

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

**A RECONSOLIDAÇÃO DE UMA MEMÓRIA DE MEDO NA
PRESENÇA DE ESTÍMULOS APETITIVOS LEVA À
ATUALIZAÇÃO DE SEU CONTEÚDO EMOCIONAL E À
DIMINUIÇÃO DE SUA AVERSIVIDADE**

JOSUÉ HAUBRICH

Orientador: Jorge Alberto Quillfeldt

Co-Orientador: Lucas de Oliveira Alvares

*Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Neurociências, como pré-
requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre.*

Porto Alegre, Fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial ao meus pais e à Ina, por todo apoio, incentivo, confiança que depositam em mim e sabedoria com que sempre me aconselharam.

Ao professor Jorge, pela orientação e exemplo de pessoa e cientista, pela amizade, por acreditar no meu trabalho e sempre ter me apoiado.

A todos os colegas do laboratório, pela amizade, pela ajuda e por tornarem o ambiente do nosso grupo um lugar cientificamente estimulante e cheio de companheirismo: Ana, Fabiana, Fabrício, Flávia, Johanna, Lindsey, Luiza, Querusche, Rodrigo, Zelma e em especial ao Lucas, pela sua co-orientação sempre presente que em muito me ajudou.

Ao PPG de Neurociências e seus professores, pela ótima formação acadêmica que oferecem aos seus alunos.

Ao CNPq pela bolsa e à UFRGS e SBNeC pelos auxílios financeiros.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês para *Brain-derived neurotrophic factor*).

CAC – Condicionamento aversivo ao contexto (em inglês, CFC).

CB1 – Receptor canabinóide do tipo I.

CFC – *Contextual fear conditioning* (em português, CAC).

CREB - Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (do inglês para *cAMP response element-binding protein*).

E.U.A. – Estados Unidos da América.

L-VGCC - Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (do inglês para *L-type voltage-gated Ca⁺⁺-channel*).

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês para *Mitogen-activated protein kinases*).

NMDA – Ácido N-metil D-Aspartato (do inglês para *N-Methyl-D-aspartic acid*).

PKA – Proteína cinase A (do inglês para *Protein kinase A*).

PTSD - *Posttraumatic stress disorder* (em português, TEPT).

TEPT – Transtorno do estresse pós-traumático (em inglês, *PTSD*).

RESUMO

A reativação de uma memória previamente consolidada pode levá-la a voltar a um estado lábil e instável, necessitando da reconsolidação para se reestabilizar e persistir. Durante a reconsolidação, o traço de memória se torna suscetível a modificações e pode ser atualizado através da incorporação de novas informações. A reconsolidação abre a possibilidade, portanto, para que se modifique memórias de medo indesejáveis, mas a possibilidade de modificá-la de forma a alterar sua valência emocional para um estado menos aversivo ainda não foi investigado. Neste trabalho, foi verificado se a apresentação de estímulos apetitivos durante a reativação de uma memória de medo pode levar à sua atualização com estas informações e sua reinterpretação como menos aversiva. Para tanto, ratos wistar foram treinados na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto, reativados na presença de um estímulo apetitivo, o chocolate, e testados em diferentes momentos. Avaliamos diversos parâmetros onde este procedimento poderia levar, ou não, à atualização, como a duração e a quantidade das sessões de reativação, a idade e a aversividade da memória e o papel da reconsolidação neste processo. Nossos resultados mostraram que a memória de medo pode ser atualizada quando informações apetitivas são apresentadas no momento de sua reativação, levando à diminuição de sua aversividade persistentemente. Observamos também que a intensidade da reativação, a idade e a força da memória são fatores importantes para que a atualização ocorra e que a reconsolidação é o processo responsável por este fenômeno. A possibilidade de atualizar uma memória de medo em uma forma menos aversiva é uma estratégia promissora para o tratamento de distúrbios relacionados à memórias traumáticas e contribui para o entendimento da reconsolidação e da maleabilidade da memória.

ABSTRACT

When a consolidated memory is reactivated, it can return to a labile state and undergo reconsolidation. Such procedure can lead to memory updating through the integration of new information into the background of a consolidated memory. Thus, it is possible that reconsolidation provides an opportunity to modify unwanted fear memories. However, it remains to be established whether a fear memory can be updated by changing its emotional valence to a less aversive level. Here, we evaluated if a fear memory can be reinterpreted by the presentation of an appetitive stimulus during its reactivation. Accordingly, wistar rats were trained in contextual fear conditioning (CFC), underwent memory reactivation with the presence of an appetitive stimulus (chocolate) and were tested at different time points. The L-type voltage-gated calcium channels antagonist nimodipine was administered prior to reactivation in order to verify if the memory updating process was mediated by reconsolidation. We also verified the influence of memory age, strength and the number of reactivation sessions and its length upon memory update. Re-exposing animals to CFC context in the presence of the appetitive stimulus rendered the suppression of fear response with no recovery over time. Such effect was prevented by the injection of nimodipine, suggesting that the memory updating was mediated by reconsolidation. Memory age, strength and reactivation conditions are important variables for memory update occurrence. These results show that fear memory can be reinterpreted by the presence of an appetitive stimulus during reactivation, leading to significant fear attenuation. Updating an aversive fear memory into a less traumatic form seems to be a promising cognitive approach to treat fear-related disorders.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
1.1. Tipos de memória	9
1.1.1. Declarativa x Não-declarativa	9
1.1.2. Memória de trabalho, de curta duração e de longa duração.	11
1.2. Fases da Memória	12
1.2.1. Consolidação da memória	13
1.2.2. Extinção da memória	14
1.2.3. Reconsolidação da memória	16
1.3. Função fisiológica da Reconsolidação	18
1.5. Distúrbios relacionados a memórias de medo	21
1.6. Reconsolidação como alvo terapêutico	23
2. Objetivos	25
3. Artigo científico	28
Introduction	31
Results	33
Discussion	38
Methods and Materials	41
References	44
Figures and Legends	46
4. Resultados complementares	52
5. Discussão	55
6. Símula dos achados e Conclusões	63
7. Referências bibliográficas	66
8. Anexo I	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Extinção da memória.....	15
Figura 1.2. As fases da memória..	18
Figura 1.3. Reconsolidação como mecanismo de fortalecimento da memória.....	19
Figura 1.4. Reconsolidação como mecanismo de atualização da memória.....	20
Figura 1.5. Competição entre a atualização da memória e novo aprendizado.....	21
Artigo científico	
Figura 3.1.....	47
Figura 3.2.....	48
Figura 3.3.....	49
Figura 3.4.....	50
Figura 3.5.....	51
Figura 4.1. Resultado complementar 1.....	53
Figura 4.2. Resultado complementar 2.....	54

1. INTRODUÇÃO

A capacidade dos animais de modificar o seu comportamento através do aprendizado é uma de suas mais importantes e notáveis habilidades. Não é um exagero dizer que as memórias definem quem somos – nossas idéias e conceitos sobre qualquer tipo de questão e a maneira pela qual conduzimos nossas vidas são moldadas pelo que aprendemos e pelo que recordamos.

Por definição, aprendizado é o processo pelo qual o indivíduo adquire conhecimentos, e memória é o processo que codifica, armazena e posteriormente expressa as informações aprendidas (Kandel et al., 2000). Estas fases são chamadas de aquisição, consolidação e evocação, respectivamente (Quillfeldt, 1994). Muitos comportamentos são aprendidos, alguns extremamente complexos.

A aquisição de informações aversivas a partir de uma experiência e a retenção destas na memória é essencial para a sobrevivência. Ela possibilita ao animal reconhecer situações potencialmente perigosas e adaptar seu comportamento de forma a evitar danos (Kandel et al., 2000; Quevedo et al., 2003). Graças à memórias aversivas, sabemos que devemos olhar para os dois lados antes de atravessar uma rua e que uma tomada elétrica pode ser perigosa. Repetir ou variar uma resposta comportamental a partir de experiências prévias é, portanto, extremamente adaptativo pois permite ao indivíduo interagir com o ambiente de maneira cada vez mais eficiente e segura. Organismos filogeneticamente mais antigos que os mamíferos, como os invertebrados, também apresentam memória (Kandel et al., 2000) e a conservação desta capacidade ao longo da evolução ilustra a sua importância.

1.1 Tipos de memória

Pesquisas em humanos e em modelos animais tem avançado significativamente no entendimento da neurobiologia da memória. Sabe-se que não existe um mecanismo único e universal para a memória, e isto reflete o fato de existirem diferentes tipos de memória, que se prestam a diferentes funções e exigem a atividade de diferentes estruturas encefálicas (Medina et al., 2008; Squire et al., 2008). A memória pode ser classificada quanto à natureza de informação que codifica e quanto ao tempo que persiste.

1.1.1 Declarativa x Não-declarativa

Quanto à natureza da informação codificada, a principal distinção dentre os tipos de memória se dá entre memórias declarativas e não-declarativas, também chamadas de explícitas e implícitas, reespectivamente.

As memórias declarativas, ou explícitas, referem-se a memórias de fatos e eventos e englobam todas aquelas que podem ser evocadas conscientemente e, no caso dos humanos, verbalizadas (por isso a alcunha de declarativa – como só os humanos são capazes de verbalizar, mas não só eles de gerar este tipo de memória, o termo memória explícita é utilizado quando se refere a outras espécies). As memórias declarativas são ainda subdivididas em memórias semânticas e episódicas. As semânticas são as memórias de conceitos e fatos não relacionados com uma experiência, por exemplo: Berlim é a capital da Alemanha. Já as memórias episódicas são mais complexas e codificam informações de eventos que o indivíduo vivenciou, associando diversas

informações como localização no tempo e espaço, sequência temporal de eventos, emoções envolvidas, etc. As memórias declarativas tem a característica de serem facilmente formadas, mas também facilmente esquecidas (Squire et al., 2004; Tulving, 1987).

A capacidade de formar e evocar memórias declarativas necessita do funcionamento de certas estruturas encefálicas distintas, as principais sendo o neocórtex, o diencéfalo e o lobo temporal medial, principalmente a formação hipocampal (Moscovitch et al., 2005). Pacientes que sofreram danos no hipocampo e/ou regiões próximas passam a apresentar a perda seletiva de memórias declarativas já formadas (amnésia retrógrada) e incapacidade de formar novas memórias declarativas (amnésia anterógrada) (Squire & Alvarez, 1995). A amígdala também tem grande papel sobre as memórias declarativas ao modulá-las de acordo com informações emocionais (LeDoux, 2000).

O termo memória não-declarativa, ou implícita, refere-se a uma ampla gama de memórias que compartilham a característica comum de não poderem ser evocadas de maneira consciente. Um exemplo são as memórias motoras, como a de praticar um esporte como o tênis. Um praticante de tênis pode tentar verbalizar como executa o movimento da raquete ao executar um golpe, mas sua explicação estará longe da complexidade que o movimento possui. Quando estiver realizando o movimento em uma partida, porém, a memória será evocada inconscientemente. Outros tipos de memórias não-declarativas incluem a habituação – que é a diminuição da resposta a um estímulo após este ser apresentado repetidamente, sensitização – que é uma resposta aumentada a um estímulo após este ser apresentado repetidamente, e o priming – onde

uma dica não relacionada com uma tarefa induz o indivíduo a apresentar uma resposta específica. Certas memórias não declarativas, especialmente as motoras, diferem das declarativas também por serem formadas lentamente, mas serem resistentes ao esquecimento. (Tulving, 1987). Dentre as estruturas envolvidas na formação e evocação de memórias não-declarativas, destacam-se os núcleos da base e o cerebelo (Squire, 2009).

1.1.2. Memória de trabalho, de curta duração e de longa duração.

Além da classificação da memória quanto ao tipo de informação que ela codifica, ela também é classificada quanto ao tempo que persiste . Os indivíduos estão constantemente recebendo e processando informações sensoriais, mas apenas uma parcela delas será armazenada na forma de uma memória e disponível para posterior evocação. A força da memória e o tempo que ela vai persistir é muito variável, dependendo de sua importância e de fatores como o nível de atenção e as emoções envolvidas no momento de sua aquisição (Quevedo et al., 2003). O fato de que nem todas as memórias persistem com o passar do tempo, isto é, são esquecidas, é importante e benéfico. O esquecimento de informações não essenciais ou que deixaram de ser relevantes permite ao indivíduo realizar generalizações e abstrações, além de evitar uma sobrecarga nos sistemas relacionados à memória.

O tipo mais breve de memória, chamado de memória de trabalho, tem curtíssima duração, de segundos a poucos minutos. O exemplo clássico de memória de trabalho é quando memorizamos um número de telefone e o esquecemos logo após discá-lo. Ao contrário dos outros tipos, a memória de trabalho não cria um traço duradouro no

encéfalo. Para se manter disponível, este tipo de memória necessita de esforço ativo do indivíduo para se manter na consciência pela atividade de áreas do córtex pré-frontal (Curtis & D'Esposito, 2003).

As memórias de longa duração persistem por dias, anos ou mesmo décadas, dependendo de diversos fatores como a sua importância e valência emocional. As memórias de curta duração perduram por minutos até cerca de 6 horas, mantendo as informações disponíveis para serem evocadas enquanto uma memória de longa duração ainda não foi formada. Assunto já bastante debatido, hoje acredita-se que a memória de curta e de longa duração são eventos separados, que se utilizam de diferentes mecanismos (Izquierdo et al., 1998; Izquierdo et al., 2002; McGaugh, 2000).

1.2. Fases da Memória

Há séculos, tenta-se entender quais modificações ocorrem no encéfalo durante o aprendizado, onde as memórias são armazenadas e uma vez armazenadas, como são retidas e posteriormente evocadas.

A memória não é um fenômeno instantâneo, mas um processo que ocorre no tempo, sendo dividida em diferentes fases relacionadas à formação e à evocação do traço de memória (Quillfeldt, 1994). Conhecendo-se e identificando-se quando cada fase ocorre, pode-se estudá-las separadamente, com infusão de fármacos ou manipulações comportamentais em momentos específicos, por exemplo (Izquierdo & McGaugh, 2000).

Inicialmente, enquanto o indivíduo está passando por uma experiência e recebendo informações sensoriais (isto é, passando por um aprendizado), se dá a fase da aquisição da memória. Na aquisição ocorre o processamento inicial das informações, onde os estímulos sensoriais são interpretados, compreendidos e transformados em representações internas (Paller & Wagner, 2002). Seguido à aquisição, se dá a fase da consolidação da memória, onde as informações adquiridas são progressivamente internalizadas e estabilizadas através de processos moleculares e celulares. O processo da consolidação leva ao armazenamento das informações. O termo *consolidação* foi proposto em 1900 (Müller & Pilzecker, 1900; McGaugh, 2000) e tem sido bastante utilizado desde então.

Uma memória consolidada pode, então, ser expressa na chamada fase da evocação da memória. A única forma de se verificar que uma memória existe é quando a sua evocação ocorre (James, 1890). Em modelos animais, a evocação da memória é verificada pela quantificação de comportamentos específicos, como a supressão de um comportamento inato ou pela exibição de um comportamento não-natural, que não ocorreriam na ausência da memória (Quillfeldt, 1994).

1.2.1. Consolidação da memória

Após um aprendizado, a memória não se estabelece de maneira instantânea. Estudos clínicos com pacientes amnésicos do século XIX levaram Ribot (1882) a formular a Lei de Ribot (*Loi de Regression*), que prediz que após um trauma, memórias de eventos recentes são mais acometidas pelo esquecimento do que memórias de eventos remotos. Müller e Pilzecker (1900), observaram que memórias recentemente

aprendidas eram prejudicadas por um novo aprendizado induzido logo após o primeiro. A partir deste achado, eles sugeriram que após um aprendizado ocorre a formação de um traço de memória que inicialmente é frágil e lábil, levando tempo para se formar e se tornar estável. Este processo de formação e estabilização do traço de memória foi chamado de consolidação.

Em estudos com modelos animais, foram aplicados tratamentos amnésicos (e.g. certas drogas e choques eletroconvulsivos) em diferentes intervalos pós-treino. Foi observado um gradiente temporal quanto a eficácia destes tratamentos – quanto menor o intervalo entre o treinamento e o tratamento, maior o efeito amnésico, e tratamentos após intervalos suficientemente grandes não afetavam a memória (McGaugh, 2000). Estes trabalhos foram tomados como evidência de que, após uma memória ser consolidada, ela se tornaria fixa e imutável. Esta hipótese, a da consolidação da memória, foi um paradigma que norteou por muitos anos os estudos da neurobiologia da memória.

1.2.2. Extinção da memória

Existe um processo, chamado de extinção, que pode ser provocado pela evocação da memória. A extinção da memória foi inicialmente descrita por Pavlov (1927). Ele relatou o condicionamento pavloviano, ou clássico, onde se parecia um estímulo neutro (chamado de estímulo condicionado), com um estímulo que produz uma resposta comportamental (chamado de estímulo incondicionado). Com isso, ocorre uma associação entre os estímulos e os animais passam a apresentar a resposta comportamental após a apresentação apenas do estímulo neutro. Ou seja, o animal

desenvolve uma resposta condicionada. Se o estímulo condicionado passar a ser apresentado repetidamente na ausência do incondicionado, porém, uma nova associação será formada com um significado antagônico – de que ambos os estímulos não mais são relacionados – e a resposta condicionada diminui (Figura 1).

A extinção leva à formação de uma nova memória que suprime a memória evocada, porém sem apagá-la ou modificá-la (Bouton et al., 2006; Izquierdo & Myskiw, 2011). É muito utilizada na clínica no tratamento de distúrbios relacionados à memórias de medo, como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) (Cukor et al, 2009; Izquierdo et al., 2008). Porém, como na extinção não há a modificação da memória evocada, pode ocorrer o retorno da expressão da memória original (Figura 1.1). Isto é comum principalmente quando a memória original é muito robusta, como as de medo (Bouton et al, 2012).

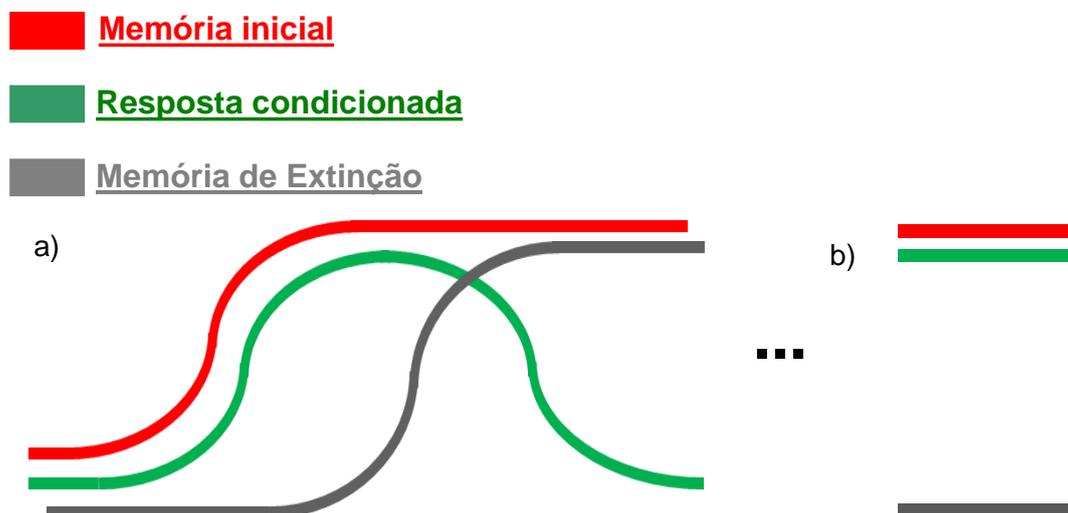


Figura 1.1 - Extinção da memória. A. Após um condicionamento, é formada uma memória que, quando evocada, leva a uma resposta comportamental condicionada. Quando uma memória de extinção é formada, a memória antiga é antagonizada e a resposta condicionada suprimida. B. Em memórias aversivas, com o passar do tempo é comum o enfraquecimento da memória de extinção e o retorno da expressão da resposta condicionada, fenômeno conhecido como recuperação espontânea.

1.2.3. Reconsolidação da memória

A partir de trabalhos das décadas de 60 (Misanin et al., 1968; Schneider and Sherman, 1968) e 70 (DeVietti & Kirkpatrick, 1976; Mactutus et al., 1979), passou a ser questionada a idéia de que uma vez formadas as memórias se tornam fixas e imutáveis. Estes estudos demonstraram que os tratamentos que levavam à amnésia quando aplicados após um treinamento, isto é, afetando a consolidação, também levavam à amnésia quando aplicados após a reativação de memórias já consolidadas, mesmo quando essa reativação era induzida dias após o treino. Ou seja, a memória voltava a um estado lábil quando evocada. Estes dados levaram a uma interpretação alternativa à da hipótese da consolidação, de que independente da idade da memória ela pode voltar a ser suscetível a transformações quando evocada e reativada, um fenômeno posteriormente cunhado de reconsolidação.

Esta visão alternativa dos processos mnemônicos recebeu pouca atenção nas décadas seguintes, devido à força do dogma da consolidação na época. O tema passou a ser alvo de intensa investigação científica após um artigo (Nader et al, 2000) reascender o debate ao demonstrar que após a reativação de uma memória já consolidada, é necessária uma nova rodada de síntese protéica para que esta se mantenha e que, se um inibidor de síntese protéica for administrado neste momento, a memória é perdida. Este importante estudo sugeriu que após o período instável e lábil que ocorre durante a consolidação, a memória passa para um estado inativo onde é insensível a manipulações – quando ela é evocada/reativada, porém, ela é desestabilizada e retorna a um estado ativo e lábil, necessitando de síntese protéica para se reestabilizar.

Nos anos seguintes, inúmeros artigos sobre reconsolidação caracterizaram este processo em nível molecular (Tronson & Taylor, 2007; Alberini, 2005) e demonstraram que a reconsolidação não é apenas uma nova consolidação, mas sim um processo distinto. A consolidação e a reconsolidação compartilham diversos mecanismos similares, como a ativação de MAPK, PKA e CREB (Alberini, 2005), porém existem exceções importantes que diferenciam molecularmente os dois processos (von Herten & Giese, 2005; Barnes P et al., 2012; Lee et al., 2012). Por exemplo, a proteína BDNF é necessária para a consolidação mas não para a reconsolidação, enquanto o fator de transcrição Zif268 é recrutado na reconsolidação mas não na consolidação (Lee et al., 2004). Portanto, a reconsolidação é um processo neurobiológico distinto da consolidação.

A reconsolidação já foi demonstrada em diversas espécies animais e modelos comportamentais de memória (Besnard et al., 2012). Todavia, ela não é um fenômeno onipresente, sendo sua ocorrência restringida por diversos fatores (Nader & Einarsson, 2010). Memórias muito fortes e remotas são particularmente difíceis de serem reconsolidadas. O tempo pelo qual a memória é reativada é também um fator importante, visto que sessões de reativação curtas não induzem a reconsolidação.

De maneira geral, o que determina se a memória vai ser reconsolidada ou não é a ocorrência de sua desestabilização (Finnie & Nader, 2012). A desestabilização é um processo que envolve degradação protéica e a labilização dos circuitos envolvidos com uma memória. Molecularmente, a desestabilização é dependente da ativação dos receptores de NMDA, (Lee et al.), L-VGCCs (Suzuki et al., 2008) e CB1 (Suzuki et al.,

2008) e da via de degradação proteica do sistema ubiquitina-proteossoma (Choi et al, 2010; Kaang & Choi; Lee et al, 2008)

A evocação da memória, portanto, não é um processo passivo, podendo levar à ocorrência de dois fenômenos antagônicos, reconsolidação ou extinção (Izquierdo & Myskiw, 2011). Se a informação evocada é importante, passará pela reconsolidação, onde poderá ser modificada e/ou fortalecida. Caso contrário, uma memória de extinção será formada e a memória original permanecerá inalterada, mas será suprimida. A figura abaixo resume as diferentes fases da memória.

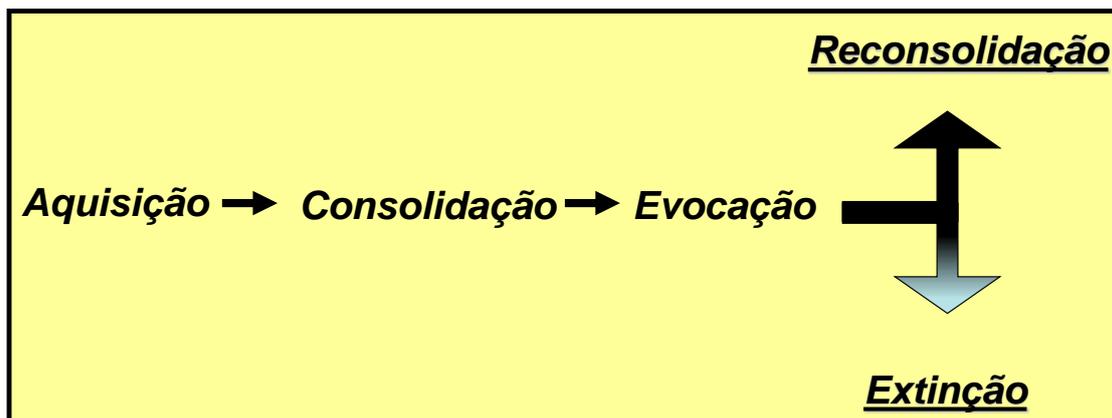


Figura 1.2 - As fases da memória.

1.3. Função fisiológica da Reconsolidação

Qual seria o papel funcional da reconsolidação? A reconsolidação não é apenas uma simples reestabilização automática da memória reativada, mas um processo que oportuniza sua modificação (Lee, 2009). As memórias geralmente são evocadas em circunstâncias onde são apresentadas novas informações, e a capacidade de a memória se atualizar é importante para manter sua relevância e melhor orientar futuras respostas comportamentais. O papel da reconsolidação neste processo foi posto em dúvida pois a

modificação de um comportamento aprendido poderia provir simplesmente de uma nova memória modulando a antiga, sendo mecanismos de consolidação os responsáveis pela atualização comportamental. Utilizando-se dos mecanismos moleculares dissociáveis entre consolidação e reconsolidação, porém, foi evidenciado que a reconsolidação permite a integração de novas informações ao traço de memória e a sua atualização (Lee, 2008).

Existem duas hipóteses principais, não excludentes entre si, sobre como a memória poderia ser modificada pela reconsolidação. A primeira prediz que a reconsolidação faz parte de um longo e vagaroso processo de aprendizado, onde em cada episódio de reconsolidação a memória é fortalecida ou enfraquecida (Dudai & Eisenberg, 2004). Isto é, a reconsolidação permitiria uma alteração quantitativa da memória (Figura 1.3).

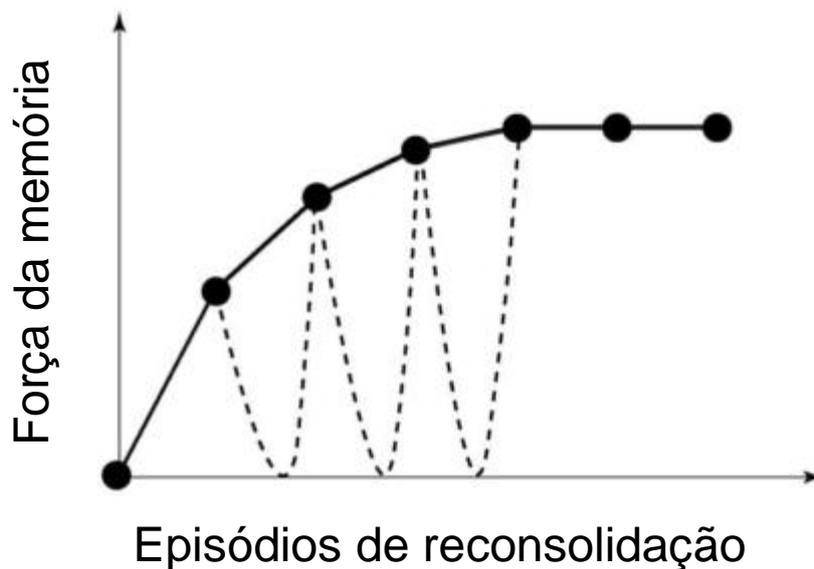


Figura 1.3 - Reconsolidação como um processo que modula a força da memória. Adaptado de Lee, 2009.

Outra hipótese prediz que a reconsolidação permite que novas informações apresentadas durante a reativação sejam integradas ao traço de memória, atualizando-o (Lee, 2009). A hipótese da reconsolidação como mecanismo de atualização (*memory update*) admite que a memória pode ter seu conteúdo modificado de maneira qualitativa (Figura 1.4). Nos últimos anos, importantes trabalhos mostraram que a reconsolidação atua como um mecanismo de atualização do conteúdo da memória (Lee, 2010; Hupbach et al., 2007; Forcato et al, 2010; Jones et al., 2012).

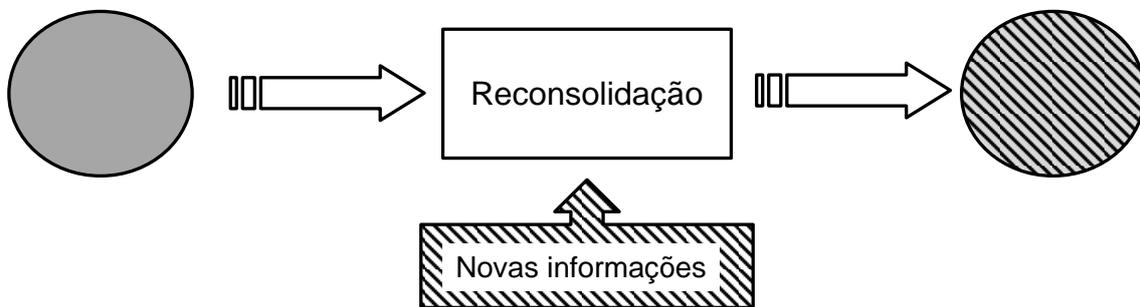


Figura 1.4 - Reconsolidação como um mecanismo de atualização do conteúdo da memória com novas informações.

Em certas situações, pode ser vantajoso atualizar uma memória. Em outras, porém, pode ser melhor formar uma nova. Deve existir, portanto, uma competição entre a atualização da memória antiga e a formação de uma nova. Foi proposto (Besnard, 2012) que um fator importante para esta decisão é a similaridade entre o conteúdo da memória armazenada e a situação vivenciada. Se ambos compartilharem várias características em comum, a memória será reativada e atualizada com novas informações. Caso haja pouca similaridade, a memória antiga não será labilizada e uma nova memória será formada (Figura 1.5). Além disso, sendo um fenômeno decorrente da reconsolidação, a atualização da memória é restringida em memórias muito fortes e antigas, cuja labilização dificilmente ocorre. Quando estas memórias são evocadas,

portanto, elas não se tornam lâbeis e as novas informações são armazenadas separadamente (Figura 1.5).

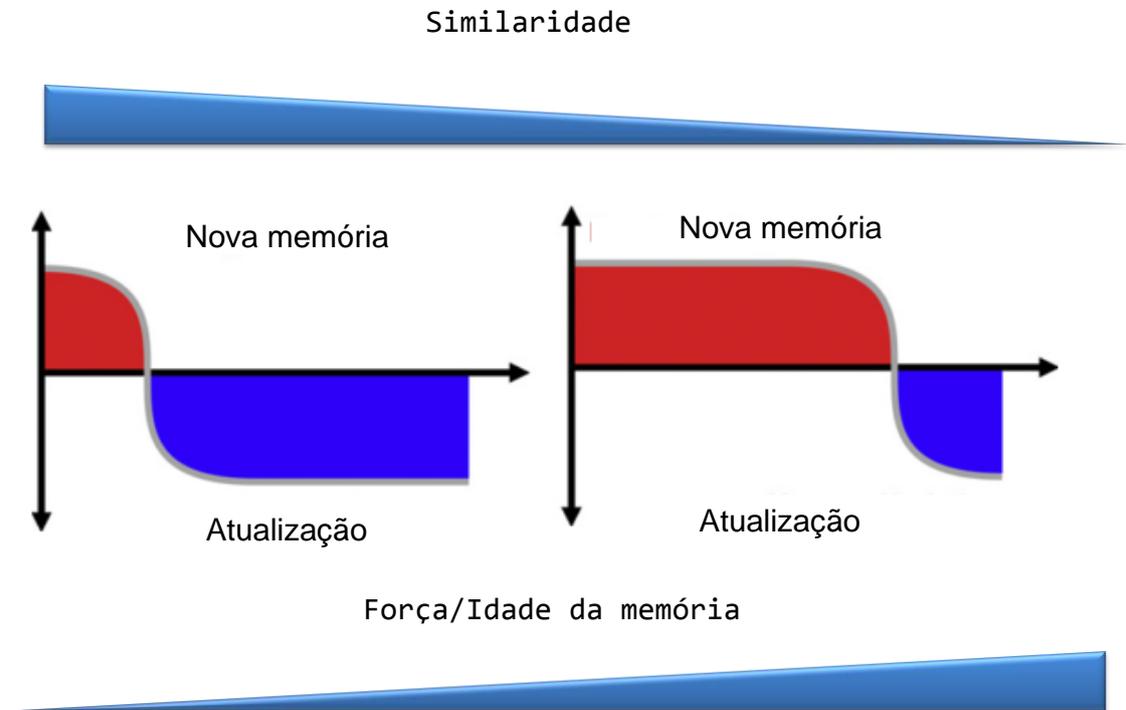


Figura 1.5 - Memórias antigas, muito fortes ou pouco similares com a experiência vivenciada tendem a não ser atualizadas e a formação de uma nova memória é favorecida. Adaptado de Besnard, 2012.

1.5. Distúrbios relacionados a memórias de medo

O aprendizado pode levar a comportamentos disfuncionais e, em casos extremos, quadros patológicos. Apesar da importância dos aprendizados aversivos para que o indivíduo evite situações potencialmente perigosas, nem todas as memórias de medo são benéficas. Eventos traumáticos como assaltos, acidentes severos e desastres levam à formação de memórias de medo extremamente robustas o que pode, por consequência, levar ao desenvolvimento de patologias relacionadas à estas memórias de medo, como o TEPT e distúrbios do pânico (Ehlers & Clark, 2000). Apesar de ser comum o sofrimento psicológico e a exibição de sintomas de TEPT após um trauma, a

maioria das pessoas se recupera com o passar do tempo. Em uma parcela da população, porém, este sofrimento persiste de maneira intensa, causando grandes prejuízos à vida destes indivíduos (Yehuda, 2002).

Os sintomas do TEPT incluem hipervigilância, evocação persistente e indesejada do episódio traumático, embotamento emocional e evitação de estímulos inócuos que para o paciente trazem lembranças do evento desencadeador (Ehlers & Clark, 2000). Estão correlacionados com o TEPT o aumento da incidência de depressão maior, abuso de substâncias, hipertensão, asma e dor crônica (Yehuda, 2002). Em pesquisas realizadas nos E.U.A. na década de 90 (Kessler et al., 1995; Breslau et al., 1991; Resnick et al., 1993; Breslau et al., 1997) foi demonstrado que 5 a 6 % dos homens e 10 a 14 % das mulheres sofreram de TEPT em algum momento de suas vidas, fazendo desta patologia o quarto distúrbio psiquiátrico mais prevalente e evidenciando a importância do desenvolvimento de melhores tratamentos para os transtornos relacionados com memórias de medo.

O tratamento mais prevalente para distúrbios relacionados à memórias de medo, como o TEPT, é o da terapia de exposição baseadas na extinção da memória (Hermans et al., 2005), onde se induz a exposição repetida do indivíduo à estímulos neutros relacionados ao trauma na ausência de estímulos aversivos. Este procedimento leva à formação de uma memória de extinção que possui um significado antagônico ao da memória traumática original, isto é, de que os estímulos relacionados ao trauma e que desencadeavam respostas de medo não mais predizem os desfechos aversivos (Bouton et al., 2006) . Apesar de a extinção ser efetiva na diminuição das respostas de medo em

um curto prazo, são comuns recaídas com a volta do medo com o passar do tempo (Bouton, 1993; Quirk, 2002), o que limita a sua eficácia clínica.

1.6. Reconsolidação como alvo terapêutico

A eficiência limitada da extinção em reduzir respostas de medo a longo prazo levou a comunidade científica a ver na reconsolidação um potencial alvo terapêutico (Pitman, 2011). Ao contrário da extinção, onde é criada uma nova memória cuja expressão não persiste no tempo, atuando-se sobre reconsolidação torna possível interferir na própria memória de medo, inibindo-a permanentemente.

Visto que após a reativação a memória é desestabilizada, necessitando da reconsolidação para se re-estabilizar e persistir, tratamentos farmacológicos que bloqueiam a reconsolidação previnem que a memória se re-estabilize e levam à amnésia. Trabalhos com modelos animais fornecem uma extensa lista de compostos que bloqueiam a reconsolidação e prejudicam ou abolem a evocação posterior da memória (Besnard et al., 2012). O uso destas drogas que bloqueiam a reconsolidação e levam à amnésia seletiva para a memória reativada tornam hipoteticamente possível apagar memórias traumáticas em humanos.

Muitos dos compostos que bloqueiam a reconsolidação e produzem amnésia infelizmente exigem procedimentos invasivos para sua administração e/ou apresentam toxicidade ou outros efeitos colaterais que não permitem com que sejam utilizados na clínica. Desta forma, procedimentos que enfraqueçam o impacto emocional de memórias traumáticas sem o uso de fármacos seriam extremamente úteis.

Uma vez que (1) a reconsolidação permite com que novas informações sejam incorporadas a uma memória já estabelecida pelo processo da atualização e (2) este fenômeno leva a uma modificação permanente do traço de memória, neste trabalho procuramos atualizar uma memória de medo de forma a torná-la menos aversiva. Para tanto, reativamos uma memória de medo concomitantemente com um estímulo apetitivo, o chocolate, com o intuito de atualizar a memória com esta informação aprasível. Verificamos que este procedimento levou a uma ressignificação da memória, tornando-a menos aversiva persistentemente. Acreditamos que a atualização de memórias aversivas com informações apetitivas tem potencial aplicabilidade no tratamento de distúrbios relacionados às memórias de medo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar se uma memória de medo pode ser atualizada para uma forma menos aversiva após ser reativada e reconsolidada na presença de estímulos apetitivos fornecidos por um alimento palatável (chocolate ao leite da marca Garoto[®]).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Verificar se a reativação de uma memória aversiva de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) por três minutos, concomitante à apresentação do estímulo apetitivo (chocolate), leva à redução da expressão do medo durante a reativação e se esta redução persiste em um teste conduzido na ausência do estímulo apetitivo;

2.2.2. Verificar se três reativações (três minutos cada) de uma memória de CAC, concomitantes à apresentação do estímulo apetitivo, levam à redução da expressão do medo durante as reativações e se esta redução persiste em um teste conduzido na ausência do estímulo apetitivo;

2.2.3. Verificar se a redução da expressão do medo, após três reativações da memória de CAC por três minutos na presença do estímulo apetitivo, é gênero-específica;

2.2.4. Verificar se a reativação de uma memória de CAC por nove minutos, concomitante à apresentação do estímulo apetitivo, leva à redução da expressão do medo durante a reativação e se esta redução persiste em um teste conduzido na ausência do estímulo apetitivo;

2.2.5. Verificar se a redução da expressão do medo observada na sessão de teste persiste com o passar do tempo e é observada em um segundo teste realizado 20 dias após o primeiro;

2.2.6. Verificar se três exposições de três minutos a um contexto novo e distinto do contexto do CAC, concomitantes à apresentação do estímulo apetitivo, levam à redução da expressão do medo durante as exposições e em um teste conduzido no contexto do CAC e na ausência do estímulo apetitivo;

2.2.7. Verificar a influência na expressão do medo de uma memória de CAC, durante as sessões de reativação e teste, do tratamento com a droga Nimodipina administrada previamente a três reativações de três minutos concomitantes à apresentação do estímulo apetitivo;

2.2.8. Verificar se em uma memória de CAC antiga, a expressão de medo é reduzida quando conduzidas, 30 dias após o treino, três reativações de três minutos concomitantes à apresentação do estímulo apetitivo.

2.2.9. Verificar se em uma memória de CAC mais aversiva, induzida por um treinamento com choque mais forte (de 0,5 mA para 0,7 mA), a expressão de medo é

reduzida nas reativações e teste quando utilizado o protocolo de três reativações de três minutos concomitantes à apresentação do estímulo apetitivo;

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo foi redigido no formato da revista Learning & Memory (Anexo I) e submetido em dezembro de 2012 (comprovante no Anexo 1).

Title: Chocolate vs. fear: appetitive stimulus during memory reactivation reduces fear expression

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

¹Psychobiology and Neurocomputation Lab

²Neurosciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³The authors have equally contributed to this work.

*Corresponding authors

Address: Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (Psychobiology and Neurocomputation Lab), Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Telephone Number: +55 (51) 3308-7604.

E-mail address: quillfe@ufrgs.br or lucas_alvares@yahoo.com.

Keywords: PTSD; Reconsolidation; Updating; Fear conditioning; Nimodipine; Rats.

Abstract number of words: 250

Article body number of words: 2767

Figures: 5

Tables: 0

Supplemental information: 0

Abstract

When a consolidated memory is reactivated, it can return to a labile state and undergo reconsolidation. Such procedure can lead to memory updating through the integration of new information into the background of a consolidated memory. Thus, it is possible that reconsolidation provides an opportunity to modify unwanted fear memories. However, it remains to be established whether a fear memory can be updated by changing its emotional valence to a less aversive level. Here, we evaluated if a fear memory can be reinterpreted by the presentation of an appetitive stimulus during its reactivation. Accordingly, wistar rats were trained in contextual fear conditioning (CFC), underwent memory reactivation with the presence of an appetitive stimulus (chocolate) and were tested at different time points. The L-type voltage-gated calcium channels antagonist nimodipine was administered prior to reactivation in order to verify if the memory updating process was mediated by reconsolidation. Re-exposing animals to CFC context in the presence of the appetitive stimulus rendered the suppression of fear response with no recovery over time. Such effect was prevented by the injection of nimodipine, suggesting that the memory updating was mediated by reconsolidation. These results show that fear memory can be reinterpreted by the presence of an appetitive stimulus during reactivation, leading to significant fear attenuation. Updating an aversive fear memory into a less traumatic form seems to be a promising cognitive approach to treat fear-related disorders.

Introduction

Following retrieval, an already established memory might undergo a labile state, requiring to be reconsolidated in order to persist (Nader et al. 2000). Reconsolidation is a widespread phenomenon and has been reported in a variety of memory tasks and species (Alberini 2005; Nader and Einarsson 2010), indicating that it is a fundamental memory process. Nonetheless, reconsolidation is not ubiquitous since it is constrained by several factors (Nader and Einarsson 2010), such as memory age (Milekic and Alberini 2002; Suzuki et al. 2004; Frankland et al. 2006; Winters et al. 2009), learning strength (Suzuki et al. 2004; Wang et al. 2009; Winters et al. 2009) and reactivation length (Suzuki et al. 2004).

The functional role of reconsolidation goes beyond a simple restabilization of the retrieved memory. It permits memory updating, maintaining its predictive and adaptive relevance (Lee 2009; Dudai 2012; Finnie and Nader 2012). Thus, reconsolidation allows for the integration of new information into the background of the original established memory (Hupbach et al. 2007; Forcato et al. 2010; Jones et al. 2012). On real life situations, the capacity to dynamically update memory seems to be fundamental for individual survival.

Treatments for anxiety disorders such as posttraumatic stress disorder (PTSD) aim to hinder aversive responses that are expressed in the presence of trauma-related cues (Cukor et al. 2009). Therapies based on extinction involve the exposure to fear-related cues without any real threat in order to overcome fear

responses. However, extinguished responses are often recovered over time, a change in context or presentation of the unconditioned stimulus, supporting the idea that extinction does not erase the memory trace, but is a new learning that inhibits its expression (Rescorla and Heth 1975; Archbold et al. 2010; Bouton et al. 2012).

On the other hand, memory updating through reconsolidation may disrupt fear expression permanently, since it allows the transformation of the original memory trace. That is, reconsolidation may allow the updating of an emotional memory by changing its fear component, turning it weaker. Changing a highly aversive fear memory into a milder, less traumatic form of memory would be a promising approach to treat fear-related disorders.

In this study, we investigated if the fear component of a contextual fear conditioning memory can be updated in order to become less aversive through reconsolidation. We performed a behavioral design in which a fear memory in rats is reactivated and reinterpreted by adding pleasant information in the conditioned context, predicting that the fear expression would be hindered by changing the memory emotional valence. We found that presenting an appetitive stimulus during reactivation results in a robust and long lasting decrease of fear expression.

Results

Repeated reactivations with concomitant appetitive stimulus undergo fear memory attenuation

It has been suggested that reconsolidation allows memory updating by the integration of new information into the background of a previously stored memory. Here, we asked if fear memory updating can modify its emotional valence, turning it less aversive.

In order to induce reconsolidation, rats were fear conditioned and, later, memory was reactivated for 3 min. Chocolate pieces were placed into the training context during reactivation, except for the control group (Figure 1.A). Both groups were previously habituated with chocolate in their home cages. Our hypothesis was that the presence of an appetitive stimulus such as chocolate during reactivation would favor fear memory reevaluation, making it less aversive.

During reactivation, rats from the chocolate group showed significantly less freezing than controls (Student's t test, $t_{(18)}=2,23$, $p=0.038$) (Figure 1.A). Hence, the presence of an appetitive stimulus was able to hinder fear expression. If the information of the appetitive stimulus is incorporated into the original contextual fear memory, we would expect that freezing behavior would be hindered in comparison to the control group in a test conducted in the absence of chocolate. However, no difference was found between the groups in the test (Student's t test, $t_{(18)}=0,39$, $p=0.7$) (Figure 1.A).

This result showed that chocolate presented during the reactivation session favored the reduction of fear expression. Nonetheless, when animals were tested in the absence of chocolate, fear expression was indistinguishable from controls.

We then asked if multiple reactivation sessions would turn fear memory updating possible. Accordingly, three reactivations were carried out (Figure 1.B). During all reactivations, the chocolate group animals showed significantly less freezing than controls (1st react.: Student's *t* test, $t_{(17)}=2,53$, $p=0.022$; 2nd react.: Student's *t* test, $t_{(17)}=3,15$, $p=0.006$; 3rd react.: Student's *t* test, $t_{(17)}=2,56$, $p=0.02$) (Figure 1.B).

In the test session, rats from the chocolate group expressed less freezing than controls (Student's *t* test, $t_{(17)}=5.29$, $p=0.034$) (Figure 1.B). A second test was conducted 20 days later, and the chocolate group was still expressing less freezing than the controls (Student's *t* test, $t_{(11)}=2,89$, $p=0.015$) (Figure 1.B). Hence, freezing behavior was hindered even in the absence of chocolate, as observed on tests conducted at both short and long delays, suggesting a permanent change in the memory trace. That is, reactivations in the presence of an appetitive stimulus enabled memory to be changed by updating its emotional content, leading to a less aversive state.

Since the previous experiments were conducted with females, we replicated this experiment with males from the same breeding colony and similar ages in order

to exclude the possibility of a gender-specific phenomenon. Male rats from the chocolate group showed significantly less freezing than controls during the third reactivation (1st react.: Student's *t* test, $t_{(13)}=1,8$, $p=0.095$; 2nd react.: Student's *t* test, $t_{(13)}=1,8$, $p=0.083$; 3rd react.: Student's *t* test, $t_{(13)}=2,96$, $p=0.011$), test (Student's *t* test, $t_{(13)}=3,61$, $p=0.003$) and second test (Student's *t* test, $t_{(13)}=3,75$, $p=0.009$) (Figure 2). Accordingly, the emotional updating induced by this protocol seems not to be gender-specific, since both male and female animals from the chocolate group showed reduced freezing at tests conducted either at short or long delays. Thus, the presence of chocolate during multiple reactivations was able to modify memory content, hindering fear in a long-lasting way.

Single long reactivation session enables memory updating

In previous experiments, fear expression was hindered when memory was reactivated three times in the presence of chocolate. Here, we addressed if changes in memory fear content requires repeated updating events or a single extended event can lead to the same effect. We have employed a single 9 min reactivation session (Figure 3) to induce a supposedly more robust integration of information involving the appetitive stimulus.

During reactivation, rats from the chocolate group showed significantly less freezing than controls in all 3 min blocks (0-3min: Student's *t* test, $t_{(11)}=3,57$, $p=0.004$; 3-6min: Student's *t* test, $t_{(11)}=2,7$, $p=0.019$; 6-9min: Student's *t* test,

$t_{(11)}=2,78$, $p=0.018$) (Figure 3). In the test session, rats that were reactivated in the presence of chocolate continued showing less freezing than controls (Student's t test, $t_{(11)}=3,4$, $p=0.006$), even in the absence of the appetitive stimulus (Figure 3). A second test was conducted 20 days later to evaluate the persistence of the freezing reduction. On the second test, rats from the chocolate group showed less freezing than controls (Student's t test, $t_{(11)}=2,54$, $p=0.027$) (Figure 3) Therefore, memory updating after a single longer reactivation session seems to be equivalent to that obtained with a triple, shorter reactivation protocol.

Memory reactivation is a necessary condition to the updating of its fear content

To investigate if the effects found above are mediated by memory trace modification instead of chocolate consumption *per se*, animals were exposed three times to a novel context in the presence of the appetitive stimulus (Figure 4). We predicted that this protocol would not affect fear memory since it would not be associated with the appetitive stimulus.

There was no difference between groups during reactivations (1st react.: Student's t test, $t_{(11)}=-0,19$, $p=0.87$; 2nd react.: Student's t test, $t_{(11)}=2,1$, $p=0.056$; 3rd react.: Student's t test, $t_{(11)}=1,12$, $p=0.24$) and test session (Student's t test, $t_{(11)}=0,05$, $p=0.96$) (Figure 4). These results show that memory requires to be reactivated in order to be updated.

Emotional memory updating is mediated by reconsolidation

An established memory reactivation might undergo a labile state, requiring to be reconsolidated in order to persist. This process is mediated by the L-type voltage-gated Ca^{++} -channel and its blockade prevents reconsolidation, without affecting retrieval (Suzuki et al. 2004, 2008). To directly investigate if Emotional memory updating is mediated by the reconsolidation process, we injected the L-type voltage-gated Ca^{++} -channel antagonist nimodipine, or its vehicle, before each one of the three 3 min reactivation sessions (Figure 5).

Two-way ANOVA revealed a significant difference among Chocolate x Control Groups, demonstrating that chocolate was able to hinder freezing response during reactivations. However, there was no effect of Drug (nimodipine x vehicle) or interaction (Group x Drug). (1st react.: Group – $F_{3,35} = 72.62$, $p < 0.001$, Drug – $F_{3,35} = 0,04$, $p = 0.85$, Group x Drug – $F_{3,35} = 0,03$, $p = 0.87$; 2nd react.: Group – $F_{3,35} = 53.29$, $p < 0.001$, Drug – $F_{3,35} = 0,54$, $p = 0.47$, Group x Drug – $F_{3,35} = 0,12$, $p = 0,73$; 3rd react.: Group – $F_{3,35} = 50.1$, $p < 0.001$, Drug – $F_{3,35} = 0,14$, $p = 0,71$, Group x Drug – $F_{3,35} = 0,03$, $p = 0.86$) (Figure 5). Thus, these results show that nimodipine, in this dose, does not affect memory retrieval *per se*, and the presence of chocolate in the reactivation session reduce fear expression.

In the test, there were significant effects of Group, Drug and Interaction (Group – $F_{3,35} = 9.24$, $p = 0.004$, Drug – $F_{3,35} = 11,8$, $p = 0.002$, Group x Drug – $F_{3,35} = 20,66$, $p < 0.001$. Two-way ANOVA). Tukey *post hoc* test indicates that rats

from chocolate group treated with vehicle differed from all other groups ($p < 0,001$) (Figure 5). These results demonstrate that the decrease on fear expression during test, after pairing reactivations with chocolate, seems to be mediated by reconsolidation, since nimodipine treated animals from the chocolate group displayed the same freezing levels as controls. Accordingly, a reactivated fear memory was able to incorporate information of pleasant stimulus through reconsolidation, leading to an emotional updating that changed the original highly aversive memory into a less aversive one.

Discussion

The present study aimed to evaluate the updating of the emotional value of an aversive memory in order to turn it less aversive. We found that memory reactivation under an appetitive stimulus influence underwent memory reconsolidation, allowing the modification of the original fear content information. This procedure induced animals to express less fear when tested in the context previously associated with the footshock. Furthermore, this emotional updating showed no recovery of fear response over time. Thus, it is reasonable to hope that the combination of memory reactivation with appetitive information could permanently weaken a fear memory trace.

When memory was reactivated in the presence of edible chocolate, either once for 9 minutes, or three times for 3 min each session, fear expression was suppressed at test (when the appetitive stimulus was no longer present) (Figure

1.B. and Figure 3). Noteworthy, fear suppression was long-lasting since it has persisted up to a second test conducted 20 days after the first one. However, a single 3 min reactivation was not sufficient to attenuate fear in the test (Figure 1.A). While a single long reactivation was sufficient to update memory, a short reactivation only achieved the same effect when conducted three times. It is possible that a single short reactivation session induces memory updating of little magnitude, leading to a subthreshold behavioral performance on test. When short reactivations occurred multiple times, memory might be gradually updated, allowing the robust behavioral modification that was observed in the test. One could argue that the effects found in the present study are mediated by extinction facilitation rather than memory reconsolidation. However, neither one 9 min reactivation session, nor three 3 min reactivation sessions were sufficient to induce extinction, as we can see in the controls. Moreover, if the chocolate effect was mediated by extinction, we would expect spontaneous recovery 20 days after the first test, which was not the case.

During conditioning, the acquired *context-shock* association led to the consolidation of an emotional memory with negative valence. We speculate that reactivating memory concomitant with an appetitive stimulus results in a *context-chocolate* association that changed memory emotional valence, turning it less aversive. Also, during the reactivation sessions, freezing behavior was decreased when the appetitive stimulus was present. It indicates that the appetitive stimulus must be sufficiently pleasant to overshadow the expression of fear during the reactivation session used to induce memory updating.

Two sets of experiments demonstrated that emotional memory updating was supported by reconsolidation. First, we showed that the presentation of appetitive stimulus in a non-associated context do not affect memory (Figure 4). Thus, chocolate must be presented contingent on the conditioned context in order to make memory modifiable. Second, memory destabilization was prevented by injecting the L-type voltage-gated calcium channel antagonist nimodipine as has been previously reported (Suzuki et al. 2008; Flavell et al. 2011). In our experiments, nimodipine showed no effect during the reactivation session; however, it prevented the outcome of memory fear suppression in the chocolate group at the test (Figure 5). These experiments demonstrate that the observed memory updating was mediated by reconsolidation.

Studies have shown that fear memories can be weakened by blocking the reconsolidation process with different drugs, such as protein synthesis inhibitors (Besnard et al. 2012). Usually, these pharmacological tools cannot be readily administered to humans. Our results have found that fear memory can be attenuated permanently without the use of drugs.

In summary, our findings demonstrate that fear memory may be somewhat “reinterpreted” by the concomitant presence of an appetitive stimulus – chocolate, in this case - during the retrieval / reactivation session. This procedure seems to promote a reevaluation of the contextual fear memory in order to turn it into a less threatening one. Accordingly, the observed behavioral outcome was a robust and persistent fear attenuation. The ability to shape memory emotional content through reconsolidation represent a promising

avenue to the putative treatment of severe anxiety disorders such as PTSD and phobias. Our findings also suggest that possible new therapeutic approaches may be developed that do not depend on drugs use.

Methods and Materials

Subjects

119 adult male and female wistar rats weighing 180 – 230 g from our breeding colony were used in the experiments. Animals were housed in plastic cages, four to five per cage, under 12 hours light/ 12 hours dark cycle at constant temperature of $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, with water and food *ad libitum*. Experiments were conducted on the light cycle.

Procedure

Habituation to appetitive stimulus.

For three consecutive days, all animals were habituated to an appetitive stimulus (chocolate). Habituation consisted on the placement of 5g / animal of chocolate in their home cage. In all habituations, chocolate was fully consumed in less than 4 hours.

Contextual Fear Conditioning.

After 48 hours from the last habituation, rats were randomly assigned to the control or chocolate groups and were trained on Contextual Fear Conditioning (CFC). The CFC chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25.0 ×

25.0-cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). In the conditioning session (training), rats were placed in the chamber for 3 min for habituation and then received two 2-sec 0,5mA footshocks separated by a 30-sec interval. Before returning to their home cages, animals were kept in the conditioning environment for an additional minute.

Memory reactivation and test.

Different experimental designs were employed according to the number of reexposition sessions (one or three), session duration (3 or 9min) or reactivation context (training or novel). Animals reactivated once were reexposed to the training context 5 days after training, while those reactivated three times have been reexposed 3, 5 and 7 days after training, either to the training or a novel context. The novel context does not share any attribute with the training one, as previously described (Alvares et al. 2012).

In the reactivation sessions of all experiments, chocolate pieces were placed on the grid floor of the CFC chamber of the chocolate group but not in the control group. Test sessions of both groups were conducted without chocolate in the CFC chamber.

In the test session (10 days after training), animals returned to the training context in the absence of the appetitive stimulus for 4 minutes. In some experiments, a second test was conducted 20 days after the first one in order to evaluate the persistence of fear expression.

Drug

L-type voltage-gated calcium channels (LVGCCs) antagonist nimodipine (Sigma) was dissolved in sterile isotonic saline with 8% dimethylsulf-oxide to a concentration of 16mg/ml. Nimodipine or its vehicle were injected subcutaneously (s.c.) 30 min before reactivation sessions. The total volume injected of drug or vehicle was 1ml/kg.

Data Analysis

Memory was measured quantifying freezing behavior (absence of movement except for breathing) and expressed as percentage of the total session time (except for the 9 min reexposition experiment, where data was divided in 3 min blocks). Since data conforms to a Kolmogorov-Smirnov normality test ($P>0.05$) and variances are equal, parametric statistical tests such as Student's t test (2 independent groups) or Two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test, were used as indicated.

Acknowledgments

This research was supported by fellowships and grants from CAPES (MEC) – including a PNPd fellowship for LOA, CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), International Foundation for Science (IFS, Stockholm), and FINEP (“Rede Instituto Brasileiro de Neurociências” - IBN-Net, No. 01.06.0842-00) in Brazil. Authors would like to acknowledge Ms. Zelma Regina de Almeida for her helpful assistance in the experiments. The authors declare no conflict of interest.

References

- Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in neurosciences* **28**: 51–6.
- Alvares LDO, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* **22**: 1092–5.
- Archbold GEB, Bouton ME, Nader K. 2010. Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. *The European journal of neuroscience* **31**: 1303–11.
- Besnard A, Caboche J, Laroche S. 2012. Reconsolidation of memory: A decade of debate. *Progress in neurobiology* **99**: 61–80.
- Bouton ME, Winterbauer NE, Todd TP. 2012. Relapse processes after the extinction of instrumental learning: renewal, resurgence, and reacquisition. *Behavioural processes* **90**: 130–41.
- Cukor J, Spitalnick J, Difede J, Rizzo A, Rothbaum BO. 2009. Emerging treatments for PTSD. *Clinical psychology review* **29**: 715–26.
- Dudai Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience* **35**: 227–47.
- Finnie PSB, Nader K. 2012. The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **36**: 1667–707.
- Flavell CR, Barber DJ, Lee JLC. 2011. Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nature communications* **2**: 504.
- Forcato C, Rodríguez MLC, Pedreira ME, Maldonado H. 2010. Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiology of learning and memory* **93**: 77–84.
- Frankland PW, Ding H-K, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ. 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* **13**: 451–7.
- Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L. 2007. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* **14**: 47–53.
- Jones B, Bukoski E, Nadel L, Fellous J-M. 2012. Remaking memories: reconsolidation updates positively motivated spatial memory in rats. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* **19**: 91–8.
- Lee JLC. 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in neurosciences* **32**: 413–20.
- Milekic MH, Alberini CM. 2002. for Protein Synthesis following Memory Reactivation. **36**: 521–525.
- Nader K, Einarsson EO. 2010. Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1191**: 27–41.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**: 722–6.

- Rescorla R a, Heth CD. 1975. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *Journal of experimental psychology Animal behavior processes* **1**: 88–96.
- Suzuki A, Josselyn S a, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 4787–95.
- Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* **15**: 426–33.
- 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**: 905–12.
- Winters BD, Tucci MC, DaCosta-Furtado M. 2009. Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* **16**: 545–53.

Figures and Legends

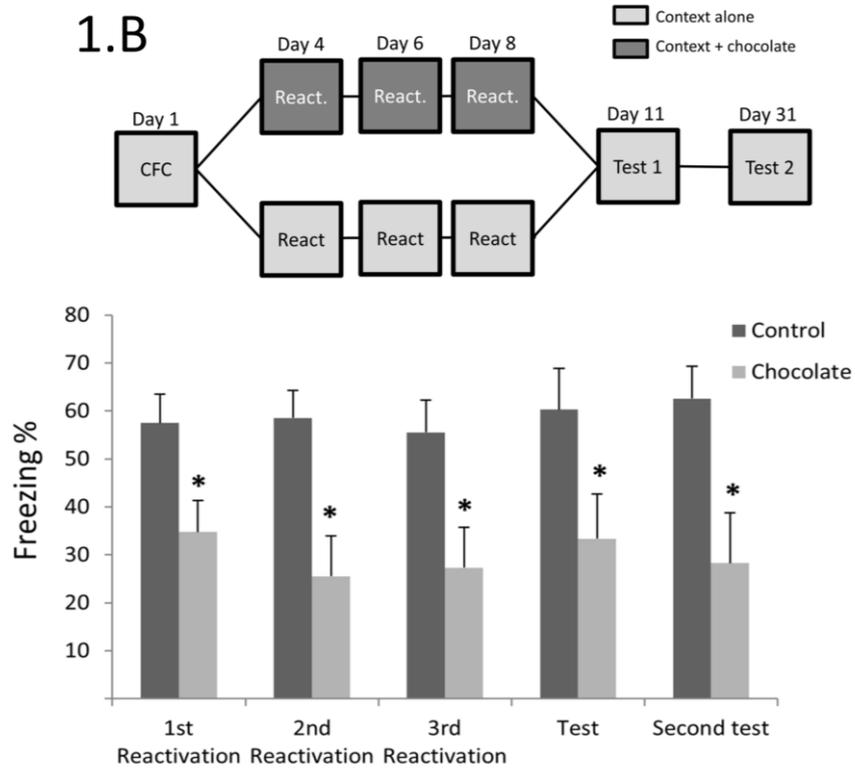
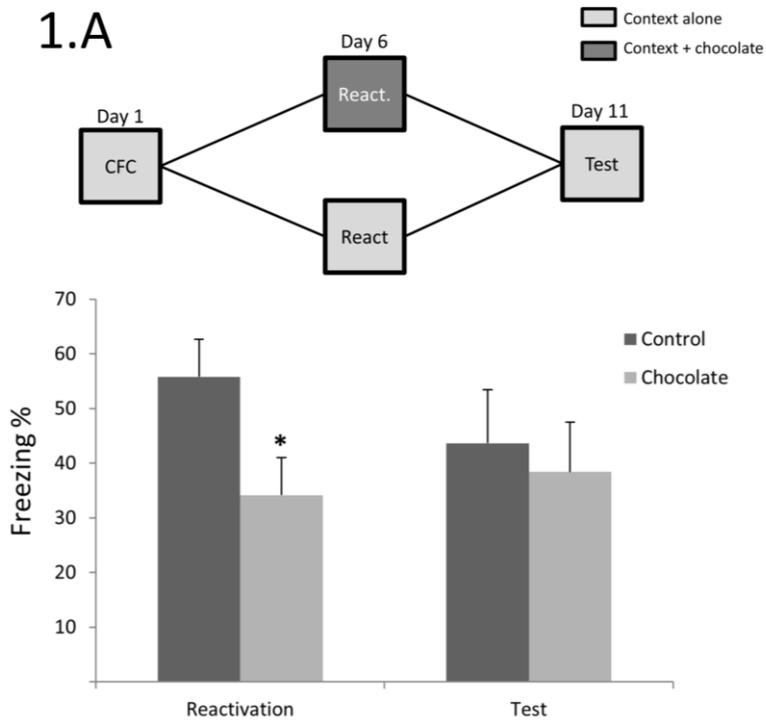


Figure 1. Reactivating memory under an appetitive stimulus influence three times, but not once, hinders fear expression at short and long delays. Graphs show percent of freezing time during reactivations and tests. Chocolate group, but not controls, was reactivated under appetitive stimulus influence. Experimental design is shown in the top of each graph. A. Memory was reactivated once and freezing was hindered on chocolate group during this session. There was no difference between groups at test ($n = 10$ per group). B. Memory was reactivated three times and chocolate group exhibited lower freezing levels than controls. At tests conducted at short and long delays, chocolate group expressed lower freezing levels ($n = 9$ and 10 per group). Data expressed as mean \pm SEM. (*) $P < 0,05$, Student's T test.

FIGURA 3.1 (A e B)

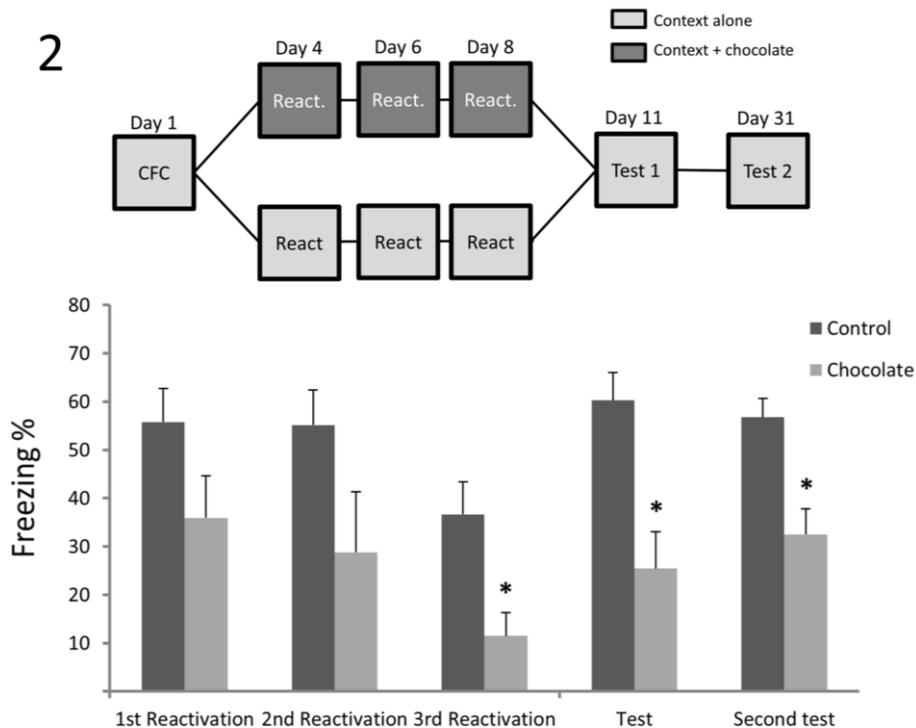


Figure 2. Fear attenuation after memory reactivation under an appetitive stimulus influence is not gender-specific. The experiment depicted on figure 1.B. was replicated with male subjects with similar results ($n = 8$ and 7 per group). Data expressed as mean \pm SEM. (*) $P < 0,05$, Student's T test.

FIGURA 3.2

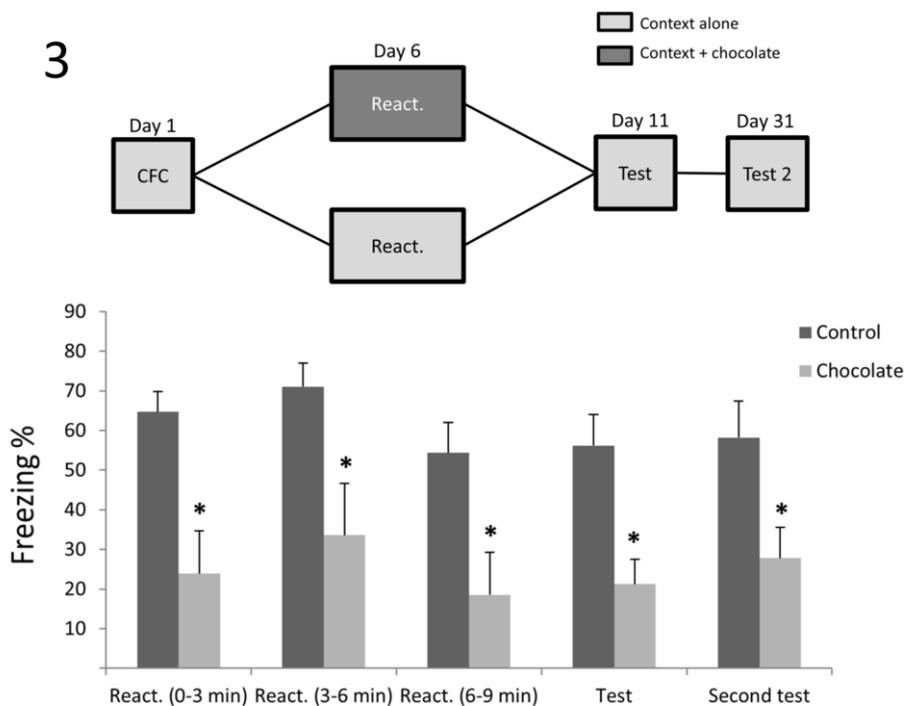


Figure 3. A single extended reactivation under an appetitive stimulus influence hinders fear expression. Graph shows percent of freezing time during reactivation and tests. Chocolate group, but not controls, was reactivated under appetitive stimulus influence. Experimental design is shown in the top. Rats from the chocolate group expressed less freezing behavior than controls at both reactivation and tests sessions ($n = 7$ and 6 per group). Data expressed as mean \pm SEM. (*) $P < 0,05$, Student's T test.

FIGURA 3.3

4

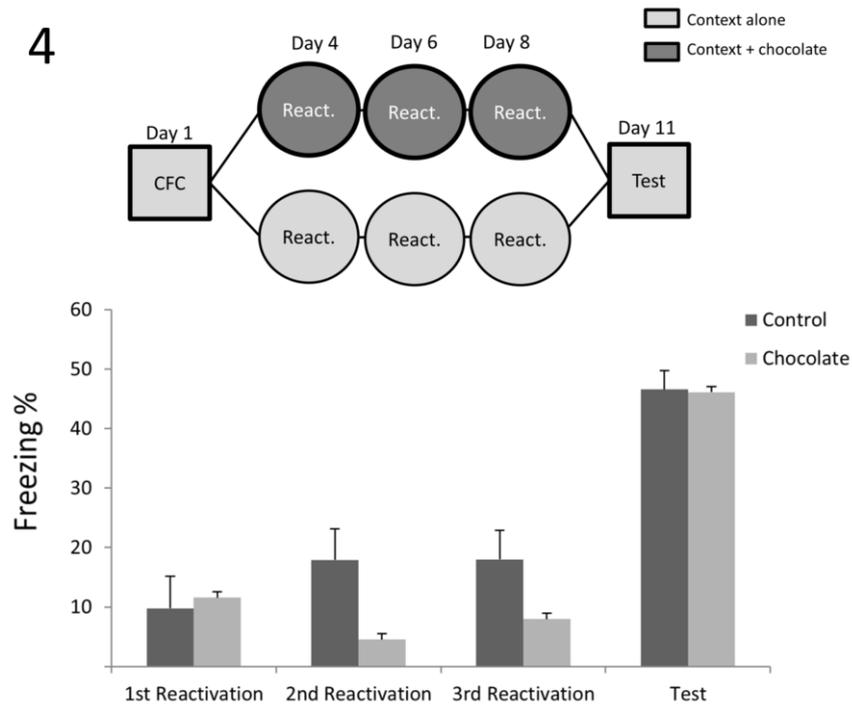


Figure 4. Memory is not updated if the appetitive stimulus is presented in a novel context. Graph shows percent of freezing time during three exposures to a novel context and test. Chocolate group, but not controls, was exposed to the novel context under appetitive stimulus influence. During exposures to a novel context and test, chocolate and control groups showed similar freezing levels ($n = 7$ and 6 per group). Data expressed as mean \pm SEM.

FIGURA 3.4

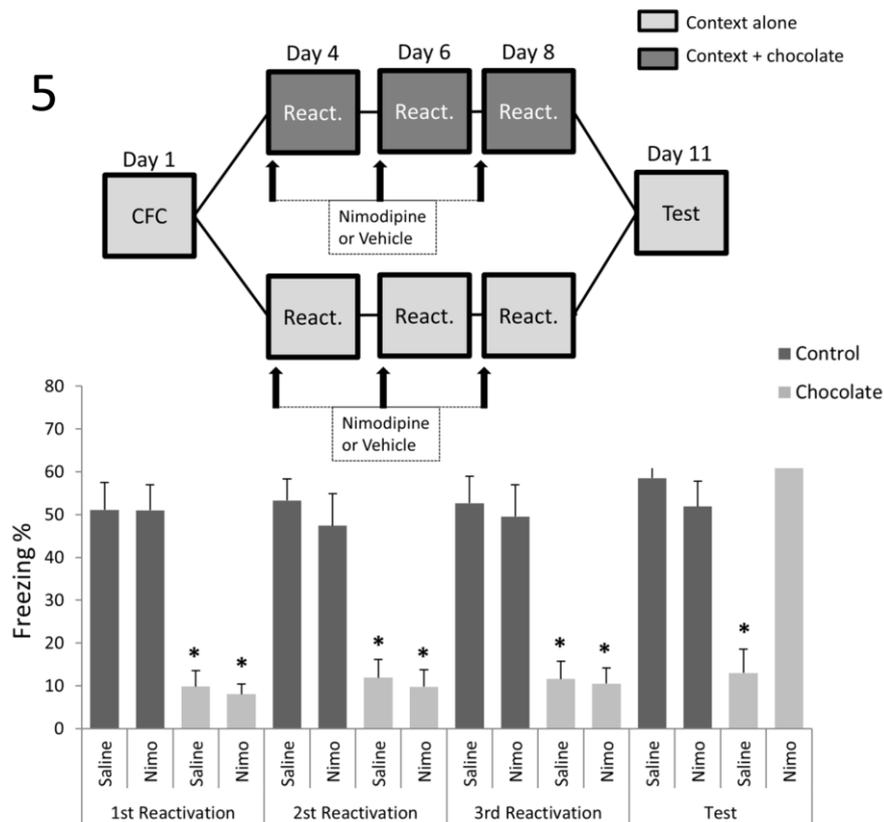


Figure 5. Emotional memory updating is mediated by reconsolidation.

Graph shows percent of freezing time during reactivations and tests. Chocolate groups, but not controls, were reactivated under appetitive stimulus influence. Nimodipine or its vehicle was administered systemically 30 min prior each reactivation session. During reactivations, chocolate groups expressed less freezing than controls. At test, animals from the chocolate group treated with vehicle persisted showing low freezing levels. Nimodipine prevented memory updating ($n = 10, 10, 9$ and 10 per group). Data expressed as mean \pm SEM. (*) $P < 0,05$, Tukey *post hoc* test after Two Way ANOVA.

FIGURA 3.5

4. RESULTADOS COMPLEMENTARES (não incluídos no manuscrito)

A reconsolidação não é um processo que ocorre necessariamente cada vez que uma memória é reativada. Ela é restringida por diferentes variáveis, dentre as quais a força e a idade da memória – em memórias antigas ou muito aversivas a ocorrência da reconsolidação é geralmente mais difícil (Nader & Einarsson, 2010).

A necessidade da reconsolidação para a atualização da valência emocional, descrita neste trabalho, faz com que a idade e a força da memória sejam fatores importantes e merecedores de investigação. Para tanto, realizamos dois experimentos adicionais, que não foram incluídos no artigo científico apresentado nesta dissertação.

Nestes experimentos, adaptamos o protocolo de três reativações concomitantes à presença do estímulo apetitivo, que foi capaz de atualizar a memória. Para investigar a idade da memória, as três reativações foram iniciadas somente 30 dias após o treino. Para investigar a força da memória, aumentamos a intensidade do choque no treinamento de 0,5 mA para 0,7 mA.

4.1 Influência da idade da memória na sua atualização com informações apetitivas.

Quando as sessões de reativação foram conduzidas após 30 dias passados do treinamento, os animais do grupo reativado com chocolate apresentaram apenas uma tendência não-significativa de redução do medo durante a primeira sessão ($p = 0,093$, $n = 8$ por grupo). Na segunda e terceira sessão, os ratos reativados na presença do chocolate apresentaram níveis de congelamento significativamente inferiores aos controles ($p < 0,005$, $n = 8$ por grupo). Portanto, assim como em memórias recentes, a presença do estímulo apetitivo é capaz de suprimir o medo quando uma memória remota é reativada. No teste, porém, as respostas de medo dos grupos Controle e Chocolate não diferiram ($p = 0,262$, $n = 8$ por grupo), mostrando que a memória não foi atualizada.

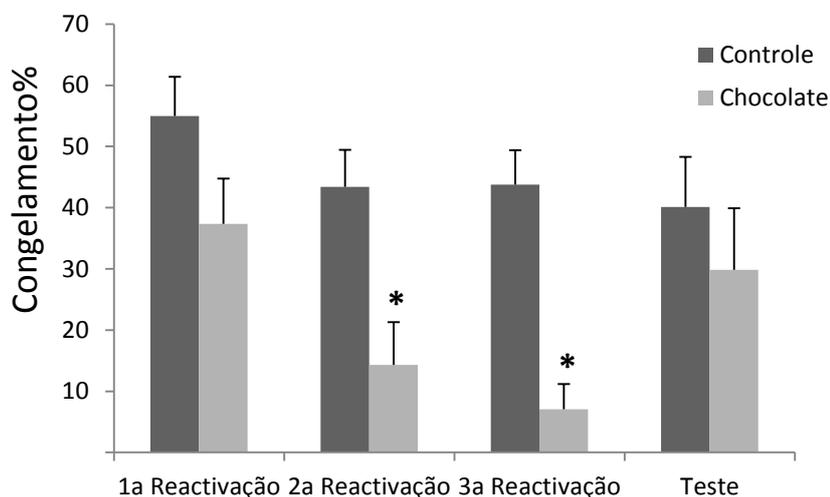


Figura 4.1 - Percentual de congelamento no condicionamento aversivo ao contexto, no protocolo de três reativações remotas de 3 min. Sessões de reativação: *Diferença significativa entre grupos controle e chocolate na segunda e terceira reativação (Teste T de Amostras Independentes, $p < 0,05$, $N = 8$ e 8). Teste: Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Chocolate (Teste T de Amostras Independentes, $p > 0,262$, $N = 8$ e 8).

4.2 Influência da força da memória na sua atualização com informações apetitivas.

Quando os animais foram treinados com um choque mais forte, de 0,7 mA, não houve diferença entre os grupos Controle e Chocolate durante as reativações. Ou seja, nesta memória mais aversiva o estímulo apetitivo não foi capaz de inibir a resposta de medo significativamente. No teste, observamos que a memória não foi atualizada, visto que ambos os grupos apresentaram os mesmos níveis de congelamento.

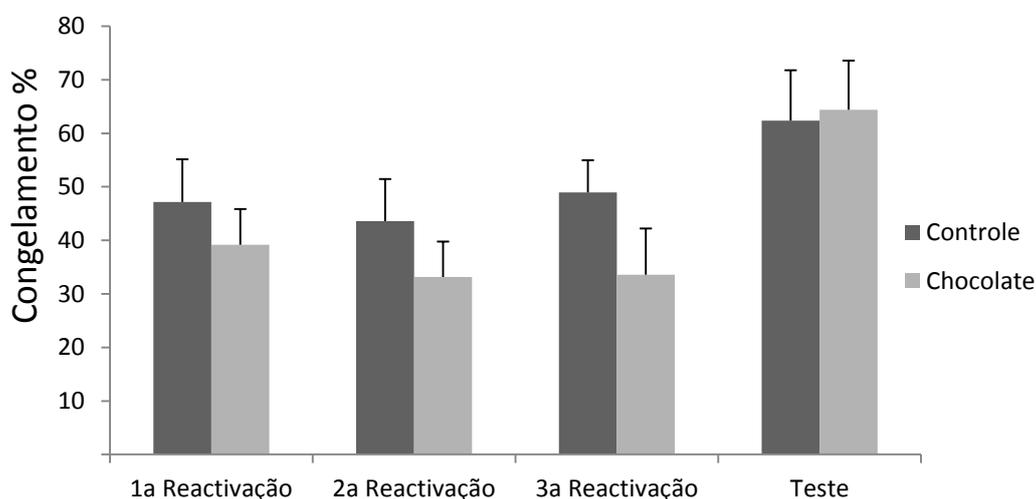


Figura 4.2 - Percentual de congelamento no condicionamento aversivo ao contexto, com treino com choque forte (0,7 mA), no protocolo de três reativações de 3 min. Sessões de reativação: Não houve diferença significativa entre grupos controle e chocolate (Teste T de Amostras Independentes, $p > 0,05$, $N=7$ e 7). Teste: Não houve diferença significativa entre grupos controle e chocolate (Teste T de Amostras Independentes, $p > 0,05$, $N=7$ e 7).

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no artigo científico mostram que a reconsolidação permite que novas informações sejam integradas à uma memória previamente consolidada, atualizando-a, como já relatado na literatura (Lee, 2009). Neste trabalho, mostramos pela primeira vez que o processo de atualização é capaz de modificar a valência emocional de uma memória de medo, tornando-a menos aversiva. Esta atualização do conteúdo emocional da memória levou a uma redução significativa e persistente da expressão do medo.

Durante o treinamento na tarefa de CAC, foi criada uma memória de valência emocional negativa contendo a associação do estímulo condicionado neutro do contexto e o estímulo incondicionado aversivo do choque. A exposição dos animais ao contexto leva à evocação da memória aversiva e a expressão do comportamento de medo. Nós hipotetizamos que a reativação desta memória de medo concomitante à apresentação de um estímulo apetitivo poderia levar à integração destas informações positivas no traço de memória, modificando sua valência emocional e tornando-a menos aversiva. Após este procedimento, supomos que a reexposição ao contexto em um teste, mesmo sem o estímulo apetitivo presente, levaria a uma menor resposta de medo, visto que a memória evocada teria tido o seu conteúdo aversivo enfraquecido.

Para testar esta hipótese, ratos treinados tiveram a memória de CAC reativada pela reexposição ao contexto por 3 minutos, na presença ou não do estímulo apetitivo do chocolate (Figura 3.1.A). Um teste, que consistiu na reexposição ao contexto por 4 minutos na ausência do chocolate, foi realizado para observar se a memória foi atualizada. Durante a sessão de reativação, os animais do grupo que recebeu chocolate

expressaram menores níveis de congelamento que os controles, mostrando que a simples presença do estímulo apetitivo é capaz de inibir a resposta de medo. No teste, porém, ambos os grupos apresentaram respostas de medo similares. Neste protocolo, portanto, a memória não foi atualizada com as informações apetitivas apresentadas durante a reativação, tendo a supressão do medo sido condicionada à presença do chocolate.

Visto a falha do protocolo anterior em promover a atualização da memória, realizamos um protocolo mais intenso onde a memória foi reativada por três vezes na presença do estímulo apetitivo (Figura 3.1.B). Durante as três reativações, assim como no experimento anterior, os animais que foram expostos ao chocolate apresentaram menores respostas de medo que os controles. No teste, os animais do grupo Chocolate continuaram apresentando respostas de medo inferiores aos do grupo Controle, mesmo sem a presença do chocolate. A fim de verificar se esta supressão do medo foi duradoura, realizamos um segundo teste, 20 dias após o primeiro. No segundo teste, os animais do grupo Chocolate também exibiram respostas de medo inferiores aos controles. Portanto, ao submeter os animais a três reativações de três minutos na presença do estímulo apetitivo, houve uma redução na expressão de medo que persistiu mesmo quando esta foi verificada em tempos remotos. A exibição de baixos níveis de congelamento mesmo quando os animais foram testados na ausência do chocolate demonstra que houve uma modificação no traço de memória, cujo conteúdo aversivo foi enfraquecido.

A atualização da memória não ocorreu quando esta passou por uma única reativação, mas ocorreu quando reativada por 3 vezes. Isso levou-nos a indagar se uma

modificação da memória desta natureza, onde há uma alteração em seu conteúdo emocional, sempre necessitaria de diversos *rounds* de reconsolidação para ser bem sucedida. Submetemos animais treinados, então, a uma única reativação longa, de nove minutos (Figure 3.3). Neste experimento, os animais do grupo chocolate exibiram níveis de congelamento inferiores aos controles na reativação, analisando-se tanto o tempo total da reativação como quando dividida em blocos de três minutos. Este comportamento se manteve no teste e no segundo teste realizado 20 dias após. Este resultado demonstra que a atualização emocional não exige uma determinada quantidade mínima de episódios de reconsolidação para ocorrer.

Especulamos que, quando a memória foi reativada uma vez por três minutos na presença do chocolate, houve a integração desta informação apetitiva ao traço de memória, mas esta foi pouco intensa e insuficiente para modificar a memória a ponto de ser possível observar uma diferença comportamental. Quando a mesma sessão de reativação de três minutos foi conduzida múltiplas vezes, pequenos episódios de atualização teriam se somado, levando a uma modificação robusta na memória e, conseqüentemente, no comportamento. A mesma modificação robusta da memória foi observada quando realizada uma única sessão de reativação longa, de nove minutos. Portanto, para a memória ser atualizada a ponto de ter seu conteúdo emocional modificado o suficiente para influenciar no comportamento, ela deve ser reativada em uma intensidade adequada, que permita que as novas informações sejam integradas. Isto pode ocorrer tanto com uma reativação longa, como com múltiplas reativações curtas e espaçadas no tempo.

Os experimentos acima citados foram conduzidos com fêmeas. Para verificar se os resultados encontrados são gênero-específicos, o protocolo de três reativações curtas foi replicado com machos da mesma colônia de criação e idades similares (Figura 3.2). Durante as sessões de reativação, houve apenas uma tendência de diferença entre os grupos na primeira e segunda reativação, mas houve diferença significativa na terceira reativação. No teste, os animais do grupo Chocolate continuaram apresentando menor congelamento que os controles, diferença que persistiu no segundo teste. Desta forma, o mesmo procedimento que provocou a atualização da memória de medo em fêmeas também foi efetivo em machos, descartando um fenômeno específico à fêmeas.

É intuitivo supor que o fenômeno da supressão do medo observado é decorrente do processo de reconsolidação, que permite a atualização da memória, visto que o estímulo apetitivo é apresentado durante a reativação. Porém, existem outras possíveis explicações que precisam ser descartadas antes de realizar esta afirmação. Primeiramente, tanto no protocolo de três reativações curtas como no de uma reativação longa, poderia estar ocorrendo um processo de extinção. A extinção, porém, não ocorre pois (1) não foi observado o típico declínio tempo-dependente na expressão de medo (Foa & Kozak, 1986) - comparando-se os níveis de congelamento de cada grupo, não houve diferença entre sessões de reativação (no protocolo de três reativações curtas) ou entre blocos de três minutos (no protocolo de uma reativação longa); (2) a recuperação espontânea, característica da extinção onde o medo volta a se expressar com intensidade com o passar do tempo (Rescorla, 2004), não foi observada no segundo teste.

Outra explicação alternativa para os resultados encontrados é de que, no momento das reativações concomitantes com o estímulo apetitivo, teria ocorrido a

formação de uma nova memória apetitiva que, durante os testes, atuou antagonizando a memória de medo. Para verificar se a supressão do medo foi devido à consolidação de uma memória ou à atualização emocional da memória de medo original pela reconsolidação, foram realizados dois experimentos (Figuras 3.4 e 3.5).

Primeiramente, repetimos o protocolo de três reativações curtas, mas no lugar das reexposições ao contexto do treino, os animais foram expostos a um novo contexto diferente do original (Figura 3.4), que não reativa a memória de medo (de Oliveira Alvares et al. 2012). Neste experimento, não houve diferença entre os grupos durante as reativações visto que, em ambos, os níveis de congelamento se aproximaram de zero. No teste, ambos os grupos apresentaram níveis altos e similares de congelamento, demonstrando que para haver a atualização da memória, esta necessita ser reativada na ocasião em que as novas informações são apresentadas.

Em seguida, para diretamente verificar o papel da reconsolidação, repetimos o protocolo de três reativações curtas, sendo que antes de cada sessão foi administrado sistemicamente aos animais o antagonista de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VGCC) Nimodipina, ou seu veículo (Figura 3.5). Os L-VGCC são essenciais para que ocorra a desestabilização da memória quando ela é reativada, e seu bloqueio faz com que a labilização do traço não ocorra, impossibilitando a sua reconsolidação (Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011) e a atualização da memória. Além disso, o bloqueio destes canais não afeta a consolidação de uma nova memória nem a evocação de memórias já armazenadas (Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011), fazendo da Nimodipina uma droga útil para se dissociar a consolidação da reconsolidação. Durante as sessões de reativação, os animais do grupo Chocolate

expressaram menores respostas de medo que os controles, independentemente do tratamento que receberam. No teste, porém, os animais do grupo Chocolate tratados com Nimodipina voltaram a expressar medo da mesma forma que os do grupo Controle, enquanto os tratados com veículo continuaram a expressar baixos níveis de medo. Ou seja, o bloqueio da labilização da memória de medo impediu a diminuição dos níveis de congelamento ocasionados pela apresentação do estímulo apetitivo durante as reativações. Estes resultados demonstram que a reconsolidação tem papel chave na atualização do conteúdo emocional de uma memória de medo, ao possibilitar que as novas informações apetitivas apresentadas sejam integradas à memória aversiva que foi labilizada.

A reconsolidação não ocorre toda vez que alguma memória é evocada, existindo diversos fatores que modulam positiva ou negativamente a sua ocorrência (Nader & Einarsson, 2010). É admitido que estes fatores atuam ao dificultar o processo de desestabilização da memória (Finnie & Nader, 2012). Dentre eles está a idade da memória – quanto mais mais antiga, mais difícil induzir a sua reconsolidação (Suzuki et al., 2004; Milekic & Alberini, 2002). A fim de investigar se memórias antigas são suscetíveis à atualização emocional, adaptamos o protocolo de três reativações curtas a essa condição, iniciando as sessões de reativação somente 30 dias após o treino (Figura 4.1). Apesar de uma tendência, não houve diferença entre grupos na primeira reativação. Na segunda e terceira reativação, o grupo Chocolate apresentou níveis de congelamento significativamente inferiores ao Controle. No teste, porém, os animais do grupo Chocolate voltaram a expressar medo assim como os controles. Memórias de medo antigas, portanto, são mais resistentes à atualização emocional, provavelmente por que nas sessões de reativação a memória não foi labilizada. Para modificar a valência emocional

de uma memória antiga, portanto, seriam necessários manipulações ou tratamentos complementares visando facilitar a labilização da memória. Estes resultados são consistentes com a nossa hipótese de que a atualização emocional verificada é mediada pela reconsolidação.

Outro fator restritor à reconsolidação é a força da memória, pois quanto mais aversiva ela é, mais resistente a voltar ao estado lábil se torna (Suzuki et al., 2004). Repetimos o protocolo de três reativações curtas, mas aqui empregamos um choque mais forte na sessão de treino, de 0,7 mA ao invés de 0.5 mA (Figura 4.2). Nas sessões de reativação, houve apenas uma tendência não-significativa de menor congelamento do grupo Chocolate em relação ao Controle. No teste, ambos os grupos apresentaram a mesma resposta de medo. Assim como no experimento com memórias antigas, este resultado está de acordo com a literatura (Nader & Einarsson, 2010) ao observar uma resistência das memórias mais aversivas em serem reconsolidadas e, conseqüentemente, atualizadas. Além disso, a pequena e não-significativamente supressão do medo pela presença do chocolate durante as reativações chama a atenção para uma questão importante. Provavelmente, para haver a atualização emocional de memórias de medo para um nível menos aversivo, o estímulo apetitivo apresentado deve provocar impacto suficiente para inibir o medo na ocasião da reativação. Por conseqüência, para atualizar memórias muito aversivas, além de facilitar a sua labilização, provavelmente seria necessário utilizar-se de estímulos mais apetitivos do que o usado neste estudo.

Trabalhos anteriores (Lee, 2009, Lee, 2010; Hupbach et al., 2007; Forcato et al, 2010; Jones et al., 2012) já relataram a ocorrência da atualização da memória quando esta é reconsolidada concomitantemente à apresentação de novas informações. Nestes

estudos, porém, a valência emocional da memória não foi modificada. Aqui, mostramos pela primeira vez que a reconsolidação abre a possibilidade para diminuir a aversividade de memórias de medo. Isso ocorreu após a reativação da memória de medo concomitante à apresentação de estímulos apetitivos do chocolate, o que levou à integração destas informações de valor emocional positivo ao traço de memória. Com este procedimento, houve uma robusta e persistente redução no comportamento de medo, mostrando que mesmo o conteúdo emocional de memórias aversivas é passível de sofrer modificações.

O uso de estímulos apetitivos, visando a atualização e ressignificação de memórias de medo para formas menos aversivas, tem potencial aplicabilidade clínica no tratamento de distúrbios psicológicos decorrentes de traumas. Entretanto, mais estudos visando desenvolver protocolos que sejam efetivos em memórias mais traumáticas e que sejam aplicáveis aos humanos acometidos são necessários. Acreditamos que, futuramente, procedimentos baseados na reconsolidação como uma ferramenta para se modificar memórias traumáticas podem se tornar uma alternativa mais eficaz que as comumente utilizadas.

6. SÚMULA DOS ACHADOS E CONCLUSÕES

6.1. Súmula geral dos achados

Neste trabalho, demonstramos a ocorrência da atualização emocional de uma memória de medo após a sua reativação concomitante à apresentação de um estímulo apetitivo. Este procedimento levou à diminuição da aversividade da memória e consequentemente a uma duradoura diminuição da resposta de medo quando evocada. A reconsolidação é o processo que possibilita a atualização do conteúdo emocional da memória. Para que ocorra, portanto, a memória deve ser suficientemente reativada e a idade e força da memória são variáveis importantes.

6.2. Conclusões

No quadro abaixo, estão listados os experimentos relacionados a cada um dos objetivos e suas respectivas conclusões específicas e gerais.

OBJETIVOS	EXPERIMENTO (Figura / página)	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	CONCLUSÕES GERAIS
Objetivo 2.2.1	Figura 3.1 A Pág. 46-47	A expressão de medo foi inibida pelo estímulo apetitivo durante a reativação, mas voltou ao nível dos controles no teste.	Uma única reativação curta pareada com o estímulo apetitivo não é capaz de atualizar a memória a ponto de diminuir a resposta de medo.
Objetivo 2.2.2	Figura 3.1 B Pág. 46-47	A expressão de medo foi inibida pelo estímulo apetitivo durante as três reativações; no teste, os animais reativados na presença do chocolate continuaram apresentando menor medo que os controles.	Três reativações curtas, conduzidas na presença do estímulo apetitivo, provocam a integração das novas informações emocionalmente positivas ao traço de memória,

			atualizando-o para uma forma menos aversiva e suprimindo a resposta de medo.
Objetivo 2.2.3	Figura 3.2 Pág. 48	A redução da expressão do medo pelas reativações pareadas com um estímulo apetitivo ocorre tanto em machos como em fêmeas.	O fenômeno da atualização emocional da memória não é gênero-específico.
Objetivo 2.2.4	Figura 3.3 Pág. 49	A expressão de medo foi inibida pelo estímulo apetitivo durante a reativação longa de nove minutos; no teste, os animais reativados na presença do chocolate continuaram apresentando menos medo que os controles.	Uma única reativação longa, concomitante à presença de estímulos apetitivos, leva à atualização da memória e à redução do medo assim como quando conduzidas três reativações curtas de três minutos cada.
Objetivo 2.2.5	Figura 3.1B Pág. 46-47 Figura 3.2 Pág. 48 Figura 3.3 Pág. 49	Os animais reativados na presença do estímulo apetitivo continuaram apresentando menor medo que os controles em um segundo teste, realizado 20 dias após o primeiro.	A redução da expressão do medo após a atualização da memória com informações apetitivas persiste com o passar do tempo.
Objetivo 2.2.6	Figura 3.4 Pág. 50	As exposições, na presença do estímulo apetitivo, a um contexto novo e diferente do contexto do CAC não influenciam na expressão do medo durante o teste realizado no contexto do CAC.	O estímulo apetitivo necessita ser apresentando na ocasião em que a memória de medo é reativada para que suas informações sejam integradas ao traço de memória e a resposta de medo enfraquecida.
Objetivo 2.2.7	Figura 3.5 Pág. 51	Quando a memória é reativada na presença do estímulo apetitivo, o tratamento pré-reativação com Nimodipina previne que a expressão do medo seja enfraquecida na sessão de teste.	Para que as novas informações apetitivas sejam integradas à memória, é condição necessária a ocorrência da labilização do traço de memória e sua consequente reconsolidação.
Objetivo 2.2.8	Figura 4.1 Pág. 53	Em uma memória antiga de 30 dias, o estímulo apetitivo apresentado durante três reativações diminui a resposta de medo durante as sessões, mas no teste a expressão do	Memórias antigas de 30 dias tem a expressão do medo inibida pela presença do estímulo apetitivo durante as reativações, assim como

		medo não é alterada.	em memórias recentes. Porém, elas não tem o seu conteúdo emocional atualizado, provavelmente por não terem sido labilizadas.
Objetivo 2.2.9	Figura 4.2 Pág. 54	Em uma memória mais aversiva, a apresentação do estímulo apetitivo durante três reativações não levam à redução da resposta de medo.	Memórias muito aversivas são resistentes à atualização emocional após sua reativação concomitante à apresentação de estímulos apetitivos, provavelmente por não terem sido labilizadas e/ou o estímulo apresentado durante as reativações não ter sido suficientemente apetitivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberini CM (2005). Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences* **28**(1):51-56.
- Alvares LDO, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. 2012. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* **22**: 1092–5.
- Archbold GEB, Bouton ME, Nader K. 2010. Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. *The European Journal of Neuroscience* **31**: 1303–11.
- Barnes P, Kirtley A, Thomas KL (2012). Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Hippocampus* **22**:149–171.
- Besnard A (2012). A model of hippocampal competition between new learning and memory updating. *Journal of Neuroscience* **32**(10):3281-3283.
- Besnard A, Caboche J, Laroche S (2012). Reconsolidation of memory: A decade of debate. *Progress in Neurobiology* **99**(1): 61-80.
- Bouton ME (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* **114**: 80–99.
- Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S (2006). Contextual and Temporal Modulation of Extinction: Behavioral and Biological Mechanisms. *Biological Psychiatry* **60**(4):352-360.
- Bouton ME, Winterbauer NE, Todd TP (2012). Relapse processes after the extinction of instrumental learning: Renewal, resurgence, and reacquisition. *Behavioural Processes* **90**(1):130-141.

- Breslau N, Davis GC, Andreski P, Peterson E (1991). Traumatic events and posttraumatic stress disorder in an urban population of young adults. *Arch Gen Psychiatry* **48**:216-22.
- Breslau N, Davis GC, Peterson EL, Schultz L (1997). Psychiatric sequelae of posttraumatic stress disorder in women. *Arch Gen Psychiatry* **54**:81-7.
- Choi J-H, Kim J-E, Kaang B-K (2010). Protein synthesis and degradation are required for the incorporation of modified information into the pre-existing object-location memory. *Mol. Brain* **3**:1.
- Cukor J, Spitalnick J, Difede J, Rizzo A, Rothbaum BO (2009). Emerging treatments for PTSD. *Clinical Psychology Review* **29**:715–26.
- Curtis CE, D'Esposito M (2003). Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *Trends in Cognitive Sciences* **7**(9):415-423.
- DeVietti TL, Kirkpatrick BR (1976). The amnesia gradient: Inadequate as evidence for a memory consolidation process. *Science* **194**(4263):438-440.
- De Oliveira Alvares L, Einarsson EÖ, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA (2012). Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* **22**:1092–5.
- Dudai Y, Eisenberg M (2004). Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**(1):93-100.
- Dudai Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annual Review of Neuroscience* **35**: 227–47.
- Ehlers A, Clark DM (2000). A cognitive model of posttraumatic stress disorder. *Behaviour Research and Therapy* **38**(4):319-345.
- Finnie PSB, Nader K (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **36**(7):1667-1707.

- Flavell CR, Barber DJ, Lee JLC (2011). Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nature Communications* **2**(1):504.
- Foa EB, Kozak MJ (1986). Emotional Processing of Fear. Exposure to Corrective Information. *Psychological Bulletin* **99**(1):20-35.
- Forcato C, Rodríguez MLC, Pedreira ME, Maldonado H (2010). Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiology of Learning and Memory* **93**:77–84.
- Frankland PW, Ding H-K, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ. 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning & memory* **13**: 451–7.
- Hermans D, Dirikx T, Vansteenwegen D, Baeyens F, Van den BO, Eelen P (2005). Reinstatement of fear responses in human aversive conditioning. *Behav Res Ther* **43**: 533–551.
- Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L (2007). Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learning & Memory* **14**:47–53.
- Izquierdo I, Barros DM, Souza TM, De Souza MM, Izquierdo LA (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* **393**(6686):635-636.
- Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Lima RH, Clarke JR, da Costa JC, Cammarota M (2008). Extinction learning: Neurological features, therapeutic applications and the effect of aging. *Future Neurology* **3**(2):133-140.
- Izquierdo I, Myskiw JC (2011). Brain interactions between processes triggered by memory retrieval and their use in the treatment of fear memories. *Future Neurology* **6**(3):307-309.
- Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MRM, Coitinho A, De Silva TD, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I (2002). Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cellular and Molecular Neurobiology* **22**(3):269-287.

- Izquierdo I, e McGaugh JL (2000). Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioral Pharmacology*. **11**:517-534.
- James W (1890). The principles of psychology. Henry Holt, New York, NY.
- Jones B, Bukoski E, Nadel L, Fellous J-M (2012). Remaking memories:reconsolidation updates positively motivated spatial memory in rats. *Learning & Memory* **19**:91–8.
- Kaang B-K, Choi J-H (2011). Protein degradation during reconsolidation as a mechanism for memory reorganization. *Front. Behavioral Neuroscience*. **5**:2.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000). Principles of Neural Science. 4th edition. New York, McGraw-Hill, 1414 p.
- Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB (1995). Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* **52**:1048-60.
- Lee JLC (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience* **11**(11):1264-1266.
- Lee JLC (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in Neurosciences* **32**(8):413-420.
- Lee JLC, Everitt BJ, Thomas KL (2004). Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science* **304**(5672):839-843.
- Lee JLC, Hynds RE (2012) Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus*. Artigo em processo de publicação, disponível on-line. DOI: 10.1002/hipo.22083.
- 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**:1253–1256.

- LeDoux JE (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* **23**:155-184.
- Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM (1979). Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: Some anomalous characteristics. *Science* **204**(4399):1319-1320.
- McGaugh JL (2000). Memory - A century of consolidation. *Science* **287**(5451):248-251, 2000.
- Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research* **192**(1):61-69.
- Milekic MH, Alberini CM (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* **36**:521–525.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**(3827):554-555.
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: A unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy* **207**(1):35-66.
- Müller GE, Pilzecker A (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband* **1**:1–300.
- Nader K & Einarsson EO (2010). Memory reconsolidation: An update. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1191**:27-41.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**: 722–6.
- Paller KA, Wagner AD (2002). Observing the transformation of experience into memory. *Trends in Cognitive Sciences* **6**(2):93-102.

- Pavlov IP (1927). *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. New York: Dover.
- Pitman RK (2011). Will reconsolidation blockade offer a novel treatment for posttraumatic stress disorder? *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **5**:11.
- Quevedo J, Sant' Anna MK, Madruga M, Lovato I, De-Paris F, Kapczinski F, Izquierdo I, Cahill L (2003). Differential effects of emotional arousal in short- and long-term memory in healthy adults. *Neurobiology of Learning and Memory* **79**(2):132-135.
- Quillfeldt JA (1994). O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Instituto de Biociências / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Quirk GJ (2002). Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learning and Memory* **9**(6):402-407.
- Rescorla RA. (2004) Spontaneous recovery. *Learning and Memory* **11**(5):501-509.
- Rescorla R a, Heth CD. 1975. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *Journal of experimental psychology Animal behavior processes* **1**: 88–96.
- Resnick HS, Kilpatrick DG, Dansky BS, Saunders BE, Best CL (1993). Prevalence of civilian trauma and posttraumatic stress disorder in a representational national sample of women. *J Consult Clin Psychol* **61**:984-91.
- Ribot T (1881). *Les Maladies de la Memoire*. Appleton-Century-Crofts.
- Schneider AM, Sherman W (1968). Amnesia: A function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science* **159**(3811):219-221.
- Squire,LR (2009).Memory and brain systems: 1969-2009. *Journal of Neuroscience* **29**(41):12711-12716.

- Squire LR, Alvarez P (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: A neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology* **5**(2):169-177.
- Squire RL, Bloom FE, Spitzer NC, du Lac S, Ghosh A, Berg D (2008). *Fundamental Neuroscience*. 3th edition. San Diego, Academic Press.
- Squire LR, Stark CEL, Clark RE (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience* **27**: 279-306.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* **24**:4787–4795.
- Tronson NC, Taylor JR (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* **8**(4):262-275.
- Tulving E (1987) Multiple memory systems and consciousness. *Human Neurobiology* **6**(2):67-80.
- Von Herten LS, Giese KP (2005). Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* **25**: 1935–1942.
- 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**: 905–12.
- Winters BD, Tucci MC, DaCosta-Furtado M. 2009. Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learning & memory* **16**: 545–53.
- Yehuda R (2002). Post-traumatic stress disorder. *New England Journal of Medicine* **346**(2):108-114.

8. ANEXO I

O artigo científico presente nesta dissertação foi submetido à revista Learning & Memory, tendo sido redigido e formatado seguindo as normas do periódico incluídas neste anexo (logo após o comprovante de submissão, a seguir).

[Professor Jorge Quillfeldt \(Author\)](#) [Queue Summary](#) [Reviewer Area](#)

Click Here to Check Status of Manuscripts Under Editorial Consideration or Review

The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

LEARNMEM/2012/030189

Chocolate vs. fear: appetitive stimulus during memory reactivation reduces fear expression

Josue Haubrich, Fabiana Santana, Lindsey F Cassini, Ana P Crestani, Rodrigo O Sierra, Lucas de Oliveira Alvares, and Jorge A Quillfeldt

Status: Under Review

Date Received: 21 Dec 2012

Editor: Susan Cushman

Article Types: Research Paper

Corresponding Author: Lucas de Oliveira Alvares

Keywords: Fear conditioning; Nimodipine; PTSD; Updating; reconsolidation

Supplemental Files: 0

[\[Withdraw Paper\]](#) [\[PDF version of your paper\]](#) [\[HTML References\]](#) [\[Additional Supplemental File\]](#)

[Learning & Memory](#) [Journal Site](#) [Contact Us](#)

[© 2013 Learning & Memory](#)

Instructions for Manuscript Preparation and Submission

All papers must be submitted by the authors through the [online manuscript submission and processing system](#). E-mailed or hard-copy submissions cannot be considered. Authors should be aware of the following items before uploading their manuscript to *Learning & Memory*:

1. Article type. Authors will be required to specify the type of article submitted to the journal, and the article should be formatted appropriately (see below under number 8, "Manuscript text and images"). Article types considered by the journal include the following: Research Paper, Brief Communication, Commentary, and Review.

2. Title. In addition to the main title of the paper, a running title must be provided. The running title has a maximum length of 50 characters (including spaces).

3. Keywords. At least two keywords must be included.

4. Cover letter. The cover letter should include: (a) the name, address, telephone number, e-mail address, and fax number of the author responsible for correspondence regarding the manuscript, (b) a statement specifying the article type (Research Paper, Brief Communication, etc.), (c) a paragraph highlighting the main points of the work, (d) a statement that the manuscript has been seen and approved by all listed authors, (e) specific requirements for reproduction of art, and (f) the status of any permissions needed.

5. Genes and proteins: Nomenclature, formatting, and accession numbers. Approved nomenclature must be used for all genes and proteins mentioned in the text, figure legends, and tables. Nomenclature rules are species-specific and can be accessed here for [rat](#), [mouse](#), and [human](#). In addition, please note that it is journal style to set all gene symbols, alleles, and loci in italics, while all proteins must be in Roman type.

Any new nucleic acid or protein sequences must be submitted to the appropriate data bank and be publicly available upon publication of the manuscript. [GenBank](#) serves as the main repository for all new DNA and RNA sequences.

Researchers should also be prepared to make materials needed to duplicate their results available to qualified academic researchers. It is a condition of publication that reagents, clones, cell lines, etc. generated during the course of the work described will be made available on request to qualified members of the research community.

6. Referees. During the online submission process, authors may suggest up to five names of qualified referees and may indicate individuals they feel are in conflict. However, referees are selected at the discretion of the editors.

7. Authors. The first name, last name, and institutional affiliation are required for each author. A valid e-mail address for the corresponding author must also be provided.

8. Manuscript text and images. During the online submission process, authors will have the opportunity to specify the number of electronic files they intend to upload. All text and image files will then be converted into a single PDF (Portable Document File) file to be used in the review process. Authors are cautioned that when they specify the number of files to upload on the "File Upload Metadata" page, they cannot change this number at a later stage.

For ease of submission, we recommend that all authors create a single PDF (Portable Document File) that includes all text and figures, and upload only this one file. If you choose to upload each text and figure file separately, please see below (under number 11, "Figures") for acceptable image file formats.

Specific formats for the different article types are as follows:

Research Papers describe original results of exceptional importance and of very broad appeal. Sections of the manuscript must be presented in the following order: Title Page, Abstract, Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods, Acknowledgements, References, Tables, and Figure Legends. Research Papers will occupy no more than 12 journal pages. A manuscript of 28-32 double-spaced pages with 27 lines of 11-point text per page (a manuscript of 63,000 characters, including spaces) with 4-6 figures and 1-2 tables will translate to 12 printed pages in the journal. The Abstract should be about 200 words long and should summarize the aim of the report, the methodological approach, and the significance of the results.

Brief Communications are high-quality complete yet shorter bodies of work that provide compelling, novel, and important conclusions. Brief Communications may be more restricted in

breadth of analysis or cover a more defined area of a particular field, but the work must still be of interest to a broad range of researchers. Manuscripts must be less than 2500 words and contain no section headings. The word limit is exclusive of abstract, literature cited and figure legends. Abstracts should contain less than 100 words. There is a limit of 3 figures.

Commentaries are invited by the editors to highlight an original research article published in the same issue. The format requirements are the same as for Brief Communications.

Review articles are published on timely and important topics of broad interest to the community. All review articles are commissioned by the editors and subject to peer review. We ask all review authors to present a fair and balanced view of the topic and not dwell excessively on the work of any one group. Each article should be approximately 3000 to 6000 words in length (although the final length and format are negotiable, based on the subject), and contain an Abstract (no more than 250 words) and references.

9. References. In the body of the manuscript, references are cited by name and date; please do not cite by number. If only one author, then cite the last name of the author before the year (e.g., Loftus 1993); if two authors, then cite both authors' last names and then the year (e.g. Okado and Stark 2005); if more than two authors, then cite the first author et al., and then the year (e.g., Scoboria et al. 2002). Undated citations (unpublished, in preparation, submitted, or personal communication) should include the first initials and last names of each author (up to 10 before et al.).

Unpublished work does not appear in the reference list; only articles that are published or in press should be included. "Et al." should be used ONLY after 10 authors. Bibliographic information should be supplied in the following formats:

Journal articles (provide up to 10 author names before et al.):
Ouyang M, Hellman K, Abel T, Thomas SA. 2004. Adrenergic signaling plays a role in the maintenance of waking and in the regulation of REM sleep. *J Neurophysiol* **92**: 2071-2082.

Book chapters:
Petruilis A, Eichenbaum H. 2003. Olfactory memory. In *Handbook of olfaction and gustation*, Vol. 2 (ed. RL Doty), pp. 409-438. Marcel Dekker, New York.

Books:
Paxino G, Watson C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

10. Tables. Tabular data should be presented concisely and logically. Tables should be numbered consecutively according to the order cited in the text. Use only horizontal rules and make sure column headings are unambiguous in indicating the columns to which they refer. Each table should have a title, and table legends and footnotes should be included where needed. If tables are reprinted from another source or if data included are from another source, permission to reprint is required. Please note that we are unable to process Excel (.xls) files; all Excel files should be converted to Word documents before submission.

11. Figures. For online submission, each figure number should be clearly indicated on the front of the image. As mentioned above (under number 8, "Manuscript text and images"), we recommend that authors convert all text and image files to a single PDF before submitting online. Authors are advised in advance, however, that manuscripts accepted for publication (see below under "Manuscripts Accepted for Publication") have very stringent electronic file criteria. In addition, authors are forewarned that color art incurs additional publication charges, and authors wishing to publish color art must pay the associated fees. Fees may be waived at the discretion of the editor in cases where the authors cannot cover color art fees but the figures must be presented in color.

For color artwork, if more than one color is used, please choose colors that are far enough apart on the color spectrum in order to preserve maximum color distinction (e.g., black and some blues, as well as red and some oranges, can be difficult to distinguish when artwork is scaled for the journal page). Please also avoid using very light colors, such as pale yellow, since these tend to fade out and reproduce poorly. Use Helvetica typeface in point sizes no smaller than 8 pt and no larger than 10 pt, except for the main callouts (e.g., A, B, C), which should be 12-pt boldface.

If your images are included in your manuscript file, you do not need to upload them separately. However, if you choose to upload figure images as separate files, several file types are

acceptable for reviewing purposes, including GIF, TIFF, EPS, and JPEG. Each figure file should be named with the author's last name and figure number (e.g., Smith_Fig1). Formats that are not supported include the following: any file utilizing OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embed files, Bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Multi-page PowerPoint (.ppt) files may not be supported; one slide per file is acceptable.

12. Permissions. It is the author's responsibility to obtain permission from the publisher to reproduce, modify, or adapt any previously published figure or table for use both in print and online in *Learning & Memory*. Most scientific journals list instructions for obtaining reprint permissions on their Web sites. All data or information obtained through personal communication also requires a letter of approval. Authors must include permission letters at the time of manuscript submission.

Figure and table legends that incorporate reprinted, modified, or adapted work should contain the relevant information according to the following example:

Reprinted from Paxinos and Watson 1998, with permission from Elsevier © 1998.

The URL of the original work should also be included if the publisher requires it, as stated in the permissions letter. The complete reference for the original work must be included in the Reference list.

PLEASE NOTE: All authors must obtain permission from [Elsevier](#) to use any diagrams from the following atlases (including other editions and CD ROM versions):

Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.

Franklin BJ, Paxinos G. 1997. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.

13. Supplemental material. *Learning & Memory* accepts supplementary files; these files will be available online with the published manuscript. The supplementary files may include figures, tables (especially long tables of data), data sets, videos, and any other information that is necessary for reproducing the work but not essential for understanding the content of the paper. The supplementary files should be mentioned at the appropriate locations within the text, and the file extension (e.g., .doc, .xls, .rtf, .mp3, .mpeg, .mov, .wav) must be included in the file name. Additional supplemental files (e.g., related papers, papers in press) are encouraged as necessary for a thorough review process. All supplemental material will be peer-reviewed and must be submitted to the journal at the same time as the manuscript. Upon manuscript acceptance, supplemental files will not be copyedited; they will be published online exactly as you have provided them.

14. Cover artwork. Authors are encouraged to submit one or more figures related to their manuscript that can be considered for use on the cover of the journal. The image does not need to be an exact duplicate of a figure from the manuscript, but it should represent both an artistic and informative representation of the research results. See below, under "Manuscripts Accepted for Publication," for digital file requirements (note that we need only a digital file of the image; no hard copies are necessary). All proposed images and questions about cover art should be directed to Margaret Clarke, Editorial Assistant (Margaret.clarke@uth.tmc.edu).

Manuscripts Returned for Revision after Review

For manuscripts returned for revision after review, authors are allowed three months to address the concerns of the referees and to submit their revised manuscript to the journal. To submit a revised manuscript online, authors should log into [the Learning & Memory online manuscript submission and processing system](#), go into their "Author Area," click on "Submit a revision," and proceed by following the online instructions.

After this three-month window has passed, the online system automatically closes the manuscript record; all revised manuscripts after this point must be considered as new submissions. During the online submission of a revised manuscript after the revision period has passed, authors must indicate that the manuscript is a "resubmission" and include the previous manuscript ID number (e.g. LEARNMEM/2005/001234). Authors are advised to contact the

journal (lm@csih.org) should additional time beyond three months be required for the submission of a revised manuscript.

Manuscripts Accepted Subject to Revision

For manuscripts accepted subject to revision, only one revised version will be considered; it should be submitted within two months of provisional acceptance.

Manuscripts Accepted for Publication

Publication time from the date of acceptance is approximately two months. In order to prevent any delay in publication, authors are advised to carefully read the letter that they receive upon acceptance of their manuscript and to follow all instructions detailed therein. The following items are particularly important at this stage:

1. Manuscript text.

The editorial office requires a Word document of the each accepted manuscript; we cannot process PDF files at this stage. In addition, any line-by-line changes to the accepted version of the manuscript must be communicated to the editorial office within 48 hours of acceptance. Upon final acceptance, authors must submit the final version of text, including tables, in Microsoft Word. (Note: Greek symbols should be inserted directly from Word's "symbol insert" pulldown menu; math equations should be inserted using MathType or Word's Equation Editor. Authors who run Word 2007 are requested to create equations using MathType or Word's original Equation Editor, which is still available in Word 2007. Note that equations that are created using Word 2007's Equation Builder are converted to picture formats, which should be avoided.)

2a. Artwork.

In order to meet *Learning & Memory's* quality standards for publication, it is important that authors submit digital art that conforms to the appropriate resolution, color mode, and file format.

[Note the following new guidelines, effective immediately.]

Color mode: RGB

All color image files are required to be submitted in their original RGB color. (Whenever possible, tag the submitted RGB image with the originating ICC profile.) **NOTE:** If you are working in Illustrator CS3, please back-save to Illustrator CS2 before sending the file.

Authors are forewarned that charges incur for artwork that is published in color. Authors who are unable to meet these charges should include a letter of explanation upon acceptance for publication; inability to meet these charges will have no effect on acceptance or publication of submitted papers.

Acceptable digital art file formats: TIFF, EPS, PDF, JPEG, AI

TIFF: Tagged image file format--*Raster image file format*

- Raster Image resolution requirements provided below

EPS: Encapsulated PostScript--*Can contain either Vector or Raster information*

- Vector Image generation explained below

PDF: Portable document file--*Can contain either Vector or Raster information*

NOTE: When creating digital art PDFs, please be sure that any source files used that contain raster elements (e.g., when using Photoshop) meet the Raster Images resolution dpi settings noted below in Detailed Digital Art Guidelines.

- Embedded raster images from all source files must use the highest possible resolution setting for the PDF to be usable
- **PDF art files that contain raster elements must meet the "Raster Images (Resolution Requirements)" as noted below in these author instructions**
- PDF quality settings must always be set to "Press Quality"
- Disable any image compression or down-sampling
- All fonts **MUST** be embedded

[\[Click here for detailed PDF creation.\]](#)

JPEG: Joint Photographic Expert Group--*Raster file format* (uses a compression technique that removes portions of data as file size is reduced)

- Compression MUST be set to **Maximum** quality to be usable

[\[Click here for detailed JPEG compression information.\]](#)

AI: Adobe Illustrator--*Can contain either Vector or Raster information*

- Must use Adobe preinstalled Base 14 Fonts; fonts must be embedded in .ai file
- Embed ALL figure elements in all art files, especially Adobe Illustrator files, to ensure that linked elements will not be lost

2b. Detailed digital art guidelines.

Color Mode: *All color images should be submitted in RGB.*

Fonts and Point Sizes: The point size for text used in any given piece of artwork must not vary greatly--please try to use only Helvetica or Arial fonts in artwork and in point sizes no smaller than 8 pt. and no larger than 10 pt. All panel tags (A, B, C) should be presented as capital letters in 10- or 12-pt. bold (Helvetica or Arial).

Lines/Rules: The weight of all rules used in artwork must be 0.25-point or heavier. Lighterweight lines will not be picked up and will drop out of the art.

Raster Images (Resolution Requirements)

1. **Line art (monochrome):** Resolution must be 1000-1200 dpi at publication size. Common examples are graphs and charts made of solid black and white, with no gray values. *Preferred file formats are TIFF, PDF, and EPS.*
2. **Halftones (color or grayscale):** Resolution must be 300 dpi at publication size. Common examples are color or grayscale figures containing pictures only, with NO lines/rules, text, or panel designations. *Preferred file formats are TIFF, PDF, EPS, and JPEG (saved only as MAX quality).*
3. **Combination Halftones (color or grayscale):** Resolution must be 600-900 dpi. Common examples are color grayscale figures containing a mixture of halftone AND line art elements (rules, text, panel designations, etc.). *Preferred file formats are TIFF, PDF, EPS, and JPEG (saved only as MAX quality).*
4. [Click here for a visual presentation of raster image resolutions.](#)

Vector Images (resolution requirements DO NOT apply)

NOTE: Vector graphics are typically generated using drawing or illustration programs, such as Adobe Illustrator, and are comprised of mathematically defined geometric shapes (lines, objects, and frills). These images are resolution-independent and can be sized up or down without quality loss.

1. **Vector line art (monochrome):** Must be saved as an EPS file with graph lines at least 0.25-point wide and all fonts either converted to outlines or embedded in the file. (Guidelines for converting fonts to outlines in Adobe Illustrator can be [found here.](#))
2. **Vector combination line/halftone (color or grayscale):** The halftone elements must be processed in Photoshop and the line elements in Illustrator; the two elements from both applications must be combined in Illustrator. Must be saved as an EPS file with graph lines at least 0.25-point wide and all fonts either converted to outlines or embedded in the file. (Guidelines for converting fonts to outlines in Adobe Illustrator can be [found here.](#))

2c. Additional art guidelines.

- Do not allow font sizes to vary more than 2 points within any figure or across numerous panels within a given figure.
- Avoid including panel headings or titles directly in artwork; rather, headings should be included in figure legends at the start of each panel description.
- Avoid the use of light colors, such as pale yellow, which will reproduce poorly.
- If using more than one color, choose colors that are far enough apart on the color spectrum in order to preserve maximum color distinction (e.g., black and some blues, as well as red and some oranges, can be difficult to distinguish when artwork is scaled for the journal page).
- All panels (A, B, C) must be identified in the figure legend.
- Color keys should be included in the body of the figure rather than in the figure legend.
- Authors are encouraged to include all parts/panels of an individual figure in one figure file, to avoid being charged for each "art file" submitted. (Example: All parts of a figure,

such as Panels A through G, should be included in the same, single file for Figure X.) *Do not include more than one figure in any file, however; Figure 1 should not also include Figure 2 in the same file.*

2d. Art submissions and labeling.

Please make sure that your files (on disk--CD or DVD--and in the Bench>Press Electronic Manuscript Submission System) are properly labeled by first author's name/article number/figure number (e.g., Smith1234_Fig1, Smith1234_Fig2, etc.). Please indicate the program used to create your artwork.

Send only FINAL electronic art files. Do not send text, such as figure legends, on the same disk with the art files. **DO NOT EMBED FIGURES WITHIN THE MANUSCRIPT TEXT FILES** or embed legends with the figures. If there are color keys to the figures, these should be included in the body of the figure rather than in the legend, as it can be difficult to match legend and figure colors.

All figures should be checked carefully before they are submitted, to avoid author charges for replacement artwork or corrections to artwork at the page proof stage.

3. Author approval. We require signatures from every author on the accepted manuscript to verify that each author has read and approved the manuscript.

4. Proofs. Proofs are considered to be the final form of the paper, and corrections to proofs can be made only in the case of factual errors. If additional information must be added at this stage, it should be in the form of a "Note added in proof," which is subject to the approval of the editors.

An order form for reprints will be included with the proofs. In addition, to help defray the cost of publication, a charge of \$30 per page will be made for publication in *Learning & Memory*. Authors unable to meet these charges should include a letter of explanation upon acceptance for publication; inability to meet these charges will have no effect on acceptance and publication of submitted papers.