

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

VITOR FLORES FERREIRA

**OS EFEITOS DEPENDENTES DO TEMPO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DO MEDO**

PORTO ALEGRE

2022

VITOR FLORES FERREIRA

**OS EFEITOS DEPENDENTES DO TEMPO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DO MEDO**

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

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares
Coorientadora: Dra. Rossana Rosa Porto

PORTO ALEGRE

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à **Deus**, pelo teu favor, que me manteve forte nos momentos difíceis, o **Senhor** me sustentou, foi minha força e meu escudo. Te agradeço Senhor pela sua graça manifestada em minha vida, e a Ti dedico este trabalho.

Agradeço a minha família, meu pai **Renato Quintana Ferreira**, pelo exemplo destes desde criança, me ensinado o valor do trabalho, e me dado força nas horas de fraqueza. À minha mãe **Sandra Regina Flores Ferreira**, por ter estado sempre presente na minha vida, me amparando, se preocupando, e me cuidando. Sem o amor e apoio que vocês sempre me deram eu não teria chegado onde cheguei.

Agradeço ao professor orientador **Lucas de Oliveira Alvares**, por ter aberto as portas do seu laboratório, pela oportunidade e orientação. À minha coorientadora **Rossana Rosa Porto**, que mesmo de longe esteve sempre disponível para me auxiliar, por ter me incentivado e acreditado em mim. Aos colegas de laboratório, pela cooperação no desenvolvimento do trabalho, companheirismo e amizade.

Ao professor **Lino Pinto de Oliveira Jr.**, que de professor e orientador se tornou também um amigo. Me possibilitou o ingresso na pesquisa, o primeiro a me incentivar nesta jornada, me orientar e me mostrar que era possível.

Estendo os agradecimentos a todos os amigos e familiares que estiveram presentes durante esta trajetória.

RESUMO

As memórias aversivas podem entrar em estado lábil durante a reativação, permitindo que seu conteúdo seja modificado. As alterações moleculares induzidas por intervenções distintas, como o exercício físico, podem facilitar ou prejudicar a intensidade da memória original. No entanto, o efeito do exercício físico realizado em momentos distintos em torno da reativação da memória permanece pouco compreendido. Aqui nós investigamos como uma única sessão de exercício em esteira realizada em diferentes momentos antes ou depois de uma sessão de reativação de 5, 15 ou 30 minutos influencia a reconsolidação e extinção da memória contextual condicionada pelo medo em ratos. Nossos resultados indicam que o exercício físico de baixa intensidade 24 horas e 10 minutos antes da reativação prejudica a reconsolidação e facilita a extinção. No entanto, quando o protocolo de exercício é realizado imediatamente após a sessão de reativação, facilita a reconsolidação e prejudica a memória de extinção. Nossos resultados sugerem que o momento específico em que o exercício físico é realizado desempenha um papel essencial na reconsolidação e extinção em animais condicionados pelo medo.

ABSTRACT

Aversive memories can enter a labile state during reactivation, allowing its content to be modified. Molecular changes induced by distinct interventions such as physical exercise can either facilitate or impair the strength of the original memory. However, the effect of the physical exercise performed at distinct time-points around memory reactivation remains poorly understood. Here we investigated how a single treadmill exercise bout delivered at different moments before or after a 5, 15 or 30-min reactivation session influences the reconsolidation and extinction of contextual fear conditioned memory in rats. Our results indicate that physical exercise of low-intensity 24 hours and 10 minutes before the reactivation impairs reconsolidation and facilitates extinction. However, when the exercise protocol is performed immediately after the reactivation session, it facilitates reconsolidation and impairs extinction memory. Our results suggest that the specific time-point in which the physical exercise is performed plays an essential role in the reconsolidation and extinction outcome in fear conditioned animals.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo

CFC: condicionamento aversivo ao contexto

CS: estímulo condicionado

PTSD: transtorno de estresse pós traumático

TEPT: transtorno de estresse pós traumático

US: estímulo incondicionado

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. PROCESSOS DE MEMÓRIA.....	8
1.2. EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MEMÓRIA.....	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. RESULTADOS	13
3.1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	14
4. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
7. ANEXOS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. PROCESSOS DE MEMÓRIA

A memória é a capacidade de alguns seres vivos de adquirir, armazenar e recordar informações previamente aprendidas (Spear & Mueller, 1984). Para que uma memória seja formada ela deve ser aprendida, onde o primeiro passo é a aquisição, o momento em que a informação chega ao nosso sistema nervoso através das estruturas sensoriais (Kandel, 2006). No entanto, o processo de aprendizagem não é suficiente, a informação também deve ser estabilizada como memória. Um engrama recrutado para dar suporte a uma informação recém-adquirida permanece inicialmente em uma forma lábil, suscetível a interferências, e sua estabilização depende de diversas alterações bioquímicas e eletrofisiológicas que consolidam o traço de memória física (Squire & Kandel, 2003).

A memória é um processo dinâmico que permite uma adaptação constante às mudanças no ambiente. Portanto, a capacidade de atualizar memórias antigas de acordo com novas demandas é crucial para manter sua importância ao longo do tempo. A memória armazenada pode ser recuperada por um processo chamado recuperação de memória. Essas informações podem ser recuperadas de forma espontânea ou voluntária. A recuperação ocorre a partir da ativação de neurônios envolvidos em um traço de memória com uma sequência coerente ao longo do tempo. Em memórias recentes aversivas, isso ocorre principalmente no hipocampo (Kim *et al.*, 2016).

Após a recuperação, as memórias previamente consolidadas podem passar por um novo ciclo de labilização e reestabilização, comumente conhecido como reconsolidação. O estado de plasticidade induzido pela recuperação torna a memória suscetível a intervenções, permitindo mudanças em sua força e/ou conteúdo. (De Oliveira Alvares *et al.*, 2013; Nader, Schafe, Doux, 2000). A reconsolidação é induzida por reativações de curta duração, que por sua vez, ativam mecanismos de degradação proteica associados ao processo de desestabilização da memória original, permitindo que a memória original retorne a um estado sujeito a interferências, seja de fortalecimento ou enfraquecimento. Enquanto nas memórias reativadas por períodos de tempo mais longos, ocorre o processo de extinção da memória, por meio do estabelecimento de um novo engrama de circuitos inibitórios, que visa suprimir a atividade da memória original, formando um novo traço de memória inibitório (Bevilaqua *et.al.*, 2008).

A extinção é um processo que pode ser desencadeado pela exposição repetida ao estímulo condicionado (CS) na ausência do estímulo incondicionado aversivo (US). Uma redução progressiva nas respostas de medo foi descrita após protocolos de extinção, mas as evidências sugerem que a extinção não apaga a memória original; em vez disso, induz um novo aprendizado que inibe

transitoriamente a expressão do medo (Bouton, 2002). Portanto, a memória do medo normalmente ressurge com a passagem do tempo (recuperação espontânea), exposição ao US (restabelecimento) ou quando o CS é apresentado em um novo contexto (renovação) (Rescorla & Heth, 1975; Arbold, Bounton, Nader, 2010; Bouton, Winterbauer, Todd, 2012).

A reconsolidação e a extinção são regidas por processos distintos. Assim, a compreensão de estratégias comportamentais eficazes no enfraquecimento das memórias traumáticas são cruciais para melhorar a eficácia dos tratamentos. Pesquisas envolvendo paradigmas de condicionamento aversivo em roedores e humanos são de extrema relevância para o entendimento de transtornos psiquiátricos envolvendo memórias disfuncionais (Monfils & Holmes, 2018). Estudos mostraram que memórias contendo informações com valor emocional são melhor retidas do que memórias com conteúdo trivial. (Okuda, Roozendaal, McGaugh, 2004; Roozendaal & McGaugh, 2011). Experiências emocionais negativas podem levar à formação de memórias traumáticas duradouras, que por sua vez tendem a desencadear respostas emocionais mal-adaptativas e distúrbios psiquiátricos, como transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e fobias (Parsons & Reeler, 2013).

1.2. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MEMÓRIA

Os efeitos do exercício físico têm sido amplamente estudados nas funções cognitivas, principalmente na aquisição e manutenção de memórias. Após a descoberta por Van Praag *et al.* (1999a), onde encontraram um aumento da neurogênese no hipocampo de ratos adultos induzida pelo exercício físico voluntário, intensificaram-se os estudos sobre os efeitos do exercício na memória. A partir disso, verificou-se que esse tipo de exercício também foi capaz de aumentar a aquisição e consolidação da memória espacial e o principal mecanismo seria o aumento da potência de longo prazo e dos níveis de BDNF (Van Praag *et al.*, 1999b).

Nas últimas décadas, vários experimentos foram realizados para testar o efeito do exercício físico nos processos de memória. Muitos benefícios foram encontrados, como uma melhora na memória espacial (Albeck *et al.*, 2006; Ang *et al.*, 2006; Segal, Cotman, Cahill, 2011), memória aversiva (Radahmadi *et al.*, 2009) e consolidação do reconhecimento de objetos (Griffin *et al.*, 2009). Os principais mecanismos induzidos pelo exercício que foram associados a esses efeitos de memória foram o aumento dos níveis de BDNF e o aumento da potenciação a longo prazo (O'Callaghan, Ohle, Kelly, 2007; Aguiar *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2015), bem como o aumento da neurogênese no hipocampo (Chae *et al.*, 2014).

Diversas comparações entre volume e intensidade de exercício físico foram testadas em processos de consolidação. Entre os resultados, exercícios de baixa intensidade aumentam os níveis

de BDNF (Griffin *et al.*, 2015) e melhoram a memória espacial (Kennard & Woodruff-Pak 2011). O desempenho e os exercícios de alta intensidade também foram eficazes para melhorar os aspectos relacionados à memória. Uma única sessão de exercício de alta intensidade é capaz de aumentar a velocidade de aprendizado e retenção de memória (Winter *et al.*, 2007), melhorar a atenção (Alves *et al.*, 2014), a memória episódica (Weinberg *et al.*, 2014), de trabalho (Perciavalle *et al.*, 2015) e aumentam os níveis de BDNF (Griffin *et al.*, 2011; Schmolesky, Webb, Hansen, 2013) em humanos, estando diretamente relacionados com aumentos nos níveis de lactato sanguíneo e catecolaminas circulantes.

O exercício físico se mostrou eficaz na melhora da consolidação de memórias aversivas, animais submetidos a treinamento na esteira rolante durante 4 semanas demonstraram melhor retenção na memória aversiva na tarefa de esquiva passiva (Liu *et al.*, 2008). Camundongos submetidos a um protocolo de exercício físico 2 semanas antes do condicionamento aversivo ao tom ou imediatamente após demonstraram uma expressão de medo acentuada comparada com os não exercitados, contudo não tem efeitos quando realizado 2 semanas após o condicionamento (Falls, Raposa; Macauley, 2010).

Estudos descobriram que o exercício físico também é capaz de melhorar a reconsolidação da memória (Siette, Reichelt, Westbrook, 2014) e a extinção (Siette, Reichelt, Westbrook, 2014; Mustroph *et al.*, 2011), reduzindo a recuperação espontânea em animais (Lynch *et al.*, 2010). Ratos submetidos a protocolos de nado durante 6 semanas e posteriormente condicionados ao medo, obtiveram melhora na extinção da uma memória aversiva contextual quando comparado com o grupo sem exercício (Faria *et al.*, 2018). Em um outro estudo, ratos submetidos ao condicionamento físico 6 semanas antes do condicionamento aversivo demonstraram melhora na aprendizagem da memória aversiva contextual, entretanto não teve efeito sobre a aprendizagem da extinção (Greenwood *et al.*, 2009).

Em um experimento envolvendo a extinção tanto de memórias aversivas contextuais como auditivas mostraram que o exercício físico realizado durante a fase de consolidação de uma extinção é capaz de fortalecer a memórias de extinção e reduzir os níveis de recuperação espontânea em ratos (Bouchet *et al.*, 2017). Evidências mostraram que os processos de estabilização de memória são dependentes do tempo e podem ser interferidos apenas em janelas de tempo específicas (Casagrande *et al.* 2018). No entanto, ainda não se sabe como os exercícios físicos agudos realizados em momentos distintos em torno da reativação da memória podem afetar os processos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do exercício físico sobre processos de reconsolidação e extinção de uma memória aversiva contextual em ratos *Wistar*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar os efeitos de uma sessão única de exercício físico em diferentes momentos antes ou depois da reconsolidação de uma memória aversiva contextual condicionada em ratos *Wistar*.
2. Analisar os efeitos de uma sessão única de exercício físico em diferentes momentos antes ou depois da extinção de uma memória aversiva contextual condicionada em ratos *Wistar*.
3. Analisar os efeitos de uma sessão única de exercício físico sobre o comportamento ansioso de ratos no momento da reativação de uma memória aversiva contextual condicionada em ratos *Wistar*.

3. RESULTADOS

3.1. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos durante este trabalho estão descritos no seguinte artigo científico, que foi redigido de acordo com as normas da *Behavioural Brain Research* e será submetido à mesma.

The time-dependent effects of physical exercise on fear memory reconsolidation and extinction

Vitor Flores Ferreira¹, Rossana Rosa Porto², Bruno Popik¹, Angel David Arellano Pérez¹, Henrique Schaan Fernandes¹, Lucas de Oliveira Alvares^{1*}

¹*Laboratório de Neurobiologia da Memória, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 91,501-970 Porto Alegre, Brazil*

Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90,046-900 Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author at: Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43422, sala 216, CEP 91,501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
E-mail address: lucas.alvares@ufrgs.br (L. de Oliveira Alvares).

²Behavioural Neuroscience Laboratory, School of Medicine, Western Sydney University, Sydney - NSW 2560, Australia.

ABSTRACT:

Aversive memories can enter a labile state during reactivation, allowing its content to be modified. Molecular changes induced by distinct interventions such as physical exercise can either facilitate or impair the strength of the original memory. However, the effect of the physical exercise performed at distinct time-points around memory reactivation remains poorly understood. Here we investigated how a single treadmill exercise bout delivered at different moments before or after a 5, 15 or 30-min reactivation session influences the reconsolidation and extinction of contextual fear conditioned memory in rats.

Our results indicate that physical exercise of low-intensity 24 hours and 10 minutes before the reactivation impairs reconsolidation and facilitates extinction. However, when the exercise protocol is performed immediately after the reactivation session, it facilitates reconsolidation and impairs extinction memory. Our results suggest that the specific time-point in which the physical exercise is performed plays an essential role in the reconsolidation and extinction outcome in fear conditioned animals.

Keywords: Physical Exercise; Aversive Memory; Reconsolidation; Extinction

1. Introduction

Memory is the ability of some living beings to acquire, store and recall previously learned information [1]. Memory is a dynamic process that allows constant adaptation to changes in the environment. Therefore, the ability to update old memories according to new demands is crucial to maintaining their importance over time. After retrieval, previously consolidated memories may undergo a new cycle of labialization and restabilization, commonly known as reconsolidation. The state of plasticity induced by retrieval makes memory susceptible to interventions, allowing for changes in its strength and/or content. [2, 3].

Research involving paradigms of aversive conditioning in rodents and humans is of extreme

relevance to the understanding of psychiatric disorders involving dysfunctional memories [4]. Studies have shown that memories containing information with emotional value are better retained than memories with trivial content. [5, 6]. Negative emotional experiences can lead to the formation of lasting traumatic memories, which in turn tend to trigger maladaptive emotional responses and psychiatric disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD) and phobias [7].

Extinction is a process that can be triggered by repeated exposure to the conditioned stimulus (CS) in the absence of the aversive unconditioned stimulus (US). A progressive reduction in fear responses has been described after extinction protocols, but evidence suggests that extinction does not erase the original memory; rather, it induces new learning that transiently inhibits the expression of fear [8]. Therefore, fear memory typically resurfaces with the passage of time (spontaneous recovery), exposure to US (re-establishment), or when CS is presented in a new context (renewal) [9, 10, 11].

Reconsolidation and extinction are governed by distinct processes. Memories reactivated for longer periods of time lead to extinction, through the establishment of inhibitory circuits, suppressing the original fear memory expression. On the other hand, short-term reactivation activates protein degradation mechanisms associated with the memory destabilization, allowing the original memory to enter to a plastic state, so that it can be modulated [12]. Thus, the understanding of behavioral strategies that are effective in weakening traumatic memories are crucial to improving the effectiveness of treatments.

In the last decade, several experiments were carried out to test the effect of physical exercise on memory processes. Many benefits were found such as an improvement in spatial memory [13, 14, 15], aversive memory [16] and object recognition consolidation [17]. The main mechanisms induced by exercise that were associated with these memory effects were the increase in the BDNF levels and enhancement of long-term potentiation [18, 19, 20], as well as increased neurogenesis in the hippocampus [21].

Several comparisons between volume and intensity of physical exercise were tested in consolidation processes. Among the results, low-intensity exercises increase BDNF levels [22] and improve spatial memory [23, 24]. Studies have found that physical exercise is also capable of enhancing memory reconsolidation [25] and extinction [25, 26], reducing spontaneous recovery in animals [28]. Evidence has shown that memory stabilization processes are time-dependent, and can be interfered only in specific time windows [28]. However, it is still unknown when and how acute physical exercises performed in distinct time-points surrounding memory reactivation might affect the processes of extinction and reconsolidation of aversive memories.

Thus, the objective of this study was to evaluate how a single physical exercise session at

different time windows affects memory reconsolidation and extinction in fear conditioned rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male *Wistar* rats (2–3 months old, weighing approximately 300 g) from CREAL at Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) were used for all the experiments. They were housed in Plexiglas boxes, 4 animals *per* cage. Animals were kept on 12:12 light/dark cycle under controlled temperature (21 °C ±2), with food and water available *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with local and national guidelines (Federal Law no 11.794/2008) for animal care and the project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Rio Grande do Sul.

2.2. Physical Exercise Protocol

All the running sessions were conducted between 10:00 AM and 14:00 PM using an adapted motorized rodent treadmill with individual bays, measuring 10 cm wide, 50 cm long, separated by acrylic walls. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study.

All animals underwent a period of adaptation to the treadmill in order to minimize the stress induced by the apparatus novelty. The habituation period consisted of three consecutive days of running, with a progressive increase in duration and speed each day. On the first day, all animals ran for 5 minutes at 8 m/min. On the second day, all animals ran for 10 minutes at 8 m/min. On the third day, all animals ran for 10 minutes at 12 m/min. Two ping pong balls were introduced into the running pens in order to prevent the animals from giving up and stopping the running during the task. The animals that refused to run were encouraged to continue by gently tapping on their backs. Animals that were not able to perform the exercise were excluded from the sample. After the habituation, animals were subjected to a 15 min exercise session at 15 m/min 24 h or 10 min before, or immediately after reactivation (adapted from Scopel et al. 2006 [29]).

The intensity of the physical exercise session was established in accordance with [30], with 15 minutes of running at 15 m/min, which did not affect the blood lactate concentration, with an average of 2.5 mmol/L (Fig. 1). The intensity choice was also adopted based on the behavior of the animals, with no need of an aversive stimuli to perform the task. Higher intensities caused stress and the animals gave up, not completing the exercise session in our pilot experiments.

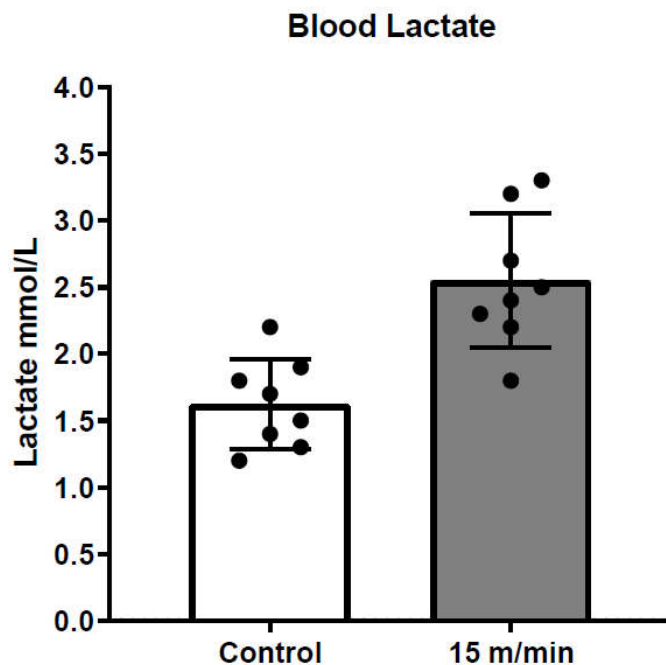


Fig. 1. Differences in blood lactate concentration. There was no statistical difference between groups (t Student: $P=0.3096$).

2.3. Contextual fear conditioning (CFC)

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25×25 cm grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart). One day before conditioning, animals were exposed to the conditioning chamber for 5 minutes (habituation). In the training session, rats were placed in the conditioning chamber for 3 minutes before receiving two 0.5 mA footshocks during 2 seconds, separated by a 30 seconds interval; they were kept in the conditioning context for an additional 30 seconds before returning to their home cages. In the reactivation/extinction session, 48 hours after training, animals were re-exposed to the same conditioning chamber without the footshock, for 5, 15 or 30 minutes. In the test session, animals were re-exposed in the same context for 4 minutes, 24 hours after the last reactivation session.

2.4. Behavioral measurement

Freezing behavior was used as a memory index, being registered with a stop watch in real time by an experienced observer that was unaware of the experimental conditions. Freezing was defined as total cessation of all movements except those required for respiration. The freezing behavior time

was shown in the graphs through the percentage of total immobility time during the testing sessions [31].

2.5. Open field

The anxiety behavior was assessed in the open field chamber, a box with 49 cm height, 60 × 60 cm walls, made of wood and with distinct visual cues in the walls, with the floor divided into 25 equal rectangles, or “sectors”. During the experiment, a low-intensity light of 25 lux was equally distributed into the chamber. The behavior was recorded by video tracking and processed offline. The exercise session was performed 24 hours or 10 minutes before the open field test. During the 5 minutes session, we measured the time spent in the periphery and the center of the apparatus.

2.6. Statistical analysis

The data were expressed as mean ± SEM. The statistical analyses were performed using one sample *t*-test, unpaired *t*-test, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher post hoc test when necessary. All data used the confidence level of 95% and the values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. All experiments were randomized and performed blindly.

3. Results:

3.1. Single physical exercise session promotes different results on reconsolidation of an aversive memory.

We first examined how a single exercise session affects aversive memory reconsolidation. After 3 days of habituation to the treadmill, the animals were habituated for 5 minutes in the fear conditioning context. On day 6, all animals were fear conditioned, and then divided into 4 groups: one control group, which was not submitted to physical exercise neither before nor after the aversive memory reactivation session (Control); a group that was submitted to the physical exercise protocol 24 hours before the reactivation (24 h Before); a group that was submitted to physical exercise 10 minutes before the reactivation session (10 min Before); and a group that performed exercise immediately after memory (After). On day 8, all animals were reactivated for 5 minutes in the training context. The animals were tested in the training context during 4 minutes on day 10 (Fig. 2A).

During memory reactivation, the animals that performed exercise 24 hours before showed significant lower freezing percentage levels compared to all the other experimental groups (Fig. 2B;

one-way ANOVA: $F_{(3-30)} = 3.385$, $P = 0.0308$; followed by Fisher post hoc, $P < 0.05$). During the test session, the groups that exercised 24 hours and 10 minutes before reactivation expressed lower freezing levels compared to the control group (Fig. 2C; one-way ANOVA: $F_{(3-30)} = 11.91$, $P < 0.0001$; followed by Fisher post hoc, $P < 0.05$). Interestingly, physical exercise performed immediately after reactivation expressed higher freezing levels compared to the control group (Fig. 2C; one-way ANOVA: $F_{(3-30)} = 11.91$, $P < 0.0001$; followed by Fisher post hoc, $P = 0.0163$). These results suggest that, depending on the moment in which physical exercises is performed, it affects distinctly the memory outcome.

The animals in the 24 h Before group showed an expression of fear lower than the other groups at the time of reactivation, suggesting that the animals could be less anxious after performing the physical exercise protocol, which could explain the reduced fear behavior during reactivation. To address this question, we decided to assess the animal's anxiety using the open field test. Anxious behavior in rodents can be accessed through the time spent in the periphery of the open field apparatus. During the open field session, the animals did not show significant differences in the time spent on the periphery of the apparatus (Fig. 3B; one-way ANOVA: $F_{(2-17)} = 0.3948$, $P = 0.6798$), suggesting that the fear reduction found in the groups subjected to physical exercises before reactivation is not mediated by a decrease in the anxiety level.

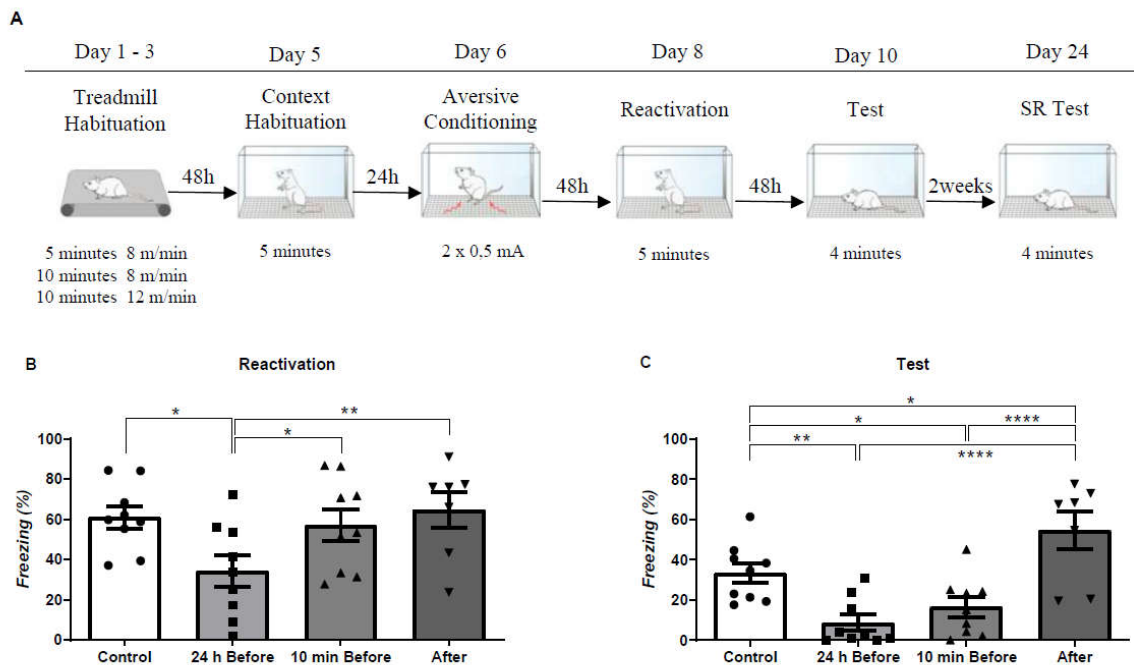


Fig. 2. Single physical exercise session promotes different results on reconsolidation of an aversive memory. A: Experimental design. B: Percentage of freezing expression during the 5 minutes of

reactivation. C: Percentage of freezing expression throughout the test session. Data are mean \pm S.E.M. One-way ANOVA followed by Fisher post hoc (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

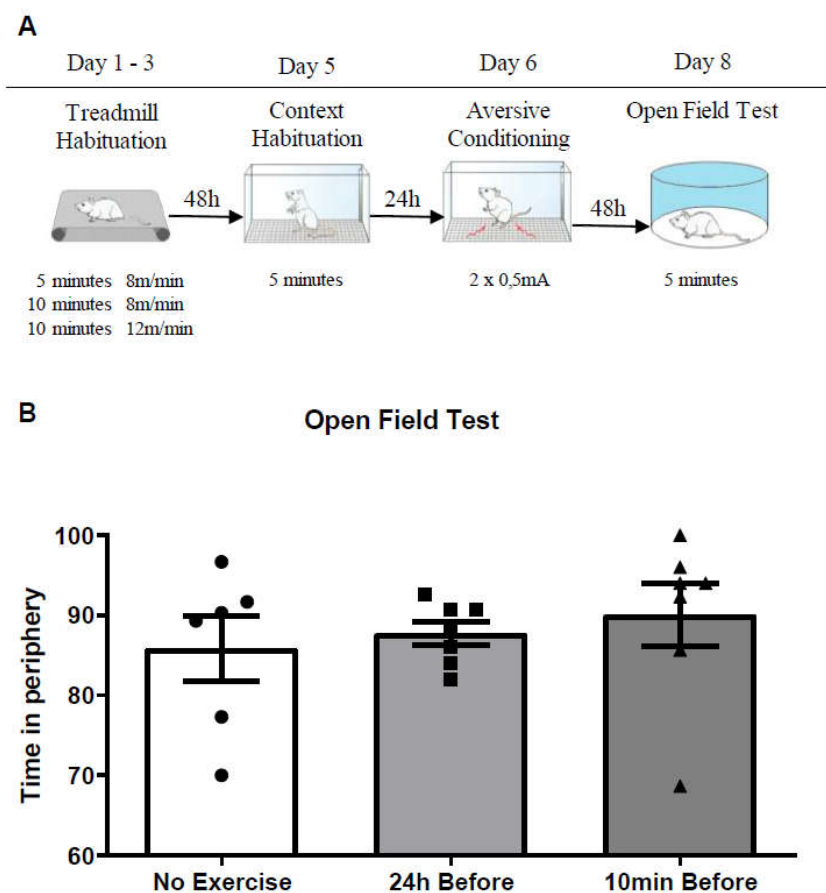


Fig. 3. The time allocation of a single physical exercise session prior the reactivation does not interfere with anxiety in the open field task. A: Experimental design. B: Percentage of time in the periphery. No significant differences were found (one-way ANOVA).

3.2. Single physical exercise session promotes different results on extinction of an aversive memory.

We next asked whether physical exercise performed at distinct time-points would affect extinction. To assess it, the animals were manipulated and underwent a time of habituation to the treadmill for 3 consecutive days in order to prevent any change caused by the novelty to the apparatus. On day 5, all animals were used to the aversive training context. On day 6, all animals were subjected to context-aversive conditioning, where they received two 0.5 mA footshocks. The animals were then divided into the same 4 groups, Control, 24 h Before, 10 min Before, and After. All animals were reactivated returning to the training context for 30 minutes on day 8, and tested on

day 10 (Fig. 4A).

During the extinction session, no significant differences were found in the freezing expression among the groups (Fig. 4B; two-way RM ANOVA: $F_{(3-16)} = 0.924$, $P = 0.451$). During the test, the After group demonstrated a higher freezing than all the other treatment groups and did not show attenuation of fear induced by longer reactivation (Fig. 4C; one-way ANOVA: $F_{(3-16)} = 9.131$; $P = 0.0009$; followed by Fisher post hoc, $P < 0.05$). This result suggests that memory extinction is impaired when a physical exercise is performed immediately after a long context exposure.

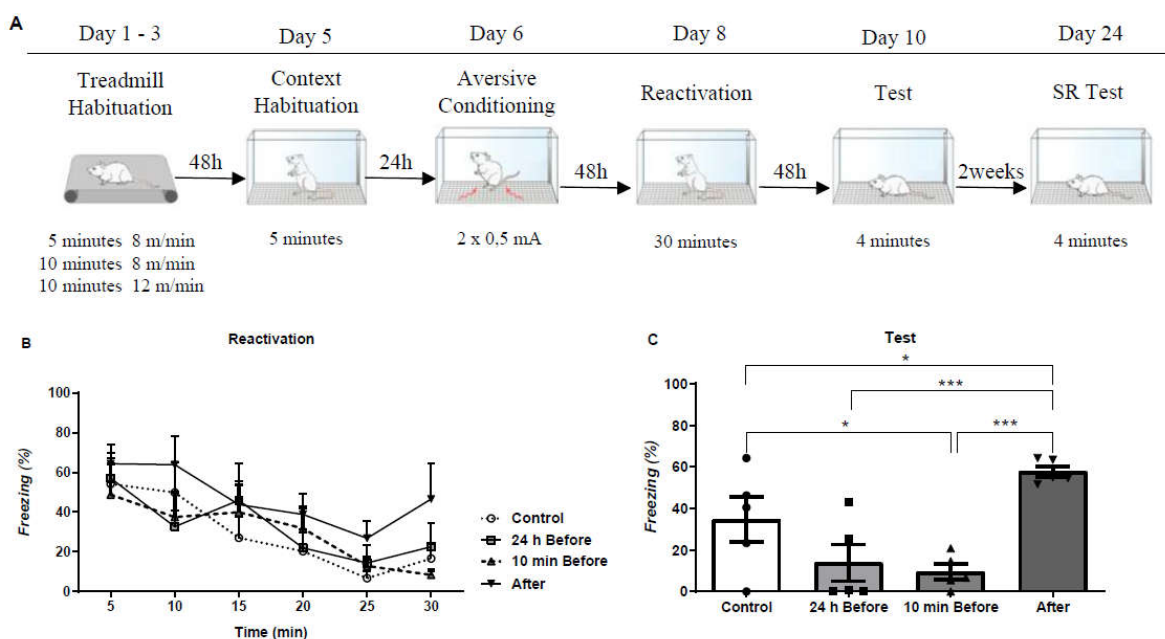


Fig. 4. Single physical exercise session promotes different results on extinction of an aversive memory. A: Experimental Design. B: Percentage of freezing expression during the 30 minutes of the extinction session. C: Percentage of freezing expression throughout the test session. Data are mean \pm S.E.M. One-way or Two-way ANOVA followed by Fisher post hoc (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

3.3. Single physical exercise session promotes different results on reconsolidation of an aversive memory induced by an intermediate reactivation.

Here we tested how the time-point of a single exercise session interacts with the reactivation of a context-aversive memory with an intermediate duration. All animals were handled and underwent a time of habituation to the treadmill for 3 consecutive days in order to prevent any changes caused by the novelty to the apparatus. On day 5, all animals were habituated to the aversive training context.

On day 6, animals were subjected to context-aversive conditioning, where they received two 0.5mA footshocks. The animals were divided into the 4 groups and were reactivated for 15 min on day 8 and tested for 15 min on day 10 (Fig. 5A).

During the 15 minutes reactivation, Two-way RM ANOVA revealed no interaction between the factors Time and Groups ($F_{(12-96)} = 9.68$, $P = 0.464$). The animals in the 24 h Before showed lower freezing levels than the Control from minute 3 to minute 6 (Fig. 5B; Two-way RM ANOVA, Group factor: $F_{(3-24)} = 4.322$, $P = 0.0143$; followed by Fisher post hoc, $P = 0.0202$). Also, the After showed higher freezing levels than the Control from minute 9 to minute 12 (Fig. 5B; Two-way RM ANOVA: $F_{(3-24)} = 4.322$, $P = 0.0143$; followed by Fisher post hoc $P = 0.0218$). During the test, the 24 h Before group showed reduced freezing compared to Control (Fig. 5C; One-way ANOVA: $F_{(3-24)} = 7.884$, $P < 0.001$; followed by Fisher post hoc $P = 0.0097$), while the After expressed a higher freezing compared to all the other treatment groups (Fig. 5C; One-way ANOVA: $F_{(3-24)} = 7.884$, $P < 0.001$; followed by Fisher post hoc $P < 0.05$). These results suggest that physical exercise might show an opposite effect depending on the time through which it is performed surrounding memory reactivation.

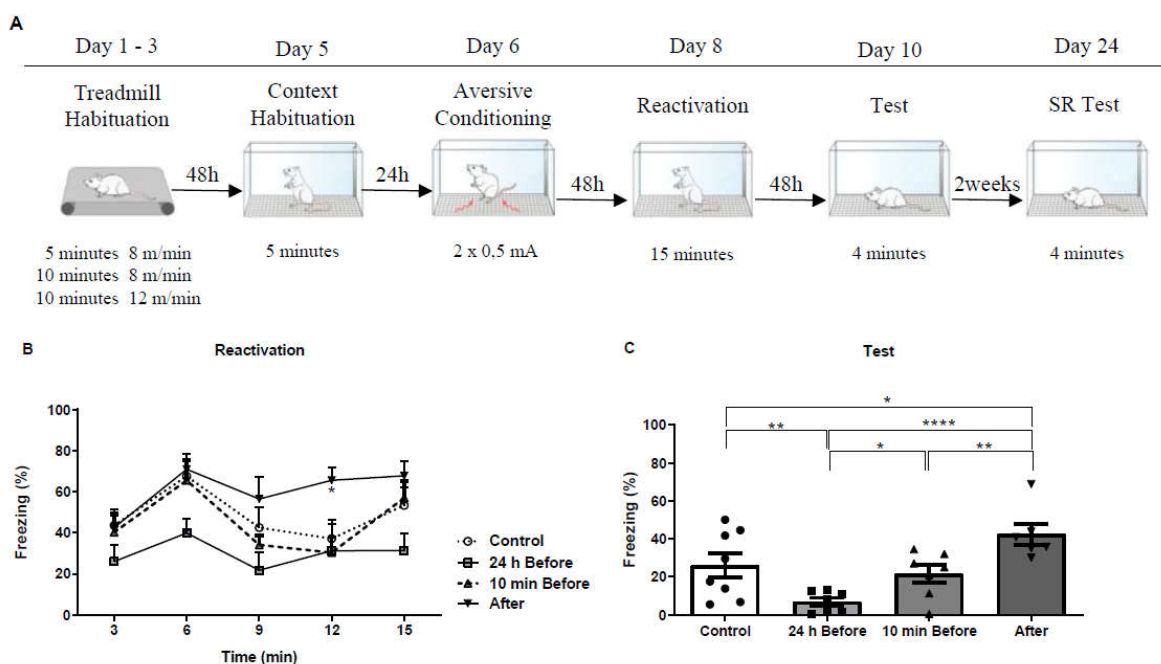


Fig. 5. Single physical exercise session promotes different results on reconsolidation of an aversive memory induced by an intermediate reactivation. A: Experimental Design. B: Percentage of freezing expression during the 15 minutes of reactivation. C: Percentage of freezing expression throughout

the test session. Data are mean \pm S.E.M. One-way or Two-way ANOVA followed by Fisher post hoc (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

4. Discussion:

We aimed to investigate the role of physical exercise performed at distinct time-points on memory reconsolidation and extinction. Our results demonstrate that the moment in which the physical exercise is delivered is crucial to the memory outcome. A bout of physical exercise of low-intensity 24 hours and 10 minutes before the reactivation reduces the freezing expression in the test. However, when the low-intensity physical exercise is performed immediately after, it enhances fear memory in the test.

The intensity of the exercises was chosen based on the behavior of the animals. We sought to establish an intensity in which it did not promote stress behavior or make animals give up running on the treadmill. Moreover, this protocol does not require an aversive stimulus boost in the treadmill row in order to induce animals to perform the task. Based on previous studies [29], the intensity of the physical exercise session was established as low intensity, with 15 minutes of running at 15 m/min, not affecting the blood lactate concentration (Fig. 1).

Physical exercise performed 24 hours before 5-min reactivation demonstrates an attenuated fear expression in the reactivation session compared to the other groups (Fig. 2B). The same result was demonstrated during 15-minute of reexposure (Fig. 5B). It raises the possibility that physical exercise performed 24 hours before reactivation could decrease anxiety levels. However, no difference was found in the time spent at the periphery of the open field task, demonstrating that all groups were in the same conditions of anxiety at the moment of the reactivation (Fig. 3). Interestingly, these groups also presented lower freezing levels in the test. It suggests that the fearless state presented during reactivation might be incorporated in the background of the original fear memory, updating it to a less aversive level shown in the subsequent test.

Another interesting general observation is the fact that, regardless of the reactivation length, if the physical exercise is performed after reactivation, animals tend to express higher freezing levels in the test. Although the behavioral outcome is the same, the interpretation is quite different. A long 30 minutes lead memory to extinction, thus, the physical exercise seems to be impairing the consolidation of the extinction training. On the other hand, a short 5-minutes reactivation leads memory to enter a labile state, in which the physical exercises would be acting enhancing its reconsolidation. Regarding the intermediate 15-minutes reactivation, it is harder to pinpoint which process is taking place.

It has been shown that a single bout of physical exercise increases the concentration of the

neurotransmitter dopamine and norepinephrine in the hippocampus [31, 32]. Considering that contextual fear conditioning relies on the hippocampus, and norepinephrine impairs memory retrieval [33; 34; 35] and enhance reconsolidation [36], this could be, at least in part, one of the mechanisms underpinning our findings. A recent study has shown that the rewarding propriety of methylphenidate (that increase the norepinephrine and dopamine levels) injected 10 min before reactivation updates the previously acquired fear memory to a positive/less aversive form, so that animals no longer express a robust freezing response in subsequent tests. It is possible that the physical exercise performed 10 min before reactivation also provides some kind of positive state that could modify the original fear memory during the reactivation, turning it less negative.

5. Conclusion:

Our results demonstrate that the time-point in which a low-intensity physical exercise is performed plays an essential role in the fear response both during reactivation and in the test. Moreover, depending on the reactivation length, the physical exercise can differentially affect memory extinction and reconsolidation. The effects of physical exercise on the reactivation of an aversive memory are dependent on the time of performance of the exercise session around the reactivation, regardless of the duration of the reactivation session. A bout of physical exercise performed 24 hours or 10 minutes before the reactivation impairs the reconsolidation and facilitates the extinction. However, when the physical exercise is delivered immediately after reactivation, it facilitates the reconsolidation and impairs extinction.

In the last decade, several studies have reported that fear memories may be attenuated by updating its strength during the plastic state induced by reactivation. Here, we found a non-invasive intervention that might be used as a strategy to deal with traumatic memories, when performed in the appropriate time-point combined with conventional therapies.

6. Bibliograph:

[01] Spear & Mueller (1984). Consolidation as a function of retrieval. *Memory Consolidation Psychobiology of Cognition*. 111-47.

[02] L. De Oliveira Alvares, A.P. Crestani, L.F. Cassini, J. Haubrich, F. Santana, J. A. Quillfeldt. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. 244 (2013) 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>

[03] K. Nader, G. Schafe, & J. Le Doux. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 406 (2000) 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>

[04] M.H. Monfils, E.A. Holmes. Memory boundaries: opening a window inspired by reconsolidation to treat anxiety, trauma-related, and addiction disorders. *The Lancet Psychiatry*. 5 (2018) 1032–1042. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30270-0](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30270-0)

[05] S. Okuda, B. Roozendaal, J.L. McGaugh. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101 (3) (2004) 853-858. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307803100>

[06] B. Roozendaal, J. L. McGaugh. Memory modulation. *Behavior Neuroscience*. 125 (2011) 797-824. <https://doi.org/10.1037/a0026187>

[07] R.G. Parsons, K. J. Ressler. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*. 16 (2013) 146-153. <https://doi.org/10.1038/nn.3296>

[08] M.E. Bouton. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry*. 52 (2002) 976–986. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(02\)01546-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01546-9)

[09] R.A. Rescorla, C.D. Heth, Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. 1 (1975) 88–96. <https://doi.org/10.10370097-7403.1.1.88>

[10] G.E. Archbold, M.E. Bouton., K. Nader. Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. *European Journal of Neuroscience*. 31 (2010) 1303–1311. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07161.x>

[11] M.E. Bouton, N.E. Winterbauer, T.P. Todd. Relapse processes after the extinction of instrumental learning: renewal, resurgence, and reacquisition. *Behavioural Processes*. 90 (2012) 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.03.004>

- [12] L.R. Bevilaqua, J.H. Medina, I. Izquierdo, M. Cammarota. Reconsolidation and the fate of consolidated memories. *Neurotox Res.* 14 (2008) 353-58. <https://doi.org/10.1007/BF03033859>
- [13] D.S. Albeck, K. Sano, G.E. Prewitt, L. Dalton. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Mechanisms of aging and development.* 132 (2006) 560-567. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.11.008>
- [14] E.T. Ang, G.S. Dawe, P.T.H. Wong, S. Moolchhala, Y.K. Ng. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain research.* 1113 (2006) 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.023>
- [15] S.K. Segal, C.W. Cotman, L.F. Cahill. Exercise-Induced Noradrenergic Activation Enhances Memory Consolidation in Both Normal Aging and Patients with Amnesic Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis.* 32 (4): (2011) 1011–1018. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121078>
- [16] M. Radahmadi, H. Alaei, M.R. Sharifi, N. Hosseini. Effect of forced exercise and exercise withdrawal on memory, serum and hippocampal corticosterone levels in rats. *Exp Brain Res.* 233 (2015) 2789–2799. <https://doi.org/10.1007/s00221-015-4349-y>
- [17] E.W. Griffin, R.G. Bechara, A.M. Birch, A.M. Kelly. Exercise Enhances Hippocampal-Dependent Learning. *Hippocampus.* 19 (2009) 973–980. <https://doi.org/10.1002/hipo.20631>
- [18] R.M. O'Callaghan, R. Ohle, A.M. Kelly. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial and no spatial learning. *Behavioural brain research.* 176 (2007) 362-366. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.018>
- [19] A.S. Aguiar Jr, A.A. Castro, E.L. Moreira, V. Glaser, A.R.S. Santos, C.I. Tasca, A. Latini, R.D.S. Prediger. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mech Ageing Dev.* 132 (2011):560-7 <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.09.005>
- [20] J.S. Kang. Exercise copes with prolonged stress-induced impairment of spatial memory performance by endoplasmic reticulum stress. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* 19 (3) (2015) 191-197. <https://doi.org/10.5717/jenb.2015.15080705>
- [21] C.H. Chae, S.L. Jung, S.H. An, B.Y. Park, T.W. Kim, S.W. Wang, J.H. Kim, H.C. Lee, H.T. Kim. Swimming exercise stimulates neurogenesis in the subventricular zone via increase in synapsin

i and nerve growth factor levels. *Biol. Sport.* 31 (2014) 309-314. <https://doi.org/10.5604/20831862.1132130>

[22] E.W. Griffin, S. Mullally, C. Foley, S.A. Warmington, S.M. O'Mara, A.M. Kelly. Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiology and behavior.* 104 (2011) 934-941. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.06.005>

[23] J.A. Kennard, D.S. Woodruff-Pak. A comparison of low- and high-impact forced exercise: Effects of training paradigm on learning and memory. *Physiol Behav.* 106 (4) (2011) 423–427. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.02.023>

[24] S. Wang, L. Chen, L. Zhang, C. Huang, Y. Xiu, F. Wang, C. Zhou, Y. Luo, Q. Xiao, Y. Tang. Effects of Long-Term Exercise on Spatial Learning, Memory Ability, and Cortical Capillaries in Aged Rats. *Med Sci Monit.* 21 (2015) 945-954. <https://doi.org/10.12659/MSM.893935>

[25] J. Siette, A.C. Reichelt, R.F. Westbrook. A bout of voluntary running enhances context conditioned fear, its extinction, and its reconsolidation. *Learning and memory.* 21(2) (2014) 73-81. <https://doi.org/10.1101/lm.032557.113>

[26] M.L. Mustroph, D.J. Stobaugh, D.S. Miller, E.K. DeYoung, J.S. Rhodes. Wheel running can accelerate or delay extinction of conditioned place preference for cocaine in male C57BL/6J mice depending on timing of wheel access. *Eur J Neurosci.* 34(7) (2011) 1161–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07828.x>

[27] W.J. Lynch, K.B. Piehl, G. Acosta, A.B. Peterson, S.E. Hemby. Aerobic exercise attenuates reinstatement of cocaine-seeking behavior and associated neuroadaptations in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry.* 68(8) (2010) 774–777. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.022>

[28] M.A. Casagrande, J. Haubrich, L.K. Pedraza, B. Popik, J.A. Quillfeldt, L.O. Alvares. Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiol Learn Mem.* 150 (2018) 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.03.002>

[29] D. Scopel, C. Fochesatto, H. Cimarosti, M. Rabbo, A. Belló-Klein, C. Salbego, C.A. Netto, I.R. Siqueira. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Research Bulletin.* 17 (2006) 155-159. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.08.011>

- [30] F.B. Manchado, C.A. Gobatto, R.V.L. Contarteze, M. Papoti, M.A.R. Mello. The maximal lactate steady state is ergometer-dependent in experimental model using rats. *Rev Bras Med Esporte*. 12 (5) <https://doi.org/10.1590/S1517-86922006000500007>
- [31] L.S. Vargas, B.H.S. Neves, R. Roehrs, I. Izquierdo, P.B. Mello-Carpes. One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. *Behav Brain Res*. 329 (2017) 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.050>
- [32] L.S. Vargas, K. R. Lima, B.P. Ramborger, R. Roehrs, I. Izquierdo, P.B. Mello-Carpes. Catecholaminergic hippocampal activation is necessary for object recognition memory persistence induced by one-single physical exercise session. *Behav Brain Res*. 379 (2020) 112356. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112356>
- [33] D.J. de Quervain, A. Aerni, B. Roozendaal. Preventive effect of beta-adrenoceptor blockade on glucocorticoid-induced memory retrieval deficits. *Am J Psychiatry*. 164 (6) (2007) 967-9. <https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.6.967>
- [34] D.M. Diamond, A.M. Campbell, C.R. Park, J.C. Woodson, C.D. Conrad, A.D. Bachstetter, R.F. Mervis. Influence of Predator Stress on the Consolidation versus Retrieval of Long-Term Spatial Memory and Hippocampal Spinogenesis. *Hippocampus*. 16 (2006) 571–576. <https://doi.org/10.1002/hipo.20188>
- [35] D.J. de Quervain, B. Roozendaal, J.L. McGaugh. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*. 6695 (1998) 787-90. <https://doi.org/10.1038/29542>
- [36] L. Gazarini, C.A. Stern, A.P. Carobrez, L.J. Bertoglio. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting alpha1- and beta-adrenergic receptors. *Learn Mem*. 20 (2013) 210–219. <https://doi.org/10.1101/lm.030007.112>

4. DISCUSSÃO

Nosso objetivo foi investigar o papel do exercício físico realizado em momentos distintos na reconsolidação e extinção da memória. Os resultados aqui obtidos demonstram que o momento em que o exercício físico é realizado é crucial para o desfecho da memória. Uma sessão de exercício físico de baixa intensidade 24 horas e 10 minutos antes da reativação reduz a expressão de *freezing* no teste. No entanto, quando o exercício físico de baixa intensidade é realizado imediatamente após, aumenta a memória do medo no teste.

A intensidade dos exercícios foi escolhida com base no comportamento dos animais. Buscou-se estabelecer uma intensidade em que não promovesse comportamento de estresse ou fizesse os animais desistirem de correr na esteira. Além disso, este protocolo não requer um aumento de estímulo aversivo na linha da esteira para induzir os animais a realizar a tarefa. Com base em estudos anteriores (Scopel et al. 2006), a intensidade da sessão de exercício físico foi estabelecida como de baixa intensidade, com 15 minutos de corrida a 15 m/min, não afetando a concentração de lactato sanguíneo (Fig. 1).

O exercício físico realizado 24 horas antes da reativação de 5 minutos resulta em uma expressão de medo atenuada na sessão de reativação em comparação com os outros grupos (Fig. 2B). O mesmo resultado foi demonstrado durante 15 minutos de reexposição (Fig. 5B). Este achado levanta a hipótese de que o exercício físico realizado 24 horas antes da reativação possa diminuir os níveis de ansiedade. No entanto, não foi encontrada diferença no tempo gasto na periferia da tarefa de campo aberto, demonstrando que todos os grupos estavam nas mesmas condições de ansiedade no momento da reativação (fig. 3). Curiosamente, esses grupos também apresentaram menores níveis de congelamento no teste. Sugere que o estado destemido apresentado durante a reativação pode ser incorporado ao fundo da memória original do medo, atualizando-a para um nível menos aversivo mostrado no teste subsequente.

Outra observação geral interessante é o fato de que, independentemente da duração da reativação, se o exercício físico for realizado após a reativação, os animais tendem a expressar maiores níveis de congelamento no teste. Embora o resultado comportamental seja o mesmo, a interpretação é bem diferente. Reativações longas de 30 minutos levam a memória à extinção, assim, o exercício físico parece estar prejudicando a consolidação do treino de extinção. Por outro lado, reativações curtas de 5 minutos levam a memória a entrar em um estado lábil, no qual os exercícios físicos estariam atuando potencializando sua reconsolidação. Em relação à reativação com duração intermediária de 15 minutos, o mesmo padrão de comportamento é expressado, embora seja mais difícil identificar qual processo está ocorrendo.

Foi demonstrado que uma única sessão de exercício físico aumenta a concentração do neurotransmissor dopamina e norepinefrina no hipocampo (Vargas *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2020). Considerando que o condicionamento contextual do medo depende do hipocampo, e a norepinefrina prejudica a recuperação da memória (de Quervair, Aerni, Roozendaal, 2007; Diamond *et al.*, 2006; de

Quervair, Roozendaal, McGaugh, 1998) e aumenta a reconsolidação (Gazarini *et al.*, 2013), este poderia ser, pelo menos em parte, um dos mecanismos subjacentes aos nossos achados. Um estudo recente mostrou que a propriedade recompensadora do metilfenidato (que aumenta os níveis de norepinefrina e dopamina) injetado 10 minutos antes da reativação atualiza a memória de medo previamente adquirida para uma forma positiva/menos aversiva, de modo que os animais não expressam mais uma resposta de congelamento robusta em testes subsequentes. É possível que o exercício físico realizado 10 minutos antes da reativação também forneça algum tipo de estado positivo que poderia modificar a memória original do medo durante a reativação, tornando-a menos negativa.

5. CONCLUSÃO

O exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante promove diferentes respostas sobre a reconsolidação e extinção de memórias aversivas contextuais em ratos *wistar*, dependendo do tempo de realização em torno de sua reativação:

- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada 24 horas antes de uma curta reativação de uma memória aversiva contextual prejudica sua reconsolidação.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada 10 minutos antes de uma curta reativação de uma memória aversiva contextual prejudica sua reconsolidação.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada imediatamente após uma curta reativação de uma memória aversiva contextual favorece sua reconsolidação.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada 24 horas antes de uma tarefa de campo aberto, não promove mudanças no comportamento relacionadas à ansiedade em ratos *wistar*.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada 24 horas antes de uma longa reativação de uma memória aversiva contextual favorece sua extinção.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada 10 minutos antes de uma longa reativação de uma memória aversiva contextual favorece sua extinção.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada imediatamente após uma longa reativação de uma memória aversiva contextual, prejudica sua extinção.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada 24 horas antes de uma reativação com duração intermediária de uma memória aversiva contextual, atenua a expressão de freezing de ratos *wistar* durante o teste.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada 10 minutos antes de uma reativação com duração intermediária de uma memória aversiva contextual, atenua a expressão de freezing de ratos *wistar* durante o teste.
- Uma sessão única de exercício físico de baixa intensidade na esteira rolante, realizada imediatamente após uma reativação com duração intermediária de uma memória aversiva contextual, acentua a expressão de freezing de ratos *wistar* durante o teste.

Nossos resultados demonstram que o momento em que um exercício físico de baixa intensidade é realizado desempenha um papel essencial na resposta de medo tanto durante a reativação quanto no teste. Além disso, dependendo da duração da reativação, o exercício físico pode afetar diferencialmente a extinção e a reconsolidação da memória. Os efeitos do exercício físico na reativação de uma memória aversiva são dependentes do tempo de realização da sessão de exercício em torno da reativação, e independem da duração da sessão de reativação. Uma sessão de exercício físico realizada 24 horas ou 10 minutos antes da reativação prejudica a reconsolidação e facilita a extinção. No entanto, quando o exercício físico é realizado imediatamente após a reativação, facilita a reconsolidação e prejudica a extinção.

Na última década, vários estudos relataram que as memórias de medo podem ser atenuadas pela atualização de sua força durante o estado plástico induzido pela reativação. Aqui, encontramos uma intervenção não invasiva que pode ser usada como estratégia para lidar com memórias traumáticas, quando realizada no momento adequado combinado com terapias convencionais.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar Jr AS, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos ARS, Tasca CI, Latini A, Prediger RDS. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mech Ageing Dev.* 132, 560-7. 2011.
- Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behavioural Brain Research.* 168, 345-348. 2006.
- Ang ET, Dawe GS, Wong PTH, Moochhala S, Ng YK. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Research.* 1113, 186–193. 2006.
- Archbold GE, Bouton ME, Nader K. Evidence for the persistence of contextual fear memories following immediate extinction. *European Journal of Neuroscience.* 31, 1303–1311. 2010.
- Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Reconsolidation and the fate of consolidated memories. *Neurotox Res.* 14, 353-58. 2008.
- Bouchet CA, Lloyd BA, Loetz EC, Farmer CE, Ostrovskyy M, Haddad N, Foright RM, Greenwood B. Acute exercise enhances the consolidation of fear extinction memory and reduces conditioned fear relapse in a sex-dependent manner. *Learning Memory.* 24, 358-368. 2017.
- Bouton ME. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry.* 52, 976–86. 2002.
- Bouton ME, Winterbauer NE, Todd TP. Relapse processes after the extinction of instrumental learning: renewal, resurgence, and reacquisition. *Behavioural Processes.* 90, 130–141. 2012.
- Casagrande MA, Haubrich J, Pedraza LK, Popik B, Quillfeldt JA, Alvares LO. Synaptic consolidation as a temporally variable process: Uncovering the parameters modulating its time-course *Neurobiol Learn Mem.* 150, 42-47. 2018.

- Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Kim TW, Wang SW, Kim JH, Lee HC, Kim HT. Swimming exercise stimulates neurogenesis in the subventricular zone via increase in synapsin i and nerve growth factor levels. *Biol Sport*. 31, 309-314. 2014.
- de Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. 244, 42–48. 2013.
- de Quervain DJ, Aerni A, Roozendaal B. Preventive effect of beta-adrenoceptor blockade on glucocorticoid-induced memory retrieval deficits. *Am J Psychiatry*. 164, 967-9. 2007.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*. 6695, 787-90. 1998.
- Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Woodson JC, Conrad CD, Bachstetter AD, Mervis RF. Influence of Predator Stress on the Consolidation versus Retrieval of Long-Term Spatial Memory and Hippocampal Spinogenesis. *Hippocampus*. 16, 571-576. 2006.
- Falls WA, Raposa JH, Macaulay CM. Voluntary exercise improves both learning and consolidation of cued conditioned fear in C57 mice. *Behavioural Brain Research*. 207, 321-331. 2010.
- Faria RS, Bereta ALB, Reis GHT, Santos LBB, Pereira MSG, Cortez PJO, Dias EV, Moreira DAR, Trzesniak C, Sartori CR. Effects of swimming exercise on the extinction of fear memory in rats. *J Neurophysiol*. 120, 2649-2653. 2018.
- Gazarini L, Stern CA, Carobrez AP, Bertoglio LJ. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting alpha1- and beta-adrenergic receptors. *Learn Mem*. 20, 210-219. 2013.
- Greenwood BN, Strong PV, Foley TE, Fleshner M. A behavioral analysis of the impact of voluntary physical activity on hippocampus-dependent contextual conditioning. *Hippocampus*. 19, 988-1001. 2009.
- Griffin EW, Bechara RG, Birch AM, Kelly AM. Exercise Enhances Hippocampal-Dependent Learning. *Hippocampus*. 19, 973-980. 2009.



- Griffin EW, Mullally S, Foley C, Warmington SA, O'Mara SM, Kelly AM. Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiology and behavior*. 104, 934-941. 2011.
- Kang JS. Exercise copes with prolonged stress-induced impairment of spatial memory performance by endoplasmic reticulum stress. *J Exerc. Nutr. Biochem*. 19, 191-197. 2015.
- Kennard JA, Woodruff-Pak DS. A comparison of low- and high-impact forced exercise: Effects of training paradigm on learning and memory. *Physiol Behav*. 106, 423-427. 2011.
- Kim YP, Kim HB, Jang MH, Lim BV, Kim YJ, Kim H, Kim SS, Kim EH, Kim CJ. Magnitude a time dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the DG rats. *Physiology & Biochemistry*. 24, 114-117. 2003.
- Liu YF, Chen SI, Yu L, Kuo YM, Wu FS, Chuang JI, Liao PC, Jen CJ. Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. 90, 81-89. 2008.
- Lynch WJ, Piehl KB, Acosta G, Peterson AB, Hemby SE. Aerobic exercise attenuates reinstatement of cocaine-seeking behavior and associated neuroadaptations in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*. 68(8), 774-777. 2010.
- Monfils MH, Holmes EA. Memory boundaries: opening a window inspired by reconsolidation to treat anxiety, trauma-related, and addiction disorders. *The Lancet Psychiatry*. 5, 1032-1042. 2018.
- Mustroph ML, Stobaugh DJ, Miller DS, DeYoung EK, Rhodes JS. Wheel running can accelerate or delay extinction of conditioned place preference for cocaine in male C57BL/6J mice depending on timing of wheel access. *Eur J Neurosci*. 34(7), 1161-1169. 2011.
- Nader K, Schafe G, Le Doux J. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 406, 722-726. 2000.
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial and no spatial learning. *Behavioural brain research*. 176, 362-366. 2007.

- Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(3), 853-858. 2004.
- Parsons RG, Ressler KJ. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*. 16, 146-153. 2013.
- Radahmadi M, Alaei H, Sharifi MR, Hosseini N. Effect of forced exercise and exercise withdrawal on memory, serum and hippocampal corticosterone levels in rats. *Exp Brain Res*. 233, 2789–2799. 2015.
- Rescorla RA, Heth CD. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. 1, 88-96. 1975.
- Roozendaal B, McGaugh JL. Memory modulation. *Behavior Neuroscience*. 125, 797-824. 2011.
- Schmolesky MT, Webb DL, Hansen RA. The Effects of Aerobic Exercise Intensity and Duration on Levels of Brain- Derived Neurotrophic Factor in Healthy Men. *Journal of Sports Science and Medicine*. 12, 502-511. 2013.
- Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Research Bulletin*. 17, 155-159. 2006.
- Segal SK, Cotman CW, Cahill LF. Exercise-Induced Noradrenergic Activation Enhances Memory Consolidation in Both Normal Aging and Patients with Amnesic Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis*. 32(4), 1011-1018. 2011.
- Siette J, Reichelt AC, Westbrook RF. A bout of voluntary running enhances context conditioned fear, its extinction, and its reconsolidation. *Learning and memory*. 21(2), 73-81. 2014.
- Spear & Mueller. Consolidation as a function of retrieval. *Memory Consolidation Psychobiology of Cognition*. 111-47. 1984.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*. 2, 266-270. 1999a.

- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 13427-13431. 1999b.
- Vargas LS, Lima KR, Ramborger BP, Roehrs R, Izquierdo I, Mello-Carpes PB. Catecholaminergic hippocampal activation is necessary for object recognition memory persistence induced by one-single physical exercise session. *Behav Brain Res*. 379,112356. 2020.
- Vargas LS, Neves BHS, Roehrs R, Izquierdo I, Mello-Carpes PB. One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. *Behav Brain Res*. 329, 120-126. 2017.
- Wang S, Chen L, Zhang L, Huang C, Xiu Y, Wang F, Zhou C, Luo Y, Xiao Q, Tang Y. Effects of Long-Term Exercise on Spatial Learning, Memory Ability, and Cortical Capillaries in Aged Rats. *Med Sci Monit*. 21, 945-954. 2015.
- Weinberg L, Hasni A, Shinohara M, Duarte A. A single bout of resistance exercise can enhance episodic memory performance. *Acta psychologica*. 153, 13-19. 2014.
- Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S. High impact running improves learning. *Neurobiology of Learning and Memory*. 87, 597–609. 2007.

7. ANEXOS:

Carta de aprovação do comitê de ética:

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRO-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:


Número: 37354
Título: MODULAÇÃO DO VOLUME E INTENSIDADE DE EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A AQUISIÇÃO, CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA

Vigência: 15/06/2019 à 15/06/2021

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:
LUCAS DE OLIVEIRA ALVARES - coordenador desde 15/06/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 15/07/2019 - Auditório do Plenarinho - andar Térreo do Prédio da Reitoria, Campus Centro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 550 ratos Wistar machos com 60-90 dias, provenientes do CREAL - UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 9 de Agosto de 2019


ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

1