, indicando que o contexto da sessão de não-reativação foi diferente do contexto A o suficiente para que não provocasse o processo de desestabilização-restabilização da memória aversiva contextual. Também, mostra tanto o pré-tratamento quanto o tratamento não são capazes de agir sobre a memória sem a reativação da mesma.

Em relação ao teste B, podemos ver na tabela 7 que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

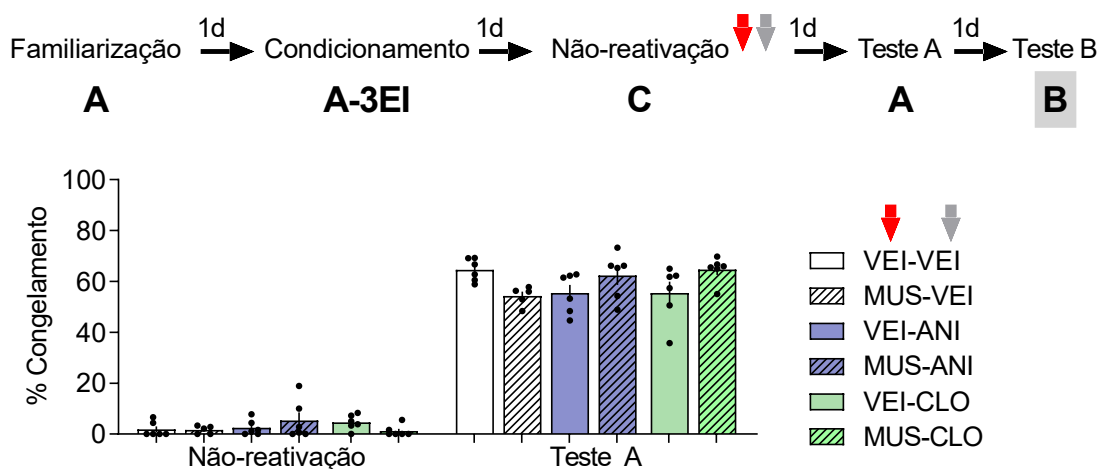


Figura 10. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo não é capaz de influenciar a reconsolidação de memórias aversivas quando a sessão de reativação é omitida. Veículo (VEI) ou muscimol (MUS) foram infundidos no NR logo após a sessão de não-reativação no contexto C. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados 10 minutos após o primeiro tratamento. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. N = 5-6 / grupo.

Tabela 7. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de não-reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). Anova de duas vias.

Teste B				
Grupo	n	Média	EPM	
VEI-VEI	6	27	± 6	$F_{2,29} = 0,013; p = 0,98$
MUS-VEI	5	11	± 3	
VEI-ANI	6	14	± 6	
MUS-ANI	6	6	± 2	
VEI-CLO	6	11	± 2	
MUS-CLO	6	18	± 6	

4.8. Efeitos do TCN-201, da clonidina, e da anisomicina sobre a reconsolidação de memórias aversivas contextuais em um protocolo de não-reativação

Uma ANOVA de medidas repetidas mostrou uma interação significativa entre pré-tratamento, tratamento e as sessões ($F_{2,31} = 6,3; p = 0,005$) sobre o congelamento dos grupos nas sessões de não-reativação e teste A. O fator pré-tratamento não foi significativo isoladamente ($F_{2,49} = 1,74; p = 0,18$), assim como o tratamento ($F_{2,49} = 0,22; p = 0,97$). No entanto, a interação entre pré-tratamento e tratamento foi significativa ($F_{4,49} = 4,18; p = 0,005$). Isoladamente, o fator sessões foi significativo ($F_{1,49} = 4649,7; p = 0,000$), mas não interagiu com o pré-tratamento ($F_{2,49} = 0,59; p = 0,55$) nem com o tratamento ($F_{2,49} = 1,10; p = 0,34$). Todos os grupos apresentaram níveis significativamente mais altos de congelamento no teste A quando comparados a eles mesmos na sessão de não-reativação ($p \leq 0,0001; g \geq 14,83$). Não há diferenças entre os grupos em nenhuma das duas sessões. Os dados apontam para a conclusão de que o pré-tratamento e o tratamento não foram capazes de produzir mudanças significativas no

comportamento de congelamento dos animais quando uma sessão de não-reativação foi utilizada, indicando que a o contexto da sessão de não-reativação foi diferente do contexto A o suficiente para que não provocasse o processo de desestabilização-restabilização da memória aversiva contextual. Também, mostra tanto o pré-tratamento quanto o tratamento não são capazes de agir sobre a memória sem a reativação da mesma.

Em relação ao teste B, podemos ver na tabela 8 que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

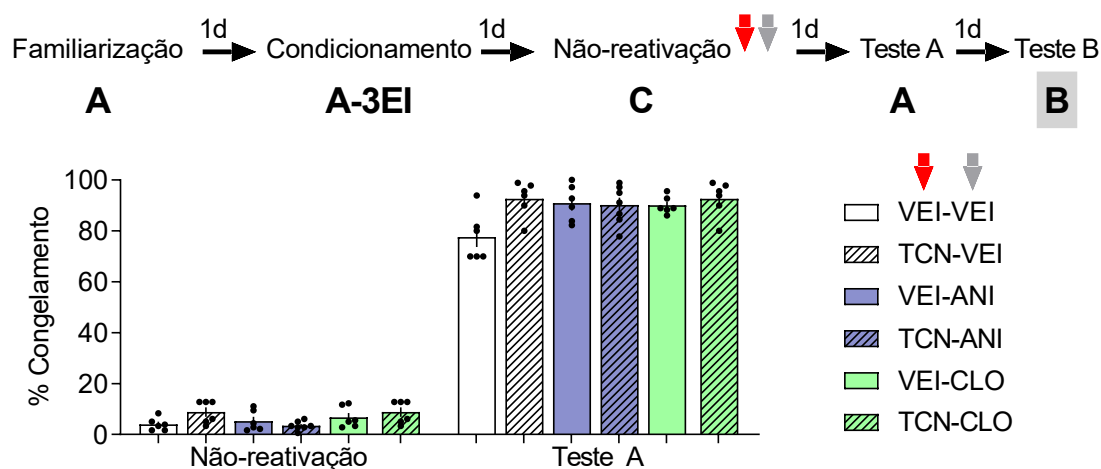


Figura 11. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade N2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo não é capaz de influenciar a reconsolidação de memórias aversivas quando a sessão de reativação é omitida. Veículo (VEI) ou muscimol (MUS) foram infundidos no NR logo após a sessão de não-reativação no contexto C. Veículo (VEI), anisomicina (ANI), ou clonidina (CLO) foram aplicados 10 minutos após o primeiro tratamento. As setas indicam os momentos de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado nas sessões de Reativação e Teste A. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls. N = 6-7 / grupo.

Tabela 8. O antagonismo de receptores NMDA que contém a subunidade N2A no núcleo reuniens (NR) do tálamo após uma sessão de não-reativação não influencia a generalização da resposta de medo frente a um contexto não-pareado (Teste B). Anova de duas vias seguida pelo post-hoc de Newman-Keuls.

Teste B			
Grupo	n	Média	EPM
VEI-VEI	6	4	± 2
TCN-VEI	6	8	± 2
VEI-ANI	6	10	± 3
TCN-ANI	7	3	± 1

$F_{2,33} = 4,07; p = 0,026; \text{sem diferenças no post-hoc}$

VEI-CLO	6	5	± 2	
TCN-CLO	6	6	± 2	

4.9. Efeitos da inativação temporária do NR sobre o número de células *Egr1/Zif268* positivas no NR e em outras áreas recrutadas durante o processo de desestabilização-reconsolidação

Houve um efeito significativo da condição experimental (reativação x não-reativação - $F_{2,12} = 241,9$; $p = 0,000001$) sobre o número de células *Egr1/Zif268* positivas no núcleo reuniens. Os grupos veículo e muscimol reativados apresentaram uma quantidade significativamente maior de células positivas do que o grupo não-reativado ($p = 0,0001$; $g = 13,2$, e $p = 0,0002$; $g = 6,97$, respectivamente), muito embora o grupo muscimol tenha apresentado números significativamente mais baixos do que o grupo veículo ($p = 0,0001$; $g = 7,41$). Esses dados indicam que a atividade do NR é essencial para a desestabilização da memória aversiva contextual. Além disso, oferecem suporte para a eficácia do muscimol como agente inativador do NR.

Na região CA1 do hipocampo dorsal, vemos um efeito significativo da condição experimental (reativação x não-reativação - $F_{2,12} = 29,3$; $p = 0,00002$) sobre o número de células positivas. Embora ambos os grupos, veículo e muscimol, tenham apresentado valores significativamente maiores em relação ao grupo não-reativado ($p = 0,0002$; $g = 6,19$, e $p = 0,0008$; $g = 2,37$, respectivamente), o grupo muscimol apresentou valores mais baixos do que o grupo veículo ($p = 0,01$; $g = 2,00$).

Já na região CA1 do hipocampo ventral, também vemos um efeito significativo da condição experimental sobre o número de células positivas (reativação x não-reativação - $F_{2,12} = 7,36$; $p = 0,008$). Diferente da região dorsal, na CA1 ventral o grupo muscimol apresentou uma quantidade maior de células *Egr1/Zif268* positivas em relação ao grupo veículo ($p = 0,007$; $g = 2,17$), enquanto que os grupos veículo e não-reativado não apresentaram diferenças entre si. Tais dados indicam que a inativação do núcleo reuniens durante a desestabilização de uma memória aversiva contextual impacta a plasticidade de formas diferentes através do eixo dorso-ventral do hipocampo.

No córtex pré-límbico também há efeitos significativos da condição experimental (reativação x não-reativação - $F_{2,12} = 107,0$; $p = 0,000001$). Nesta região, o grupo veículo apresentou valores maiores do que os grupos não-reativado ($p = 0,0002$; $g = 7,49$) e

muscimol ($p = 0,0001$; $g = 8,98$), e os grupos muscimol e não-reativado não diferiram entre si. Já no córtex infralímbico, além do efeito significativo da condição experimental ($F_{2,12} = 178,4$ $p = 0,000001$), vemos que o grupo veículo também apresentou valores significativamente maiores em relação aos grupos não-reativado ($p = 0,000$; $g = 8,00$) e muscimol ($p = 0,0001$; $g = 9,17$), que não diferiram entre si. Tais dados informam que o núcleo reuniens impacta significativamente a plasticidade relacionada à desestabilização de memórias no córtex pré-frontal medial.

Por fim, na amígdala basolateral vemos um efeito significativo da condição experimental ($F_{2,12} = 43,2$; $p = 0,000001$). Os grupos veículo e muscimol apresentaram números maiores de células Egr1/Zif268 positivas em relação ao veículo ($p = 0,03$; $g = 1,64$ e $p = 0,0002$; $g = 5,61$, respectivamente), muito embora o grupo muscimol foi ainda significativamente maior em comparação ao grupo veículo ($p = 0,0002$; $g = 3,93$). Tais dados indicam que o NR influencia também a atividade plástica durante a desestabilização na amígdala basolateral.

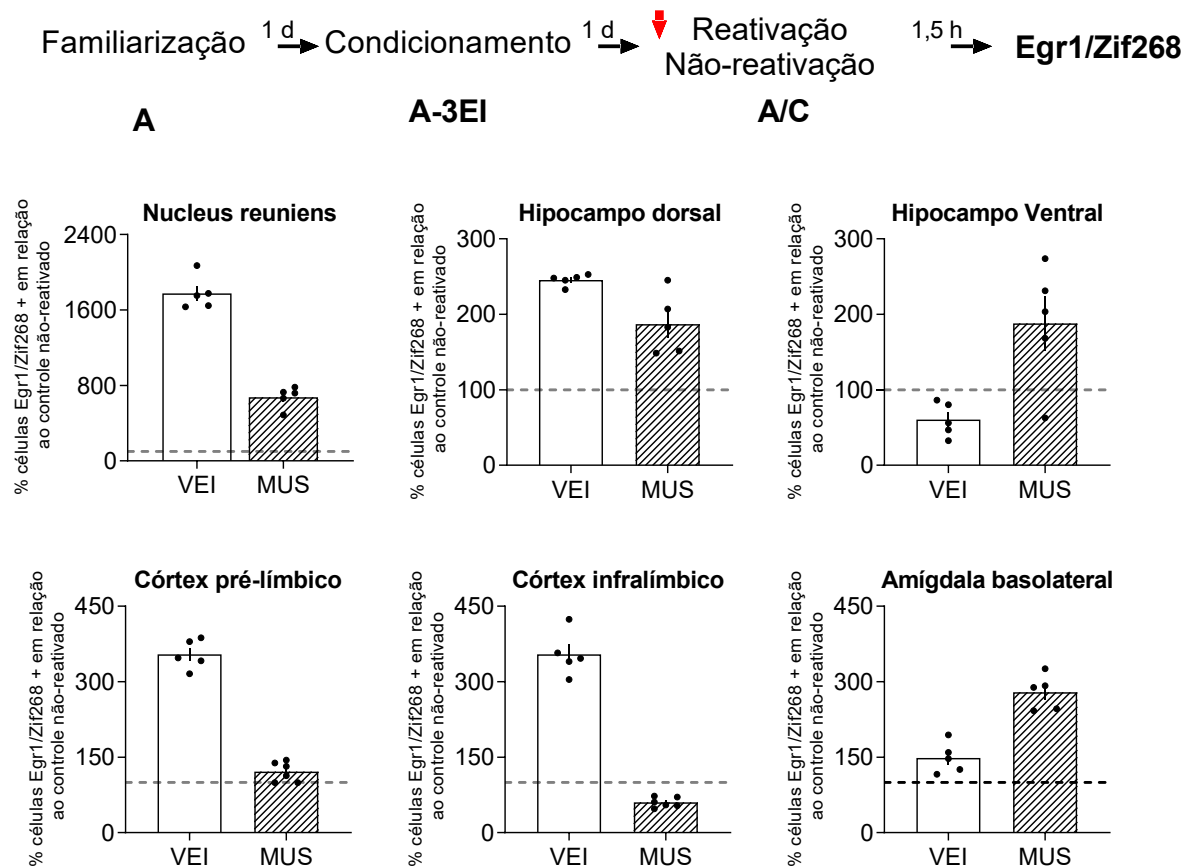


Figura 12. A inativação do núcleo reuniens (NR) do tálamo 10 minutos antes da sessão de reativação influencia o número de células Egr1/Zif268 positivas no NR, hipocampo dorsal, hipocampo ventral, córtices pré-limbico e infralímbico, e amígdala basolateral. Veículo (VEI) ou muscimol (MUS) foram infundidos no NR 10 minutos antes da sessão de reativação ou da sessão de não-reativação. A seta indica o momento de injeção. Os valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de células Egr1/Zif268 positivas em relação ao controle não-reativado (VEI n=6; MUS n=6). ANOVA de uma vias. N = 6 / grupo.

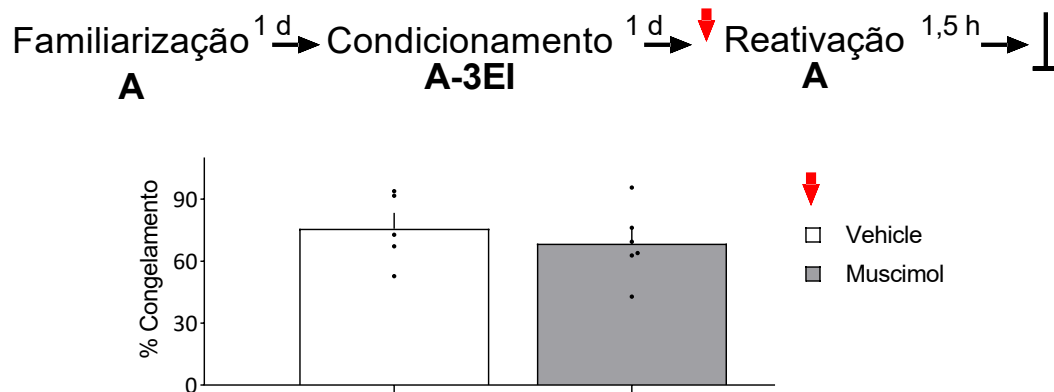


Figura 13. A infusão de Veículo ou Muscimol 10 minutos antes da sessão de reativação não influenciou a porcentagem de congelamento dos grupos reativados durante a sessão.

5. DISCUSSÃO

O processo de desestabilização-reconsolidação de memórias aversivas contextuais recruta o hipocampo (Lux et al., 2017; Lee et al., 2019; Couto-Pereira et al., 2019), o córtex pré-frontal (Mamiya et al., 2009; Stern et al., 2013; Fukushima et al., 2021) e a amígdala (Fukushima et al., 2014; Atsak et al., 2015; Silva et al., 2019; Fukushima et al., 2021; Espejo et al., 2021). Já que o núcleo reuniens do tálamo contribui para a interação funcional entre o HPC e o CPF durante o processamento cognitivo, o que inclui o processamento mnemônico (Jin and Maren, 2015; Vetere et al., 2017; Dolleman Van der Well et al., 2019; Hauer et al., 2019; Silva et al., 2019; Kida, 2020; Ferraris et al., 2021), é surpreendente que não existiam estudos publicados investigando o papel direto do NR no processo desestabilização-reconsolidação de memórias aversivas contextuais. Este trabalho investigou tal papel utilizando ferramentas farmacológicas bem estabelecidas na literatura, como o muscimol, o ifenprodil, a anisomicina e a clonidina, mas também ferramentas mais recentes que não foram tão utilizadas, como a beta-lactona e o TCN-201. Além disso, investigamos a plasticidade em diversas regiões do encéfalo durante a desestabilização dessas memórias aversivas, com o intuito de identificar o envolvimento dessas áreas e quanto a participação do NR neste processo influencia a plasticidade.

O muscimol, antagonista GABA_A, induz uma hiperpolarização rápida na região em que é infundido, podendo durar até 120 minutos, dependendo da concentração utilizada. Dessa forma, é utilizada comumente como uma ferramenta clássica no estudo da neurobiologia das memórias. É importante salientar que a inativação temporária da região de estudo, como a causada pelo muscimol, permite o retorno desta região a sua plena atividade para testes comportamentais subsequentes, o que é uma importante distinção a ser feita quando os dados são comparados com estudos que utilizam técnicas que induzem lesões permanentes (Martin e Ghez, 1999; Majchrzak e Di Scala, 2000). A anisomicina e a clonidina foram utilizadas como controles positivos nos experimentos realizados, pois possuem efeito amnésico amplamente reconhecido. Além disso, nos experimentos que investigaram a desestabilização de memórias aversivas contextuais, devemos salientar o fato de que este processo não necessariamente produz efeitos sobre o comportamento que sejam facilmente detectáveis. Assim, utilizamos drogas que agem sobre a reconsolidação, uma vez que temos como princípio que este processo deve, obrigatoriamente, ser precedido pela desestabilização mnemônica. A anisomicina é uma droga muito utilizada no estudo de substratos neurais durante o processamento

mnemônico, em especial nos processos de consolidação e reconsolidação (Nader et al., 2000; Sara, 2000). Essa droga é capaz de reduzir a síntese protéica em sinapses neuronais em até 50%, além de causar uma redução significativa na frequência de disparo das células atingidas ao levar à uma significativa despolarização das membranas plasmáticas e redução do metabolismo energético e função mitocondrial (Scavuzzo et al., 2019). Já a clonidina, agonista de receptores adrenérgicos, em especial os receptores alfa-2, é capaz de reduzir o tônus noradrenérgico no sistema nervoso central como um todo, levando à efeitos amnésicos (Houston, 1982; Lorez et al., 1983; Galeotti et al., 2004; Gazarini et al., 2013; Nguyen et al., 2017).

A inativação do NR com o muscimol antes da sessão de reativação no contexto pareado não teve qualquer influência sobre a expressão do comportamento de medo, o que está em consonância com resultados descritos anteriormente (Ramanathan et al., 2018; Lin et al., 2020; Quet et al., 2020), embora talvez isso não seja verdade para outros tipos de memória, como a de trabalho (Rahman et al., 2021). Ainda, este resultado converge com a ideia de que a expressão e a desestabilização de uma memória são processos dissociados (Suzuki et al., 2004; Bustos et al., 2009; Wang et al., 2009; Sevenster et al., 2012). Também não houve diferença significativa entre os grupos durante a exposição a um contexto não-pareado (teste B), o que indica que a inativação não afetou a especificidade da memória aversiva, de forma comparável com um estudo prévio (Ramanathan et al., 2018). Por fim, a inativação do NR claramente impediu a desestabilização da memória aversiva contextual, prevenindo a ação amnésica tanto da anisomicina infundida diretamente no NR, quanto da clonidina injetada de forma sistêmica logo após a sessão de reativação. É importante notar que os grupos veículo-anisomicina e veículo-clonidina apresentaram valores significativamente mais baixos durante o teste A do que durante a sessão de reativação. Já os animais que tiveram o NR inativado antes da sessão de reativação, e receberam anisomicina ou clonidina logo após, não apresentaram mudanças significativas entre a reativação e o teste A. Dessa forma, é possível afirmar que a atividade do NR é essencial para a ocorrência da desestabilização da memória, inclusive de forma sistêmica uma vez que bloqueou o efeito sistêmico da clonidina. Ainda, utilizando os dados do grupo veículo-anisomicina, esta é a primeira demonstração descrita de que a síntese protéica no NR é necessária para a reconsolidação da memória aversiva contextual. De certa forma, a anisomicina pode ter um efeito biológico semelhante ao efeito provocado pelo agonismo de receptores GABA pelo

muscimol. Isso porque a anisomicina parece provocar uma redução significativa na capacidade energética das células, inativando-as (Scavuzzo et al., 2019). Em suma, essas informações indicam que o NR não é apenas uma zona de convergência ou passagem de informações entre o HPC e o CPF, mas também uma região que sofre plasticidade em resposta ao processamento mnemônico, subsidiando fisicamente memórias aversivas contextuais.

Já é sabido que o processo de desestabilização de memórias aversivas requer degradação protéica nas sinapses que as subsidiam (Lee et al., 2008; Jarome et al., 2011, 2016; Shehata et al., 2018). A beta-lactona é um inibidor da degradação protéica, agindo através do bloqueio do sistema ubiquitina-proteassoma (Jarome e Helmstetter, 2013; Jarome e Helmstetter, 2014; Lip et al., 2017). Utilizamos essa droga, infundida 10 minutos antes da sessão de reativação, para estabelecer se a degradação proteica no NR também é necessária para a desestabilização de uma memória aversiva contextual. Os animais que receberam a beta-lactona e, posteriormente, clonidina ou anisomicina, não apresentaram queda nos níveis de congelamento no teste A, em relação aos níveis dos mesmos grupos na sessão de reativação. Assim, a degradação protéica no NR é necessária para a desestabilização de uma memória aversiva contextual. No teste B, podemos observar que o pré-tratamento e os tratamentos utilizados não influenciaram a especificidade e a generalização da memória em questão.

A ativação de receptores NMDA que contêm a subunidade N2B é tida como essencial para a ocorrência de desestabilização sináptica em diversas regiões que se conectam com o núcleo reuniens (Ben Mamou et al., 2006; Wang et al., 2009; Milton et al., 2013; Crestani et al., 2015; Haubrich et al., 2015; Monti et al., 2016; Shehata et al., 2018). Sabendo disso, para investigar se a ativação desses receptores no NR seria necessária para a desestabilização da memória aversiva contextual, utilizamos o antagonista ifenprodil infundido diretamente no NR 10 minutos antes da sessão de reativação. Os dados obtidos indicam que a atividade dos receptores NMDA-N2B no NR é essencial para a desestabilização de memórias aversivas contextuais, visto que os animais que receberam ifenprodil antes da sessão e anisomicina ou clonidina logo após não sofreram a mesma queda na porcentagem de congelamento durante o teste A que os grupos veículo-anisomicina e veículo-clonidina. Assim como o muscimol e a beta-lactona, o ifenprodil não causou nenhum efeito significativo sobre a expressão durante a reativação, ou sobre a especificidade e generalização destas memórias no contexto B.

A inatividade do NR através da infusão de muscimol logo após a sessão de reativação influenciou a capacidade de reconsolidação da memória aversiva contextual, provocando uma queda na porcentagem de congelamento dos animais durante o teste A. Além disso, não preveniu o efeito da anisomicina ou da clonidina sobre a reconsolidação, tampouco teve efeito aditivo ao uso destas drogas. Esses dados indicam que a atividade do NR é necessária para a reconsolidação, muito possivelmente porque sua participação é essencial para que seja mantida a conectividade funcional entre HPC e CPF durante esse processo (Sierra et al., 2017; Hauer et al., 2019; Scheel et al., 2020). De fato, em 2017, Sierra e colaboradores demonstraram que a integridade do núcleo reuniens era essencial para que ocorresse a recuperação de uma memória através do processo de reconsolidação, e além disso também demonstraram a necessidade da atividade do NR para a sua persistência (Sierra et al., 2017). A infusão de anisomicina diretamente no NR após a sessão de reativação também foi capaz de impedir a reconsolidação, mostrando que a síntese protéica *de novo* no NR é necessária, em consonância com os experimentos realizados anteriormente envolvendo a desestabilização. Ainda, o uso da clonidina após a sessão de reativação também provocou efeitos negativos sobre a reconsolidação, diminuindo o congelamento deste grupo no teste A. Estudos prévios indicam que existem conexões entre o locus coeruleus e o núcleo reuniens, o que explicaria, em partes, o efeito da clonidina sobre a desestabilização e a reconsolidação suportadas por essa região (Krout et al., 2002; McKenna e Vertes, 2004). Especulamos que a falta de efeito aditivo entre muscimol e anisomicina ou clonidina se deva ao fato de que o muscimol foi infundido no NR logo após a sessão de reativação, e as demais drogas foram utilizadas entre 5 e 10 minutos após a primeira infusão. Outra possibilidade, suportada pelo fato de que os grupos que receberam muscimol e uma das duas drogas amnésicas e veículo e uma das duas drogas amnésicas não diferem entre si, é que as drogas amnésicas atingiram um efeito chão, ou seja, a capacidade máxima de diminuir o congelamento no teste A no protocolo utilizado.

Após a sessão de reativação, utilizamos também o TCN-201, um antagonista de receptores NMDA que contém a subunidade N2A, correlacionada com a restabilização de memórias após sua desestabilização (Milton et al., 2013). Pudemos averiguar que o antagonismo destes receptores bloqueou a reconsolidação da memória aversiva contextual. Ainda, assim como ocorreu com o muscimol, o TCN-201, infundido 10 minutos antes das demais, não teve efeito aditivo com alguma dessas drogas. Apesar de

saberemos que o sistema de neurotransmissão mais presente no NR é o glutamatérgico (Varela, 2014), não há dados disponíveis sobre o perfil dos receptores NMDA no NR, ou seja, quanto à sua quantidade e proporção. No entanto, é possível afirmar que os receptores NMDA presentes no NR que contêm a subunidade N2A são essenciais para a ocorrência da desestabilização de memórias aversivas contextuais.

Independente das drogas utilizadas, sendo antes ou após a sessão de não-reativação, quando a sessão de reativação foi omitida, a memória aversiva contextual permaneceu inalterada, de forma consonante com diversos estudos anteriores (Misanin et al., 1968; Nader et al., 2000; Bustos et al., 2006; Stern et al., 2012; Orlandi et al., 2020). Podemos afirmar isso porque não houve mudanças na expressão de congelamento entre os grupos durante os testes A e B, tampouco durante a sessão de não-reativação.

O envolvimento de Zif268/Egr1 na plasticidade necessária para a modificação de memórias reativadas foi demonstrada em roedores de diversas formas, sendo correlacionada à atividade de receptores NMDA, AMPA e canais de cálcio voltagem dependentes (Murphy et al., 1991; Worley et al., 1991; Wang et al., 1994). Em camundongos nocaute para Zif268, verificou-se a impossibilidade da consolidação e reativação de memórias de reconhecimentos de objetos (Bozon et al., 2003). Também foi demonstrado que a expressão do gene Zif268 no hipocampo e na amígdala é necessária para a ocorrência da reconsolidação de uma memória aversiva contextual (Besnard et al., 2013; Lee et al., 2005). No nosso caso, pudemos observar uma influência bastante significativa da infusão de muscimol no NR sobre a plasticidade tanto no próprio NR quanto em outras regiões. No NR, a sessão de reativação da memória provocou um aumento significativo da expressão de Zif268/Egr1 no grupo veículo, enquanto que o grupo muscimol apresentou uma queda bastante significativa tanto em relação ao grupo veículo quanto ao grupo não-reativado. Esse é o primeiro dado desse tipo reportado, até onde pudemos averiguar. Tal dado corrobora os dados de experimentos anteriores no sentido de que suporta a ideia de que o NR é mais do que apenas uma zona de passagem de informações, subsidiando o processamento mnemônico e a plasticidade associada. Nas regiões CA1 do hipocampo dorsal, e nos córtices pré-límbico e infralímbico, há uma redução significativa no número de células Zif268/Egr1 positivas no grupo muscimol em relação ao controle não-reativado. Já nas regiões CA1 do hipocampo ventral e na amígdala basolateral, há um aumento no número de células positivas no grupo muscimol. Tais mudanças derivam, provavelmente, do fato de que todas estas regiões possuem

conexões diretas e indiretas com o NR, além de estarem interconectadas entre si anatômica (Sesack et al., 1989; Kishi et al., 2006; Vertes et al., 2006; Hoover and Vertes, 2007; Varela et al., 2014; Rajasethupathy et al., 2015; Scheel et al., 2020) e funcionalmente (Dolleman van der Well et al., 2019; Hauer et al., 2019; Jayachandran et al., 2019; Silva et al., 2019; Angulo-Garcia et al., 2020). O aumento de células Zif268/Egr1 positivas do grupo veículo em relação ao controle não-reativado nas regiões CA1 dorsal, pré-límbica e infralímbica está em consonância com resultados prévios descritos na literatura (Hall et al., 2001; Lee et al., 2004; Barnes et al., 2012; Stern et al., 2014; Tedesco et al., 2014; Rosier et al., 2018; Couto-Pereira et al., 2019). Animais que receberam veículo antes da sessão de reativação não apresentaram um número maior de células positivas na região CA1 ventral do que os animais do grupo controle não-reativado, de forma semelhante a dados previamente reportados (Rosier et al., 2018). No entanto, o grupo muscimol apresentou um aumento significativo, de forma um pouco mais robusta e oposta àquela observada no hipocampo dorsal. A interpretação desse dado deve levar em consideração estudos anatômicos que indicam que o hipocampo ventral recebe até 10 vezes mais aferentes advindos do NR que o hipocampo dorsal (McKenna e Vertes, 2004; Hoover e Vertes, 2012; Cassel et al., 2013). Ainda, é importante levar em consideração as diferenças de conexão com outras áreas do encéfalo, como a amígdala basolateral, ao longo do eixo dorso-ventral do hipocampo (Kishi et al., 2006). É uma possibilidade que, na inatividade de uma região como o núcleo reuniens, promovendo o controle sobre o hipocampo ventral, a amígdala seja capaz de tomar este controle e promover plasticidade (Rajasethupathy et al., 2015; Jarvis et al., 2018; Jayachandran et al., 2019). Na amígdala basolateral, vimos um aumento significativo de células Zif268/Egr1 positivas no grupo veículo, em comparação ao grupo não-reativado, o que já era esperado (Hall et al., 2001; Espejo et al., 2016; Couto-Pereira et al., 2019). Vimos um aumento ainda maior do número de células positivas na amígdala basolateral em animais que receberam o muscimol no NR antes da sessão de reativação. Em animais cronicamente estressados, uma quantidade aumentada de mRNA para Zif268 na amígdala foi associada à resistência a drogas amnésicas (Hoffman et al., 2015). Ainda, evidências indicam que potencializar a desestabilização de memórias aversivas na amígdala basolateral recupera a sensibilidade às drogas amnésicas (Wang et al., 2009; Ortiz et al., 2016; Espejo et al., 2016; Shehata et al., 2018; de Solis et al., 2019). Dessa forma, este dado concorda com estes estudos anteriores, visto que a não-desestabilização da memória

devido à inatividade do núcleo reuniens pode ter sido causa ou consequência do aumento de plasticidade na amígdala basolateral.

Levando em consideração apenas as regiões investigadas neste experimento, podemos propor a possibilidade de que existem circuitos neurais paralelos que suportam, de formas diferentes, o processo de desestabilização-restabilização de memórias aversivas contextuais. A inativação do núcleo reuniens parece provocar um desequilíbrio nessas circuitarias, fazendo com que alguns componentes (CA1 ventral e amígdala, por exemplo), exerçam uma influência preponderante sobre a memória, o que contribui para a sua resistência à desestabilização. Ainda, é possível que certas regiões, como a amígdala basolateral e o hipocampo ventral, sejam responsáveis por enviar informações sobre o contexto para regiões como o hipocampo dorsal e o córtex pré-frontal para que haja a atualização da memória aversiva contextual. Se analisado dessa forma, a inativação do núcleo reuniens impede a distribuição correta dessas informações, impedindo assim a reativação plástica sistêmica do traço mnemônico, em especial no hipocampo dorsal e no córtex pré-frontal. Tais possibilidades podem ser exploradas em estudos futuros, utilizando técnicas mais robustas e que permitam uma maior precisão na detecção do papel dessas interconexões específicas.

Os experimentos propostos, executados e descritos nesta tese apresentam limitações que devem ser levadas em consideração quando da interpretação dos dados. Apesar de todo o cuidado com o controle histológico dos animais utilizados para a análise estatística dos dados, não é possível garantir com certeza que as drogas infundidas diretamente no núcleo reuniens não atingiram demais áreas subjacentes, como o núcleo rombóide, por exemplo, em pelo menos alguns animais. Também é preciso levar em consideração que as interpretações aqui discutidas levam em conta, majoritariamente, dados comportamentais que, apesar de todo controle realizado no ambiente de experimentação, são afetados por inúmeras variáveis. Muitas dessas variáveis não conseguimos controlar ou prever dentro do nosso ambiente de experimentação. Quanto ao experimento de imunistoquímica realizado, é preciso estar ciente que não foram incluídos grupos importantes para o controle experimental: grupos que não foram reativados, mas receberam veículo ou muscimol, com o objetivo de controlar o efeito da reexposição ao contexto pareado no número de células Egr1 positivas.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho demonstram, de forma inédita, que o núcleo reuniens do tálamo participa do processo de desestabilização-restabilização de memórias aversivas contextuais, inclusive influenciando de forma sistêmica e plástica esse processo. Mostramos ainda que o NR é muito mais do que uma área de passagem de informações entre outras regiões encefálicas, subsidiando a manutenção do traço mnemônico. Nossos dados abrem portas para que estudos mais aprofundados sejam realizados, e também para que se investigue a translacionalidade desses achados, visto que mecanismos de controle da desestabilização de memórias são importantes em diversas terapias que são utilizadas atualmente. O núcleo reuniens pode, futuramente, provar-se uma importante região para o estudo de intervenções mnemônicas.

7. REFERÊNCIAS

- Abraham W.C., Dragunow M., Tate W.P. (1991). **The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation.** *Mol Neurobiol.* 5(2–4):297–314.
- Abraham W.C., Mason S.E., Demmer J. (1993). **Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation.** *Neuroscience.* 56(3):717–727.
- Agranoff, B. W., Davis, R. E., Brink, J. J. (1966). **Chemical studies on memory fixation in goldfish.**
- Alfei, J. M., Ferrer Monti, R. I., Molina, V. A., De Bundel, D., Luyten, L., Beckers, T. (2020). **Generalization and recovery of post-retrieval amnesia.** *Journal of Experimental Psychology: General.*
- Almeida-Corrêa, S., Amaral, O. B. (2014). **Memory labilization in reconsolidation and extinction—evidence for a common plasticity system?** *Journal of Physiology-Paris*,108(4-6), 292-306.
- Amorim, F. E., Chapot, R. L., Moulin, T. C., Lee, J. L., Amaral, O. B. (2021). **Memory destabilization during reconsolidation – A consequence of homeostatic plasticity?** bioRxiv.
- Angulo-Garcia, D., Ferraris, M., Ghestem, A., Nallet-Khosroffian, L., Bernard, C., Quilichini, P. P. (2020). **Cell assemblies in the cortico-hippocampal-reuniens network during slow oscillations.** *Journal of Neuroscience*, 40(43), 8343-8354.
- Atsak, P., Hauer, D., Campolongo, P., Schelling, G., Fornari, R. V., Roozendaal, B. (2015). **Endocannabinoid signaling within the basolateral amygdala integrates multiple stress hormone effects on memory consolidation.** *Neuropsychopharmacology*, 40(6), 1485-1494.
- Baez, M. V., Cercato, M. C., Jerusalinsky, D. A. (2018). **NMDA receptor subunits change after synaptic plasticity induction and learning and memory acquisition.** *Neural plasticity*, 2018.
- Baratti, C. M., Boccia, M. M., Blake, M. G., Acosta, G. B. (2008). **Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor.** *Neurobiology of learning and memory*,89(4), 426-440.
- Barnes, P., Kirtley, A., Thomas, K. L. (2012). **Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory.** *Hippocampus*, 22(2), 149-171.

Barria A., Malinow R (2005). **NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII.** *Neuron* 48:289–301.

Bartlett TE, Bannister NJ, Collett VJ, Dargan SL, Massey PV, Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Bashir ZI, Collingridge GL, Lodge D. (2007). **Differential roles of N2A and N2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus.** *Neuropharmacology* 52:60–70.

Beckers, T., Kindt, M. (2017). **Memory reconsolidation interference as an emerging treatment for emotional disorders: strengths, limitations, challenges, and opportunities.** *Annual review of clinical psychology*, 13

Bertram EH, Mangan PS, Zhang D, Scott CA, Williamson JM. (2001). **The midline thalamus: alterations and a potential role in limbic epilepsy.** *Epilepsia* 42:967-978.

Bertram, E.H., Zhang, D.X. (1999). **Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation.** *Neuroscience* 92, 15–26.

Besnard A, Caboche J, Laroche S. (2013). **Recall and reconsolidation of contextual fear memory: differential control by ERK and Zif268 expression dosage.** *PLoS One*. 8:e72006.

Bingol, B., Schuman, E. M. (2006). **Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines.** *Nature*, 441, 1144–1148.

Blanchard R.J, Blanchard D.C. (1969). **Crouching as an index of fear.** *J Comp Physiol Psychol*. 67, 370–375.

Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (1972). **Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions.** *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81, 281–290.

Bliss, T. V., Lømo, T. (1973). **Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.** *The Journal of physiology*, 232(2), 331-356.

Bobal, M. G., Savage, L. M. (2015). **The role of ventral midline thalamus in cholinergic-based recovery in the amnesic rat.** *Neuroscience*, 285, 260-268.

Bokor, H., Csaki, A., Kocsis, K., Kiss, J. (2002). **Cellular architecture of the reuniens nucleus thalami and its putative aspartergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat.** *Eur. J. Neurosci.* 16, 1227–1239.

Bouton M.E. (1993). **Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning.** *Psychol Bull.* 114: 80–99.

Bozon, B., Davis, S., & Laroche, S. (2003). **A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval.** *Neuron*, 40(4), 695-701.

Braak H, Braak E. (1991). **Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus.** *Acta Neuropath* 81:261-268. Doi: 10.1007/bf00305867.

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.

Butler, A. B. (2005). **Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution.** *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 151-159.

Cahill, E., Wood, M. A., Everitt, B., & Milton, A. (2019). **The role of prediction error and memory destabilization in extinction of cued-fear within the reconsolidation window.** *Neuropsychopharmacology*, 44(10), 1762-1768.

Careaga M.B.L., Girardi C.E.N, Suchecki D. (2016). **Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 71: 48-57

Carr, D.B., Sesack, S.R. (1996). **Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals.** *J. Comp. Neurol.* 369, 1–15.

Cassel, J. C., Cassel, D., & Manning, L. (2013). **From Augustine of Hippo's memory systems to our modern taxonomy in cognitive psychology and neuroscience of memory: a 16-century nap of intuition before light of evidence.** *Behavioral Sciences*, 3(1), 21-41.

Cassel, J. C., De Vasconcelos, A. P., Loureiro, M., Cholvin, T., Dalrymple-Alford, J. C., & Vertes, R. P. (2013). **The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications.** *Progress in neurobiology*, 111, 34-52.

Chen Q, He S, Hu XL, Yu J, Zhou Y, Zheng J, Zhang S, Zhang C, Duan WH, Xiong ZQ. (2007). **Differential roles of N2A- and N2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis.** *J Neurosci* 27:542–552.

Cholvin, T., Hok, V., Giorgi, L., Chaillan, F. A., Poucet, B. (2018). **Ventral midline thalamus is necessary for hippocampal place field stability and cell firing modulation.** *Journal of Neuroscience*, 38(1), 158-172.

Cohen BM, Wan W, Froimowitz MP, Ennulat DJ, Cherkerzian S, Konieczna H. (1998). **Activation of midline thalamic nuclei by antipsychotic drugs.** *Psychopharmacol (Berl.)* 135:37-43.

Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., Worley, P. F. (1989). **Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation.** *Nature*, 340(6233), 474-476.

Collingridge, G. L., Kehl, S. J., McLennan, H. T. (1983). **Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus.** *The Journal of physiology*, 334(1), 33-46.

Corcoran, K.A., Quirk, G.J. (2007). **Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears.** *Journal of Neuroscience*, 27(4), 840-844.

Couto-Pereira, N.D.S., Lampert, C., Vieira, A.D.S., Lazzaretti, C., Kincheski, G.C., Espejo, P.J., Molina, V.A., Quillfeldt, J.A. Dalmaz, C. (2019). **Resilience and vulnerability to trauma: Early life interventions modulate aversive memory reconsolidation in the dorsal hippocampus.** *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, p.134.

Crestani, A.P., Boos, F.Z., Haubrich, J., Sierra, R.O., Santana, F., Molina, J.M.D., de Freitas Cassini, L., de Oliveira Alvares, L., Quillfeldt, J.A. (2015). **Memory reconsolidation may be disrupted by a distractor stimulus presented during reactivation.** *Scientific reports*, 5, p.13633.

Cruikshank SJ, Ahmed OJ, Stevens TR, Patrick SL, Gonzales AN, Elmaleh M, Connors BW. (2012). **Thalamic control of layer 1 circuits in prefrontal cortex.** *J Neurosci* 32: 17813–17823.

Cull-Candy, S. G., Leszkiewicz, D. N. (2004). **Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses.** *Science's STKE*, 2004(255).

Curran T, Rauscher 3rd FJ, Cohen DR, Franza Jr BR. (1988). **Beyond the second messenger: oncogenes and transcription factors.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 53: 769–777.

Denny, C. A., Lebois, E., Ramirez, S. (2017). **From engrams to pathologies of the brain.** *Frontiers in neural circuits*, 11, 23.

Descartes, R. (1977). 1641. **Meditations on first philosophy**, 35.

DeVito LM, Eichenbaum H. (2011). **Memory for the order of events in specific sequences: contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex.** *J Neurosci* 31: 3169–3175.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999). **The glutamate receptor ion channels.** *Pharmacological reviews*, 51(1), 7-62

Dolleman-van der Weel, M. J., & Witter, M. P. (2020). **The thalamic midline nucleus reuniens: potential relevance for schizophrenia and epilepsy.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.

Dolleman-Van der Weel, M. J., Da Silva, F. L., Witter, M. P. (2017). **Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat.** *Brain Structure and Function*, 222(5), 2421-2438.

Dolleman-van der Weel, M. J., Griffin, A. L., Ito, H. T., Shapiro, M. L., Witter, M. P., Vertes, R. P., & Allen, T. A. (2019). **The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior.** *Learning & Memory*, 26(7), 191-205.

Dolleman-van der Weel, M. J., Morris, R. G., Witter, M. P. (2009). **Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning.** *Brain structure and function*, 213(3), 329-342.

Dolleman-van der Weel, M.J., Witter, M.P. (1996). **Projections from the nucleus reuniens thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons.** *J. Comp. Neurol.* 364, 637–650.

Dolleman-Van der Weel, M.J., Witter, M.P., (2000). **Reuniens nucleus thalami innervates g aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat.** *Neurosci. Lett.* 278, 145–148.

Dossani, R. H., Missios, S., Nanda, A. (2015). **The legacy of Henry Molaison (1926–2008) and the impact of his bilateral mesial temporal lobe surgery on the study of human memory.** *World neurosurgery*, 84(4), 1127-1135.

Dragunow M. (1996). **A role for immediate-early transcription factors in learning and memory.** *Behav Genet.* 26(3):293–299.

Drexel M, Preidt AP, Kirchmair E Sperk G. (2011). **Parvalbumin interneurons and calretinin fibers arising from the thalamic nucleus reuniens degenerate in the subiculum after kainic acid-induced seizures.** *Neurosci* 189:316-329.

Duan AR, Varela C, Zhang Y, Shen Y, Xiong L, Wilson MA, Lisman J. (2015). **Delta frequency optogenetic stimulation of the thalamic nucleus reuniens is sufficient to produce working memory deficits: relevance to schizophrenia.** *Biol Psychiatry* 77:1098-1107.

Dudai, Y. (2012). **The restless engram: consolidations never end.** Annual review of neuroscience, 35, 227-247.

Duvarci, S., Pare, D. (2014). **Amygdala microcircuits controlling learned fear.** Neuron 82, 966–980.

Edman, S., McKay, S., Macdonald, L. J., Samadi, M., Livesey, M. R., Hardingham, G. E., Wyllie, D. J. A. (2012). **TCN 201 selectively blocks GluN2A-containing NMDARs in a GluN1 co-agonist dependent but non-competitive manner.** Neuropharmacology, 63(3), 441-449.

Eichenbaum, H. (1993). **Memory, amnesia, and the hippocampal system.** MIT press.

Eisenberg, M., Dudai, Y. (2004). **Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die.** European Journal of Neuroscience, 20(12), 3397-3403.

Ellis, P.D. (2010). **The essential guide to effect sizes: Statistical power, meta-analysis, and the interpretation of research results.** Cambridge University Press.

Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J., Traynelis, S. F. (2005). **Subunit-specific gating controls rat NR1/N2A and NR1/N2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles.** The Journal of Physiology, 563(2), 345–358.

Espejo, P. J., Ortiz, V., Martijena, I. D., Molina, V. A. (2016). **Stress-induced resistance to the fear memory labilization/reconsolidation process. Involvement of the basolateral amygdala complex.** Neuropharmacology, 109, 349-356.

Espejo, P. J., Ortiz, V., Martijena, I. D., Molina, V. A. (2021). **Stress-induced resistance to fear memory destabilization is associated with an impairment of Lys-48-linked protein polyubiquitination in the Basolateral Amygdala: Influence of D-cycloserine.** Neurobiology of Learning and Memory, 179, 107386.

Euston D.R, Tatsuno M, McNaughton B.L. (2007). **Fast-forward playback of recent memory sequences in prefrontal cortex during sleep.** Science 318: 1147–1150.

Euston, D. R., Gruber, A. J., McNaughton, B. L. (2012). **The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making.** Neuron, 76(6), 1057-1070.

Fendt A., Fanselow M.S. (1999). **The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 23(5): 743-760.

Fernandez, R. S., Pedreira, M. E., Boccia, M. M. (2017). **Does reconsolidation occur in natural settings? Memory reconsolidation and anxiety disorders.** Clinical psychology review, 57, 45-58

Ferraris, M., Cassel, J. C., de Vasconcelos, A. P., Stephan, A., Quilichini, P. P. (2021). **The Nucleus Reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.

Ferraris, M., Ghestem, A., Vicente, A. F., Nallet-Khosroffian, L., Bernard, C., Quilichini, P. P. (2018). **The nucleus reuniens controls long-range hippocampo–prefrontal gamma synchronization during slow oscillations.** *Journal of Neuroscience*, 38(12), 3026-3038.

Finnie, P. S., Nader, K. (2012). **The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1667-1707.

Flavell, C. R., Gascoyne, R. M., Lee, J. L. (2020). **Postreactivation mifepristone impairs generalization of strongly conditioned contextual fear memories.** *Learning & Memory*, 27(12), 483-487.

Foster, K. A., McLaughlin, N., Edbauer, D., Phillips, M., Bolton, A., Constantine-Paton, M., & Sheng, M. (2010). **Distinct Roles of N2A and N2B Cytoplasmic Tails in Long-Term Potentiation.** *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2676–2685.

Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., Silva, A. J. (2004). **The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory.** *Science*, 304(5672), 881-883.

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), 451-457.

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), 451-457.

Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., and Silva, A.J. Gomes, M. D. M., Moscovici, M., & Engelhardt, E. (2015). **Andreas Vesalius as a renaissance innovative neuroanatomist: his 5th centenary of birth.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(2), 155-158.

Fukushima, H., Zhang, Y., Archbold, G., Ishikawa, R., Nader, K., & Kida, S. (2014). **Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation.** *Elife*, 3, e02736.

Fukushima, H., Zhang, Y., Kida, S. (2021). **Interactions between the amygdala and medial prefrontal cortex as upstream regulators of the hippocampus to reconsolidate and enhance retrieved inhibitory avoidance memory.** *Molecular brain*, 14(1), 1-5.

Galeotti, N., Bartolini, A., Ghelardini, C. (2004). **Alpha-2 agonist-induced memory impairment is mediated by the alpha-2A-adrenoceptor subtype.** Behavioural brain research, 153(2), 409-417.

Gallo, F. T., Katche, C., Morici, J. F., Medina, J. H., Weisstaub, N. V. (2018). **Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on c-Fos, Egr1 and Arc.** Frontiers in behavioral neuroscience, 12, 79.

Gamache, K., Pitman, R. K., Nader, K. (2012). **Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder.** Neuropsychopharmacology, 37(13), 2789-2796.

Gazarini, L., Stern, C. A., Piornedo, R. R., Takahashi, R. N., Bertoglio, L. J. (2015). **PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation.** International Journal of Neuropsychopharmacology, 18(1).

Goebel, D. J., Pooch, M. S. (1999). **NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, N2A, N2B, NR2C, NR2D and NR3A.** Molecular Brain Research, 69(2), 164-170.

Gomes, M. D. M., Moscovici, M., Engelhardt, E. (2015). **Andreas Vesalius as a renaissance innovative neuroanatomist: his 5th centenary of birth.** Arquivos de neuro-psiquiatria, 73(2), 155-158.

Graef JD, Nordskog BK, Wiggins WF, Godwin DW. (2009). **An acquired channelopathy involving T-type Ca²⁺ channels after status epilepticus.** J Neurosci 29:4430-4441.

Gräff, J., Joseph, N.F., Horn, M.E., Samiei, A., Meng, J., Seo, J., Rei, D., Bero, A.W., Phan, T.X., Wagner, F. Holson, E. (2014). **Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories.** Cell,156(1-2),pp.261-276.

Groenewegen, H.J., Witter, M.P., (2004). **Thalamus**, in: Paxinos, G. (Ed.), The Rat Nervous System, third ed. Academic Press, San Diego, pp. 408–441.

Guise, K. G., & Shapiro, M. L. (2017). **Medial prefrontal cortex reduces memory interference by modifying hippocampal encoding.** Neuron,94(1), 183-192.

Hall, J., Thomas, K. L., Everitt, B. J. (2001). **Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories.** Journal of Neuroscience, 21(6), 2186-2193.

Hallock, H. L., Wang, A., & Griffin, A. L. (2016). **Ventral midline thalamus is critical for hippocampal–prefrontal synchrony and spatial working memory.** *Journal of Neuroscience*, 36(32), 8372-8389.

Hansen, K. B., Brauner-Osborne, H., Egebjerg, J. (2008). **Pharmacological characterization of ligands at recombinant NMDA receptor subtypes by electrophysiological recordings and intracellular calcium measurements.** *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 11(4), 304-315.

Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., Traynelis, S. F. (2018). **Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors.** *The Journal of general physiology*, 150(8), 1081-1105.

Hardenacke K, Shubina E, Bührle CP, Zapf A, Lenartz D, Klosterkötter J, Visser-Vanderwalle V, Kuhn J. (2013). **Deep brain stimulation as a tool for improving cognitive functioning in Alzheimer’s dementia: a systematical review.** *Front Psychiatry* 4:159.

Hashikawa, K., Matsuki, N., Nomura, H. (2011). **Preferential Arc transcription at rest in the active ensemble during associative learning.** *Neurobiology of learning and memory*, 95(4), 498-504.

Haubrich, J., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Santana, F., Sierra, R. O., de O Alvares, L., Quillfeldt, J. A. (2015). **Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information.** *Neuropsychopharmacology*, 40(2), 315.

Haubrich, J., Nader, K. (2016). **Memory reconsolidation.** *Behavioral neuroscience of learning and memory*, 151-176.

Hauer, B. E., Pagliardini, S., Dickson, C. T. (2019). **The reuniens nucleus of the thalamus has an essential role in coordinating slow-wave activity between neocortex and hippocampus.** *Eneuro*, 6(5)

Hebb, D. O. (1949). **The organization of behavior** (Vol. 65). New York: Wiley.

Herkenham, M. (1978). **The connections of the nucleus reuniens thalami: Evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat.** *J. Comp. Neurol.* 177, 589–610.

Hirayasu Y, Wada J.A. (1992a). **Convulsive seizures in rats induced by N-methyl-D-aspartate injection into the massa intermedia.** *Brain Res* 577:36-40

Hirayasu Y, Wada J.A. (1992b). **N-methyl-D-aspartate injection into the massa intermedia facilitates development of limbic kindling in rats.** *Epilepsia* 33:965-970.

Hoffman, A. N., Parga, A., Paode, P. R., Watterson, L. R., Nikulina, E. M., Hammer Jr, R. P., Conrad, C. D. (2015). **Chronic stress enhanced fear memories are associated with increased amygdala zif268 mRNA expression and are resistant to reconsolidation.** *Neurobiology of learning and memory*, 120, 61-68.

Holehonnur, R., Phensy, A.J., Kim, L.J., Milivojevic, M., Vuong, D., Daison, D.K., Alex, S., Tiner, M., Jones, L.E., Kroener, S., Ploski, J.E. (2016). **Increasing the GluN2A/GluN2B ratio in neurons of the mouse basal and lateral amygdala inhibits the modification of an existing fear memory trace.** *Journal of Neuroscience*, 36(36), pp.9490-9504.

Hoover, W.B., Vertes, R.P. (2007). **Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat.** *Brain Struct. Funct.* 212, 149–179.

Hoover, W.B., Vertes, R.P. (2012). **Collateral projections from reuniens nucleus of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study.** *Brain Struct. Funct.* 217, 191–209.

Houston, M. C. (1982). **Clonidine hydrochloride.** *Southern medical journal*, 75(6), 713-719.

Izquierdo, I., Furini, C. R., Myskiw, J. C. (2016). **Fear memory.** *Physiological reviews*, 96(2), 695-750.

James, A. B., Conway, A. M., & Morris, B. J. (2006). **Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1).** *Journal of Neuroscience*, 26(5), 1624-1634.

Janak, P. H., Tye, K. M. (2015). **From circuits to behaviour in the amygdala.** *Nature*, 517(7534), 284-292.

Jankowski, M. M., Islam, M. N., Wright, N. F., Vann, S. D., Erichsen, J. T., Aggleton, J. P., O'Mara, S. M. (2014). **Nucleus reuniens of the thalamus contains head direction cells.** *Elife*, 3, e03075.

Jarome, T. J., Ferrara, N. C., Kwapis, J. L., Helmstetter, F. J. (2016). **CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval.** *Neurobiology of learning and memory*, 128, 103-109.

Jarome, T. J., Helmstetter, F. J. (2013). **The ubiquitin–proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation.** *Neurobiology of learning and memory*, 105, 107-116.

Jarome, T. J., Helmstetter, F. J. (2014). **Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation.** *Frontiers in molecular neuroscience*, 7, 61.

Jarome, T. J., Werner, C. T., Kwapis, J. L., Helmstetter, F. J. (2011). **Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala.** PloS one,6(9), e24349.

Jarvis, E. D., Güntürkün, O., Bruce, L., Csillag, A., Karten, H., Kuenzel, W., Jayachandran M, Linley S, Schlecht M, Mahler SV, Vertes RP, Allen TA. (2018). **Prefrontal pathways provide top-down control of memory for sequences of events.** bioRxiv.

Jarvis, E.D., Güntürkün, O., Bruce, L., Csillag, A., Karten, H., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Perkel, D.J., Shimizu, T. and Striedter, G. (2005). **Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution.** Nature Reviews Neuroscience, 6(2), pp.151-159.

Jayachandran, M., Linley, S. B., Schlecht, M., Mahler, S. V., Vertes, R. P., Allen, T. A. (2019). **Prefrontal pathways provide top-down control of memory for sequences of events.** Cell reports, 28(3), 640-654.

Jin D.H, Jung Y.W, Ko B.H, Moon I.S. (1997). **Immunoblot analyses on the differential distribution of N2A and N2B subunits in the adult rat brain.** Mol Cells 7: 749-54.

Jin, J., Maren, S. (2015). **Prefrontal-hippocampal interactions in memory and emotion.** Frontiers in systems neuroscience, 9, 170.

Junjiao, L., Wei, C., Jingwen, C., Yanjian, H., Yong, Y., Liang, X., Jing, J. Xifu, Z. (2019). **Role of prediction error in destabilizing fear memories in retrieval extinction and its neural mechanisms.** Cortex,121, pp.292-307

Kafetzopoulos V, Kokras N, Sotiropoulos I. (2018). **The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression.** Mol Psych 23:579-586. Doi:10.1038/mp.2017.55.

Kafetzopoulos, V., Kokras, N., Sousa, N., Antoniou, K., Sotiropoulos, I., Dalla, C. (2021). **Nucleus reuniens lesion and antidepressant treatment prevent hippocampal neurostructural alterations induced by chronic mild stress in male rats.** Neuroscience, 454, 85-93.

Kandel, E. R., Dudai, Y., Mayford, M. R. (2014). **The molecular and systems biology of memory.** Cell, 157(1), 163-186.

Kessels, H. W., & Malinow, R. (2009). **Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior.** Neuron, 61(3), 340-350.

Kida, S. (2019). **Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD.** Psychopharmacology,236(1), 49-57.

Kim, J. J., DeCola, J. P., Landeira-Fernandez, J., Fanselow, M. S. (1991). **N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning.** Behavioral neuroscience, 105(1), 126

Kim, M., Campeau, S., Falls, W. A., Davis, M. (1993). **Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of fear-potentiated startle.** Behavioral and neural biology, 59(1), 5-8.

Kishi, T., Tsumori, T., Yokota, S., Yasui, Y. (2006). **Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat.** Journal of Comparative Neurology, 496(3), 349-368.

Krawczyk, M. C., Fernández, R. S., Pedreira, M. E., Boccia, M. M. (2017). **Toward a better understanding on the role of prediction error on memory processes: From bench to clinic.** Neurobiology of Learning and Memory, 142, 13–20.

Krout, K. E., Belzer, R. E., Loewy, A. D. (2002). **Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat.** Journal of Comparative Neurology, 448(1), 53-101.

Lambe, E. K., Liu, R. J., Aghajanian, G. K. (2007). **Schizophrenia, hypocretin (orexin), and the thalamocortical activating system.** Schizophrenia bulletin, 33(6), 1284-1290.

Laroche, S., Davis, S., Jay, T.M. (2000). **Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation.** Hippocampus 10, 438–446.

Lashley, K. (1950). **In search of the engram.** In Experimental Biology Symposium No. 4: Physiological Mechanisms in Animal Behaviour. J.F. Danielli & R. Brown, Eds.: 454–482. New York: Academic Press.

Lee, J. L. (2010). **Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content.** Frontiers in behavioral neuroscience, 4, 168.

Lee, J. L., Di Ciano, P., Thomas, K. L., Everitt, B. J. (2005). **Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior.** Neuron, 47(6), 795-801.

Lee, J. L., Milton, A. L., Everitt, B. J. (2006). **Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation.** Journal of Neuroscience, 26(39), 10051-10056.

Lee, J. Q., Demchuk, A. M., Morgan, E., McHugh, R., McNaughton, B. L., Sutherland, R. J., McDonald, R. J. (2019). **Place navigation in the Morris water task results in greater nuclear Arc mRNA expression in dorsal compared to ventral CA1.** Hippocampus, 29(11), 1133-1138.

Lee, S.H., Choi, J.H., Lee, N., Lee, H.R., Kim, J.I., Yu, N.K., Choi, S.L., Lee, S.H., Kim, H. Kaang, B.K. (2008). **Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory.** *Science*, 319(5867), pp.1253-1256

Lewis, D. J. (1979). **Psychobiology of active and inactive memory.** *Psychological Bulletin*, 86(5), 1054–1083.

Lim, C. S., Kim, J. I., Kwak, C., Lee, J., Jang, E. H., Oh, J., Kaang, B. K. (2018). **β -Adrenergic signaling is required for the induction of a labile state during memory reconsolidation.** *Brain research bulletin*, 141, 50-57.

Lin, Y. J., Chiou, R. J., Chang, C. H. (2020). **The Reuniens and Rhomboid Nuclei Are Required for Acquisition of Pavlovian Trace Fear Conditioning in Rats.** *Eneuro*, 7(3).

Lip, P. Z., Demasi, M., Bonatto, D. (2017). **The role of the ubiquitin proteasome system in the memory process.** *Neurochemistry international*, 102, 57-65.

Lisman, J. (2012). **Excitation, inhibition, local oscillations, or large-scale loops: what causes the symptoms of schizophrenia?.** *Current opinion in neurobiology*, 22(3), 537-544.

Lisman, J. E., Pi, H. J., Zhang, Y., Otmakhova, N. A. (2010). **A thalamo-hippocampal-ventral tegmental area loop may produce the positive feedback that underlies the psychotic break in schizophrenia.** *Biological psychiatry*, 68(1), 17-24.

Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Ranganath, C., Redish, A. D. (2017). **Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition.** *Nature neuroscience*, 20(11), 1434-1447.

Liu L., Wong T.P, Pozza M.F, Lingenhoehl K., Wang Y., Sheng M., Auberson Y.P, Wang Y.T. (2004). **Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity.** *Science* 304:1021–1024.

Lorez, H. P., Kiss, D., Da Prada, M., Haeusler, G. (1983). **Effects of clonidine on the rate of noradrenaline turnover in discrete areas of the rat central nervous system.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 323(4), 307-314.

Loureiro, M., Cholvin, T., Lopez, J., Merienne, N., Latreche, A., Cosquer, B., de Vasconcelos, A. P. (2012). **The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats.** *Journal of Neuroscience*, 32(29), 9947-9959.

Lux, V., Masseck, O. A., Herlitze, S., Sauvage, M. M. (2017). **Optogenetic destabilization of the memory trace in CA1: insights into reconsolidation and retrieval processes.** *Cerebral Cortex*, 27(1), 841-851.

Lynch, G., Baudry, M. (1984). **The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis.** *Science*, 224(4653), 1057-1063.

Majchrzak, M., Di Scala, G. (1999). **GABA and muscimol as reversible inactivation tools in learning and memory.** *Neural plasticity*, 7(1-2), 19-29.

Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P. W., Kida, S. (2009). **Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory.** *Journal of Neuroscience*, 29(2), 402-413.

Mamou, C. B., Gamache, K., Nader, K. (2006). **NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories.** *Nature neuroscience*, 9(10), 1237.

Maren, S.; Phan, K. L.; Liberzon, I. (2013). **The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology.** *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 417–428.

Marin, F. N., Franzen, J. M., Troyner, F., Molina, V. A., Giachero, M., Bertoglio, L. J. (2020). **Taking advantage of fear generalization-associated destabilization to attenuate the underlying memory via reconsolidation intervention.** *Neuropharmacology*, 181, 108338.

Martin, J. H., Ghez, C. (1999). **Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement.** *Journal of neuroscience methods*, 86(2), 145-159.

Massey P.V, Johnson B.E, Moulton P.R, Auberson Y.P, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI. (2004). **Differential roles of N2A and N2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression.** *J Neurosci* 24:7821–7828.

Mayadevi, M., Praseeda, M., Kumar, K.S., Omkumar, R.V. (2002). **Sequence determinants on the N2A and N2B subunits of NMDA receptor responsible for specificity of phosphorylation by CaMKII.** *Biochim. Biophys. Acta* 1598, 40–45.

McDonald, A. J. (1998). **Cortical pathways to the mammalian amygdala.** *Prog. Neurobiol.* 55, 257–332

McDougall, W. (1901). **Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss.**

McGaugh, J. L. (1966). **Time-dependent processes in memory storage.** *Science*, 153(3742), 1351-1358.

McGaugh, J. L. (2000). **Memory - a century of consolidation.** *Science*, 287(5451), 248-251.

- McKenna, J. T., Vertes, R. P. (2004). **Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus.** *Journal of comparative neurology*, 480(2), 115-142.
- Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT. (2010). **PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking.** *Nat Neurosci* 13:630– 634.
- Migues PV, Liu L, Archbold GEB, Einarsson EO, Wong J, Bonasia K. (2016). **Blocking synaptic removal of GluA2-containing AMPA receptors prevents the natural forgetting of long-term memories.** *J Neurosci* 36:3481–3494
- Milekic, M. H., Alberini, C. M. (2002). **Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation.** *Neuron*,36(3), 521-525.
- Milton, A. L., Merlo, E., Ratano, P., Gregory, B. L., Dumbreck, J. K., Everitt, B. J. (2013). **Double dissociation of the requirement for GluN2B-and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory.** *Journal of Neuroscience*, 33(3), 1109-1115.
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., Okuno, H. (2016). **Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace.** *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 78.
- Misanin, J. R., Miller, R. R., Lewis, D. J. (1968). **Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace.** *Science*, 160(3827), 554-555.
- Miserendino, M. J., Sananes, C. B., Melia, K. R., Davis, M. (1990). **Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala.** *Nature*,345(6277), 716.
- Monti, R. I. F., Giachero, M., Alfei, J. M., Bueno, A. M., Cuadra, G., Molina, V. A. (2016). **An appetitive experience after fear memory destabilization attenuates fear retention: involvement GluN2B-NMDA receptors in the Basolateral Amygdala Complex.** *Learning & Memory*, 23(9), 465-478.
- Morris, R. G. (2013). **NMDA receptors and memory encoding.** *Neuropharmacology*,74, 32-40.
- Moser, M. B., Moser, E. I. (1998). **Functional differentiation in the hippocampus.** *Hippocampus*, 8(6), 608-619.
- Müller, G. E., Pilzecker, A. (1900). **Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss** (Vol. 1). JA Barth.

- Murphy, T. H., Worley, P. F., & Baraban, J. M. (1991). **L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes.** *Neuron*, 7(4), 625-635.
- Nader, K., Schafe, G. E., Le Doux, J. E. (2000). **Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval.** *Nature*, 406(6797), 722.
- Nakayama, D., Hashikawa-Yamasaki, Y., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nomura, H. (2016). **Late Arc/Arg3.1 expression in the basolateral amygdala is essential for persistence of newly-acquired and reactivated contextual fear memories.** *Scientific reports*, 6, 21007.
- Nguyen, V., Tiemann, D., Park, E., Salehi, A. (2017). **Alpha-2 agonists.** *Anesthesiology clinics*, 35(2), 233-245.
- Nieuwenhuis, I. L., Takashima, A. (2011). **The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation.** *Behavioural brain research*, 218(2), 325-334.
- O'keefe, J., & Nadel, L. (1978). **The hippocampus as a cognitive map.** Oxford: Clarendon Press.
- Orlandi, I. R., Fullio, C. L., Schroeder, M. N., Giurfa, M., Ballarini, F., Moncada, D. (2020). **Behavioral tagging underlies memory reconsolidation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(30), 18029-18036.
- Ortiz, V., Espejo, P. J., Molina, V. A., Martijena, I. D. (2019). **Ethanol withdrawal limits fear memory reactivation-induced molecular events associated with destabilization phase: Influence of d-cycloserine.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 89, 9-15.
- Ortiz, V., Molina, V. A., Martijena, I. D. (2016). **Effect of a positive reinforcing stimulus on fear memory reconsolidation in ethanol withdrawn rats: Influence of d-cycloserine.** *Behavioural brain research*, 315, 66-70.
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. (2013). **NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease.** *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383.
- Paupard, M. C., Friedman, L. K., Zukin, R. S. (1997). **Developmental regulation and cell-specific expression of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants in rat hippocampus.** *Neuroscience*, 79(2), 399-409.
- Pavlov I.P. (1927). **Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex.** London: Oxford Univ.Press.

Paxinos G., Watson C., Carrive P., Kirkcaldie M.T.K., Ashwell K. (2009). **Chemoarchitectonic atlas of the rat brain.**

Pedreira, M. E., Maldonado, H. (2003). **Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration.** *Neuron*,38(6), 863-869.

Pérez-Cuesta, L. M., Maldonado, H. (2009). **Memory reconsolidation and extinction in the crab: Mutual exclusion or coexistence?** *Learning & memory*,16(11), 714-721.

Pignatelli, M., Ryan, T. J., Roy, D. S., Lovett, C., Smith, L. M., Muralidhar, S., Tonegawa, S. (2019). **Engram cell excitability state determines the efficacy of memory retrieval.** *Neuron*,101(2), 274-284.

Przybylski, J., Sara, S. J. (1997). **Reconsolidation of memory after its reactivation.** *Behavioural brain research*, 84(1-2), 241-246.

Queenan, B. N., Ryan, T. J., Gazzaniga, M., Gallistel, C. R. (2017). **On the research of time past: the hunt for the substrate of memory.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1396(1), 108.

Quet, E., Majchrzak, M., Cosquer, B., Morvan, T., Wolff, M., Cassel, J. C., Stéphan, A. (2020). **The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats.** *Brain Structure and Function*, 1-14.

Quirk, G.J., Beer, J.S. (2006) **Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies.** *Curr Opin Neurobiol* 16, 723–727.

Rahman, F., Nanu, R., Schneider, N. A., Katz, D., Lisman, J., Pi, H. J. (2021). **Optogenetic perturbation of projections from thalamic nucleus reuniens to hippocampus disrupts spatial working memory retrieval more than encoding.** *Neurobiology of Learning and Memory*, 179, 107396.

Rajasethupathy, P., Sankaran, S., Marshel, J.H., Kim, C.K., Ferenczi, E., Lee, S.Y., Berndt, A., Ramakrishnan, C., Jaffe, A., Lo, M. Liston, C. (2015). **Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval.** *Nature*, 526(7575), pp.653-659.

Ramanathan, K. R., Jin, J., Giustino, T. F., Payne, M. R., Maren, S. (2018). **Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction.** *Nature communications*, 9(1), 1-12.

Ramanathan, K. R., Maren, S. (2019). **Nucleus reuniens mediates the extinction of contextual fear conditioning.** *Behavioural brain research*, 374, 112114.

Ramon y Cajal, S. (1894). **Croonian lecture: la fine structure des centres nerveux.** *Proc. R. Soc. Lond.* 44: 444–468.

Ray A, Graham AJ, Lee M, Perry RH, Court JA, Perry EK. (2005). **Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autism: an immunohistochemical investigation in the thalamus.** *Neurobiol Dis* 19:366-377.

Reagh ZM, Murray EA, Yassa MA. (2017). **Repetition reveals ups and downs of hippocampal, thalamic, and neocortical engagement during mnemonic decisions.** *Hippocampus* 27:169-183.

Richardson CL, Tate WP, Mason SE, Lawlor PA, Dragunow M, Abraham WC. (1992). **Correlation between the induction of an immediate early gene, zif/268, and long-term potentiation in the dentate gyrus.** *Brain Res.* 580(1-2):147-154

Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., LeDoux, J. E. (2001). **Intra-amygdala blockade of the N2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning.** *Journal of Neuroscience*,21(17), 6889-6896.

Romeo A, Roach ATI, Toth E, Chaitania G, Ilyas A, Riley KO, Pati S. (2019) **Early ictal recruitment of midline thalamus in mesial temporal lobe epilepsy.** *Ann Clin Transl Neurol* 6:1552-1558.

Rosier, M., Le Barillier, L., Meunier, D., El Yacoubi, M., Malleret, G., Salin, P. A. (2018). **Post-learning paradoxical sleep deprivation impairs reorganization of limbic and cortical networks associated with consolidation of remote contextual fear memory in mice.** *Sleep*, 41(12), zsy188.

Ross, W.D. (1930). **The Works of Aristotle.** Clarendon Press: Oxford, UK, 1930; Volume 3

Saalmann Y.B. (2014) **Intralaminar and medial thalamic influence on cortical synchrony, information transmission and cognition.** *Front Syst Neurosci* 8:83.

Saitoh, A., Akagi, K., Oka, J. I., Yamada, M. (2017). **Post-reexposure administration of D-cycloserine facilitates reconsolidation of contextual conditioned fear memory in rats.** *Journal of Neural Transmission*,124(5), 583-587.

Salery, M., Godino, A., Nestler, E. J. (2021). **Drug-activated cells: From immediate early genes to neuronal ensembles in addiction.**

Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., Roche, K. W. (2013). **Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences.** *The Neuroscientist*, 19(1), 62-75

Sara, S. J. (2000). **Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering.** *Learning & memory*, 7(2), 73-84.

Scavuzzo, C. J., Leblancq, M. J., Nargang, F., Lemieux, H., Hamilton, T. J., Dickson, C. T. (2019). **The amnestic agent anisomycin disrupts intrinsic membrane properties of**

hippocampal neurons via a loss of cellular energetics. *Journal of neurophysiology*, 122(3), 1123-1135.

Schacter, D.L., Eich J.E., Tulving, E. (1978). **Richard Semon's theory of memory.** *J. Verbal Learn. Verbal Behav.* 17: 721– 743.

Scheel, N., Wulff, P., de Mooij-van Malsen, J. G. (2020). **Afferent connections of the thalamic nucleus reuniens in the mouse.** *Journal of Comparative Neurology*, 528(7), 1189-1202.

Schroyens, N., Beckers, T., Kindt, M. (2017). **In search for boundary conditions of reconsolidation: A failure of fear memory interference.** *Frontiers in behavioral neuroscience*, 11, 65.

Scoville, W.B., Milner, B. (1957). **Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.** *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.

Seeburg, P. H., Burnashev, N., Köhr, G., Kuner, T., Sprengel, R., Monyer, H. (1995). **The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector.** In *Proceedings of the 1993 Laurentian Hormone Conference* (pp. 19-34). Academic Press.

Semon, R. (1904). **Die Mneme.** Allen & Unwin.

Sesack, S. R., Deutch, A. Y., Roth, R. H., Bunney, B. S. (1989). **Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin.** *Journal of Comparative Neurology*, 290(2), 213-242.

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), 338-345.

Sevenster, D., Beckers, T., Kindt, M. (2013). **Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear.** *Science*, 339(6121), 830-833.

Shehata, M., Abdou, K., Choko, K., Matsuo, M., Nishizono, H., Inokuchi, K. (2018). **Autophagy enhances memory erasure through synaptic destabilization.** *Journal of Neuroscience*, 38(15), 3809-3822.

Silva, B. A., Burns, A. M., Gräff, J. (2019). **A cFos activation map of remote fear memory attenuation.** *Psychopharmacology*, 236(1), 369-381.

Sloan, D. M., Bertram III, E. H. (2009). **Changes in midline thalamic recruiting responses in the prefrontal cortex of the rat during the development of chronic limbic seizures.** *Epilepsia*, 50(3), 556-565.

Solis, C.A., Gonzalez, C.U., Galdamez, M.A., Perish, J.M., Woodard, S.W., Salinas, C.E., Miller, J.N., Elahi, H., Pineda, O.H., Oad, S., de las Fuentes, S.G. (2019). **Increasing synaptic GluN2B levels within the basal and lateral amygdala enables the modification of strong reconsolidation resistant fear memories.** bioRxiv, p.537142.

Squire, L. R. (1984). **The neuropsychology of memory.** In *The biology of learning* (pp. 667-686). Springer, Berlin, Heidelberg.

Squire, L.R. (2004). **Memory systems of the brain: a brief history and current perspective.** *Neurobiol. Learn. Mem.* 82: 171–177.

Squire, L.R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuro- science. *Neuron* 61: 6–9.

Stern, C. A., Gazarini, L., Vanvossen, A. C., Hames, M. S., Bertoglio, L. J. (2014). **Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time.** *Learning & memory*, 21(1), 14-20.

Strack, S., Colbran, R.J. (1998). **Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the N2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor.** *J. Biol. Chem.* 273, 20689–20692.

Strack, S., McNeill, R.B., Colbran, R.J. (2000). **Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the N2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor.** *J. Biol. Chem.* 275, 23798–23806.

Su, H. S., Bentivoglio, M. (1990). **Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat.** *Journal of Comparative Neurology*, 297(4), 582-593.

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.** *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787-4795.

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), 426-433.

Tedesco, V., Roquet, R. F., DeMis, J., Chiamulera, C., Monfils, M. H. (2014). **Extinction, applied after retrieval of auditory fear memory, selectively increases zinc-finger protein 268 and phosphorylated ribosomal protein S6 expression in prefrontal cortex and lateral amygdala.** *Neurobiology of learning and memory*, 115, 78-85.

Thielen J-W, Hong D, Rankouhi S.R. (2018) **The increase in medial prefrontal glutamate/glutamine concentration during memory encoding is associated with**

better memory performance and stronger functional connectivity in the human medial prefrontal-thalamus-hippocampus network. *Hum Brain Mapp* 39:2381-2390.

Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D. S., Ryan, T. J. (2015). **Memory engram storage and retrieval.** *Current opinion in neurobiology*, 35, 101-109.

Troyner, F. (2017). **Papel do núcleo reuniens do tálamo na consolidação de memórias aversivas contextuais.** Dissertação (mestrado) -Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Troyner, F., Bicca, M. A., Bertoglio, L. J. (2018). **Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation.** *Hippocampus*, 28(8), 602-616.

Van der Werf, Y.D., Witter, M.P., Groenewegen, H.J. (2002). **The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness.** *Brain Res. Rev.* 39, 107–140.

Varela, C. (2014). **Thalamic neuromodulation and its implications for executive networks.** *Frontiers in neural circuits*, 8, 69.

Varela, C., Kumar, S., Yang, J. Y., Wilson, M. A. (2014). **Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens.** *Brain Structure and Function*, 219(3), 911-929.

Vertes, R. P. (2002). **Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens.** *Journal of Comparative Neurology*, 442(2), 163-187.

Vertes, R. P., Hoover, W. B., Do Valle, A. C., Sherman, A., Rodriguez, J. J. (2006). **Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat.** *Journal of comparative neurology*, 499(5), 768-796.

Vertes, R. P., Hoover, W. B., Szigeti-Buck, K., Leranth, C. (2007). **Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus.** *Brain research bulletin*, 71(6), 601-609.

Vertes, R.P., (2004). **Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat.** *Synapse* 51, 32–58.

Vetere, G., Kenney, J.W., Tran, L.M., Xia, F., Steadman, P.E., Parkinson, J., Josselyn, S.A., Frankland, P.W. (2017). **Chemogenetic interrogation of a brain-wide fear memory network in mice.** *Neuron*, 94(2), pp.363-374.

- Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S., Laroche, S. (2014). **The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory.** *Progress in molecular biology and translational science*, 122, 89-129.
- Viana Di Prisco, G., Vertes, R.P., (2006). **Excitatory actions of the ventral midline thalamus (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat.** *Synapse* 60, 45–55.
- Viana, T. D., Linley, S. B., Vertes, R. P. (2018). **Inactivation of nucleus reuniens impairs spatial working memory and behavioral flexibility in the rat.** *Hippocampus*, 28(4), 297-311.
- Viana, T. D., Rasch, G. E., Silva, D., Allen, T. A. (2020). **Calretinin and calbindin architecture of the midline thalamus associated with prefrontal–hippocampal circuitry.** *Hippocampus*.
- Visser, P.J., Krabbendam, L., Verhey, F.R.J., Hofman, P.A.M., Verhoeven, W.M.A., Tuinier, S., Wester, A., Van Den Berg, Y.W.M.M., Goessens, L.F.M., Van Der Werf, Y.D. and Jolles, J. (1999). **Brain correlates of memory dysfunction in alcoholic Korsakoff's syndrome.** *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 67(6), pp.774-778.
- Wagner, I. C., van Buuren, M., Fernández, G. (2019). **Thalamo-cortical coupling during encoding and consolidation is linked to durable memory formation.** *NeuroImage*, 197, 80-92.
- Walker, D. L., Davis, M. (2002). **The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(3), 379-392.
- Walsh D.A., Brown J.T., Randall A.D. (2020). **Neurophysiological alterations in the nucleus reuniens of a mouse model of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 88:1-10.
- Wang X, Stewart L, Cortez M.A., Wu Y, Velazquez J.C., Liu C.C., Shen L, Snead O.C. 3rd. (2009). **The circuitry of atypical absence seizures in GABA(B)R1a transgenic mice.** *Pharmacol Biochem Behav* 94:124-130.
- Wang, J. Q., Daunais, J. B., McGinty, J. F. (1994). **Role of kainate/AMPA receptors in induction of striatal zif/268 and preprodynorphin mRNA by a single injection of amphetamine.** *Molecular brain research*, 27(1), 118-126.
- 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.

Wideman, C. E., Jardine, K. H., & Winters, B. D. (2018). **Involvement of classical neurotransmitter systems in memory reconsolidation: focus on destabilization.** *Neurobiology of learning and memory*, 156, 68-79

Winters, B. D., Tucci, M. C., Da Costa-Furtado, M. (2009). **Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information.** *Learning & memory*, 16(9), 545-553.

Wisden, W., Errington, M. L., Williams, S., Dunnett, S. B., Waters, C., Hitchcock, D., Hunt, S. P. (1990). **Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord.** *Neuron*, 4(4), 603-614.

Worley, P. F., Christy, B. A., Nakabeppu, Y., Bhat, R. V., Cole, A. J., Baraban, J. M. (1991). **Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5106-5110.

Wouterlood, F.G., Saldana, E., Witter, M.P. (1990). **Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: Light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer phaseolus vulgaris-leucoagglutinin.** *J. Comp. Neurol.* 296, 179– 203.

Xu, W., Südhof, T. C. (2013). **A neural circuit for memory specificity and generalization.** *Science*, 339(6125), 1290-1295.

Yu, Y. J., Huang, C. H., Chang, C. H., Gean, P. W. (2016). **Involvement of protein phosphatases in the destabilization of methamphetamine-associated contextual memory.** *Learning & memory*, 23(9), 486-493.

Zhang Y, Yoshida T, Katz D.B., Lisman J.E. (2012). **NMDA antagonist action in thalamus imposes delta oscillations on the hippocampus.** *J Neurophysiol* 107:3181-3189.

Zhang, J. J., Haubrich, J., Bernabo, M., Finnie, P. S., Nader, K. (2018). **Limits on lability: Boundaries of reconsolidation and the relationship to metaplasticity.** *Neurobiology of learning and memory*, 154, 78-86.

Zhu, L., Zhu, L., Huang, Y., Shi, W., Yu, B. (2018). **Memory reconsolidation and extinction of fear conditioning induced different Arc/Arg3.1 expression.** *NeuroReport*, 29(12), 1036-1045.

Zimmerman, E. C., Grace, A. A. (2018). **Prefrontal cortex modulates firing pattern in the nucleus reuniens of the midline thalamus via distinct corticothalamic pathways.** *European Journal of Neuroscience*, 48(10), 3255-3272.