

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

LARA MONTEIRO ZANETTI MANSK

FORMAÇÃO DE MÚLTIPLAS MEMÓRIAS  
HIPOCAMPO-DEPENDENTES: O APRENDIZADO  
COMO INTERFERÊNCIA

BELO HORIZONTE – MG  
2020

LARA MONTEIRO ZANETTI MANSK

FORMAÇÃO DE MÚLTIPLAS MEMÓRIAS HIPOCAMPO-DEPENDENTES: O  
APRENDIZADO COMO INTERFERÊNCIA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira

043

Mansk, Lara Monteiro Zanetti.

Formação de múltiplas memórias hipocampo-dependentes: o aprendizado como interferência [manuscrito] / Lara Monteiro Zanetti Mansk. – 2020.

89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Hipocampo. 3. Memória. 4. Neurogênese. I. Pereira, Grace Schenatto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

# "FORMAÇÃO DE MÚLTIPLAS MEMÓRIAS HIPOCAMPO-DEPENDENTES: O APRENDIZADO COMO INTERFERÊNCIA"

**LARA MONTEIRO ZANETTI MANSK**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 12 de março de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROF. DR. VICTOR RODRIGUES SANTOS**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. ANTÔNIO JAEGER**  
FAFICH/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DRA. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 12 de março de 2020**

## AGRADECIMENTO

*Primeiramente, agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG por financiarem a pesquisa básica nesse país.*

*À UFMG e à PGFisFar pelas oportunidades oferecidas.*

*À Grace, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pela orientação e inspiração, pelo apoio e por investir em mim e proporcionar a execução deste trabalho.*

*À Laura, por ser minha parceira para todos os momentos no laboratório, pelas críticas, pelo seu apoio, pelos ensinamentos e ditados colombianos, pela sua ajuda em todos os momentos e situações, porque sempre que tive uma dificuldade você era a primeira que eu procurava. Obrigada pelas horas de discussão sobre memória ou sobre coisas cotidianas ou aleatórias e, principalmente, pela sua amizade que espero levar para sempre.*

*Ao Grace's Team de modo geral, Grace, Laura, Caio, Lorena, Matheus, Ana Flávia, Julian e Harrison, pelas reuniões, discussões, cafés, apoio, ajuda, e amizade. Sou muito feliz por fazer ciência ao lado de vocês. Em especial, agradeço ao Caio e Lorena, com quem sempre pude contar para tudo.*

*Às pessoas que passaram por esse grupo e deixaram muita saudade, Luciana e Thaís, muito obrigada também por todos os momentos no laboratório, pelos ensinamentos, discussões, ajuda e pela amizade.*

*Aos demais colegas do NNC, agradeço pela rotina no laboratório, pelas reuniões e discussões e pelas festas. Em especial, agradeço à Ana Luiza, Laila, Bia, Bruna e Léo, pela amizade, conversas e por também estarem sempre dispostos a ajudar. Bia, também te agradeço por ser a melhor companhia de casa.*

*Aos professores do laboratório como um todo, Grace, Márcio, Bruno, André, Cleiton e Juliana, agradeço por todos os ensinamentos e pensamentos críticos compartilhados, pela inspiração e por proporcionarem esse grupo de pesquisa.*

*Ao Bruno, agradeço em especial pelas caronas, cafés e palha italiana que amenizam o estresse no dia-a-dia.*

*Finalmente, agradeço aos meus pais, Rose e Edemilso, por me permitirem seguir essa carreira mesmo longe, e pelo apoio incessante em todas as situações. Ao meu amor, Cris, agradeço pela compreensão e apoio contínuos, por me assistir estudando, por me levar a buscar diversas vezes na UFMG em finais de semana e feriados e pelo seu amor.*

## RESUMO

Durante nosso dia-a-dia estamos expostos a diferentes estímulos que geram novas memórias, modificam lembranças antigas e interferem em novos aprendizados. Essas memórias que se referem às lembranças capazes de modelar o mundo externo são chamadas de declarativas, dentre elas, destacamos a memória de reconhecimento social (MRS), que diz respeito a capacidade de reconhecer coespecíficos, e a memória de reconhecimento de objetos (MRO), que é a capacidade de lembrar de objetos familiares. Ambas MRS e MRO são processos dependentes do hipocampo (HIP). Nosso grupo de pesquisa vem mostrando uma relação da MRS com a neurogênese adulta. Esse fenômeno também vem sendo relacionado à redução da interferência entre dois traços de memória. Baseado nisso nosso objetivo foi investigar se o aumento do número de neurônios novos no giro denteado (GD) era capaz de proteger uma memória dependente do HIP da interferência. Nós utilizamos camundongos Swiss, CD1 e C57BL/6. O teste de reconhecimento social (RS) foi utilizado para acessar a MRS e o teste de reconhecimento de objeto novo (RON), para a MRO. Como estímulos de interferência foram utilizados a mudança de caixa de um ambiente enriquecido (AE) ou caixa grande (CG) para um ambiente padrão, o teste de suspensão pela cauda (TSC) e os treinos do RS e RON. Uma única dose de memantina (25 mg/kg, i.p.) uma semana antes do treino foi utilizada como estímulo neurogênico. Nós verificamos que a mudança de alojamento não foi capaz de interferir na MRS de camundongos Swiss, CD1 e C57BL/6. A partir desse momento, optamos por fazer os seguintes experimentos em animais da linhagem C57BL/6. Nós observamos que o TSC apresentado durante diferentes horários (0h, 3h, 6h ou 12h) ao longo da consolidação da MRS não interferiu nessa memória. No caso de outra memória como estímulo interferente, o aprendizado do RON foi capaz de interferir proativamente no aprendizado da MRS, e o oposto também foi observado. Em contraste, a apresentação do aprendizado do RON após o da MRS não foi capaz de interferir na consolidação dessa memória, sendo o oposto também verificado. Surpreendentemente, não detectamos o aumento da neurogênese uma semana após a administração da memantina, nos impedindo de verificar se o aumento do número de neurônios novos seria capaz de prevenir a interferência proativa observada. Em síntese, o aprendizado de uma memória dependente do HIP é capaz

de interferir na aquisição de outra memória que tem esse substrato neural em comum, sugerindo uma interação entre o processamento dessas memórias. Ademais, futuros experimentos ainda são necessários para esclarecermos a questão de se o aumento da neurogênese é capaz de proteger o traço de memória da interferência observada.

**Palavras-chave:** Memória declarativa. Memória social. Memória de reconhecimento de objetos. Hipocampo. Interferência. Neurogênese adulta.

## ABSTRACT

During all the time we are in contact with new information that can form new memories, modify old ones and interfere in new learning. Memories capable of modeling the external world are named declaratives. Among them, we highlight social recognition memory (SRM), the ability to recognize conspecifics, and object recognition memory (ORM), the ability to remember familiar objects. Both SRM and ORM are hippocampus-dependent processes. Our group has been proving a relationship between SRM and adult neurogenesis. Furthermore, this biological process has been connected to reduction of memory interference. The present study aimed to investigate if dentate gyrus (DG) neurogenesis enhancement can protect an hippocampus-dependent memory from interference. Subjects were Swiss, CD1 and/or C57BL/6 mice. Social recognition test (SR) was used to access SRM, and novel object recognition test (NOR) for ORM. Change of cage, from a enriched environment (EE) or larger cage (LC) to standard environment (SE), tail suspension test (TST) and training for SR and NOR were used as interference stimuli. A single injection of memantine (25 mg/kg, i.p.) one week before training was used as neurogenic stimulus. We verified that cage changing was not able to interfere on Swiss, CD1 and C57BL/6 SRM. Moreover, TST presented in different time points (0h, 3h, 6h or 12h) during consolidation did not interfere on C57BL/6 SRM. In the case of a different learning event as interference stimulus, NOR training interfered proactively on SR learning, the opposite also happened. Surprisingly, we could not identify a neurogenesis enhancement one week after memantine administration, preventing us from investigating if this process would hind proactive interference. Altogether, learning a hippocampus-dependent memory can interfere on acquisition of a different hippocampus-dependent memory trace happening close in time, suggesting an interaction between both memories. In addition, future experiments are necessary in order to clarify if neurogenesis enhancement can protect an hippocampus dependent memory from proactive interference.

**Keywords:** Declarative memory. Social memory. Object recognition memory. Hippocampus. Interference. Adult neurogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Figura 1 -</b>  | Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração em mamíferos  | 15 |
| <b>Figura 2 -</b>  | O hipocampo e seu circuito trissináptico   | 21 |
| <b>Figura 3 -</b>  | Esquema simplificado da formação de memórias   | 24 |
| <b>Figura 4 -</b>  | Paradigma clássico da teoria da interferência  | 25 |
| <b>Figura 5 -</b>  | Revisão de trabalhos com memória social e interferência retroativa   | 27 |
| <b>Figura 6 -</b>  | Áreas neurogênicas no cérebro murino adulto  | 30 |
| <b>Figura 7 -</b>  | Tarefa de reconhecimento social  | 39 |
| <b>Figura 8 -</b>  | Desenho esquemático da posição do camundongo durante o TSC   | 40 |
| <b>Figura 9 -</b>  | Tarefa de reconhecimento de objeto novo  | 42 |
| <b>Figura 10 -</b> | Sequência de métodos para a quantificação da neurogênese   | 45 |
| <b>Figura 11 -</b> | Análise do número de células DCX+ utilizando o <i>software</i> Fiji  | 47 |
| <b>Figura 12 -</b> | Camundongos da linhagem Swiss, CD1 e C57BL/6 são capazes de formar a memória social de longo prazo                               | 50 |
| <b>Figura 13 -</b> | A mudança de ambiente, de uma condição enriquecida para uma padrão, não é capaz de interferir na memória social de longa duração | 51 |
| <b>Figura 14 -</b> | O teste de suspensão pela cauda não causa interferência retroativa na memória social de camundongos C57BL/6                      | 52 |
| <b>Figura 15 -</b> | A memória social é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado no treino do reconhecimento de objeto novo               | 54 |
| <b>Figura 16 -</b> | A memória de reconhecimento de objeto é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado social                              | 56 |
| <b>Figura 17 -</b> | Não é possível detectar aumento da neurogênese 8 dias após a administração da memantina  | 60 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|        |  |
|--------|--|
| AE     | Ambiente enriquecido                                       |
| ANOVA  | Análise de variância                                       |
| AP     | Ambiente padrão  |
| BrdU   | Bromodesoxiuridina   |
| BSA    | Albumina de soro bovino                                    |
| CA     | <i>Cornu Ammonis</i>                                       |
| CE     | Córtex entorrinal  |
| CEBIO  | Centro de bioterismo                                       |
| CEUA   | Comitê de ética no uso de animais                          |
| CG     | Caixa grande   |
| D      | Direita  |
| DAB    | 3,3'-Diaminobenzidina                                      |
| DCX    | Doublecortina  |
| DCX+   | Doublecortina positivas                                    |
| DREADD | Receptores ativados exclusivamente por ligantes sintéticos |
| E      | Esquerda   |
| EPM    | Erro padrão da média                                       |
| FA     | Formaldeído  |
| GD     | Giro denteado  |
| HD     | Hipocampo dorsal   |
| HIP    | Hipocampo  |
| HV     | Hipocampo ventral  |
| IHQ    | Imunohistoquímica  |
| IP     | Interferência proativa                                     |
| i.p.   | Intraperitoneal  |
| IR     | Interferência retroativa                                   |
| IRS    | Índice de Reconhecimento Social                            |
| LTM    | Memória de longo prazo                                     |
| MEM    | Memantina  |
| MRO    | Memória de reconhecimento de objeto                        |
| MRS    | Memória de reconhecimento social                           |
| NMDA   | N-metil D-Aspartato  |

|        |   |
|--------|---|
| NMDAR  | Receptor NMDA                           |
| PBS    | Tampão fosfato-salina                   |
| PBST   | PBS adicionado de triton                |
| PR     | Córtex perirrinal                       |
| RON    | Reconhecimento de objeto novo           |
| RS     | Reconhecimento social                   |
| SAL    | Salina                                  |
| SI     | Sem interferência                       |
| STM    | Memória de curto prazo                  |
| TR     | Treino                                  |
| TR RON | Treino no reconhecimento de objeto novo |
| TR RS  | Treino no reconhecimento social         |
| TSC    | Teste de suspensão pela cauda           |
| TT     | Teste                                   |
| TT RON | Teste no reconhecimento de objeto novo  |
| TT RS  | Teste no reconhecimento social          |
| UFMG   | Universidade Federal de Minas Gerais    |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                 | <b>13</b> |
| <b>1.1 Sobre memória.....</b>                             | <b>13</b> |
| <b>1.2 O hipocampo.....</b>                               | <b>20</b> |
| <b>1.3 Interferências na memória.....</b>                 | <b>23</b> |
| <b>1.4 Neurogênese adulta e interferência.....</b>        | <b>29</b> |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>                              | <b>34</b> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                  | <b>36</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral.....</b>                            | <b>36</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos.....</b>                     | <b>36</b> |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                        | <b>37</b> |
| <b>4.1 Animais.....</b>                                   | <b>37</b> |
| <b>4.2 Condições de alojamento diferenciadas.....</b>     | <b>37</b> |
| <b>4.3 Ensaio comportamentais.....</b>                    | <b>38</b> |
| <i>4.3.1 Tarefa de reconhecimento social.....</i>         | <i>38</i> |
| <i>4.3.2 Teste de suspensão pela cauda.....</i>           | <i>40</i> |
| <i>4.3.3 Tarefa de reconhecimento de objeto novo.....</i> | <i>40</i> |
| <i>4.3.4 Caixa locomotora.....</i>                        | <i>43</i> |
| <b>4.4 Tratamento com memantina.....</b>                  | <b>43</b> |
| <b>4.5 Imunohistoquímica.....</b>                         | <b>44</b> |
| <b>4.6 Aquisição das imagens.....</b>                     | <b>46</b> |
| <b>4.7 Análise das imagens.....</b>                       | <b>46</b> |
| <b>4.8 Análise estatística.....</b>                       | <b>47</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>5.1 A mudança de ambiente não é capaz de interferir na memória social de longa duração.....</b>                                 | <b>49</b> |
| <b>5.2 O teste de suspensão pela cauda não causa interferência retroativa na memória social de camundongos C57BL/6.....</b>        | <b>51</b> |
| <b>5.3 A memória social é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado no treino do reconhecimento de objeto novo.....</b> | <b>53</b> |
| <b>5.4 A memória de reconhecimento de objeto é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado social.....</b>                | <b>55</b> |
| <b>5.5 Não é possível detectar aumento da neurogênese 8 dias após a administração da memantina.....</b>                            | <b>57</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>ANEXO - Aprovação pelo CEUA.....</b>  | <b>88</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sobre memória

*“The most critical concept in the science devoted to its analysis, memory, never had the privilege of sailing the tranquil waters of consensus. Behavioral and brain scientists, their sects notwithstanding, can spend memorable evenings in arguing what is it exactly that ‘memory’ means.”*

*(Yadin Dudai, 2007)*

Diferente de outros conceitos científicos (ex: transcrição gênica, gliconeogênese), a memória é usada coloquialmente com uma grande variedade de significados e, no que se refere à ciência da memória, a definição desse termo ainda não é um consenso. Talvez isso se deva à multidisciplinaridade da área, que inclui a psicologia, neurobiologia, ciência computacional, filosofia, entre outras, ou por se referir a um processo complexo que envolve vários níveis da função cerebral e diferentes sistemas de memória (TULVING, 2005; DUDAI; ROEDIGER; TULVING, 2007; MORRIS, 2007). Entretanto, deixar claro o conceito de memória é fundamental para a comunicação na disciplina (DUDAI, 1992; TULVING, 2005).

Discutir e definir o termo memória também é necessário para se entender e buscar as respostas das grandes perguntas que norteiam esse campo de estudo. Como a informação é representada no sistema nervoso? Como essa informação muda em consequência da experiência? Como as mudanças persistem ao longo do tempo ou são esquecidas? (TULVING, 2005; DUDAI, 2007).

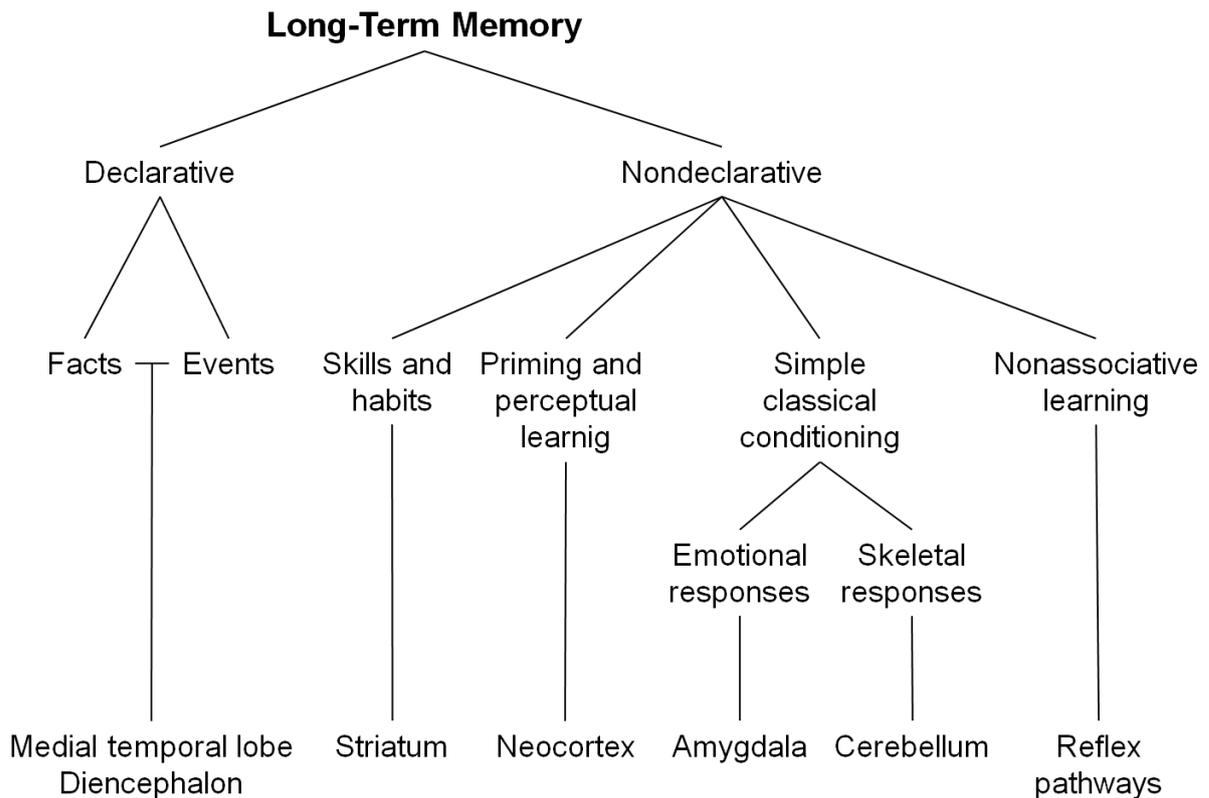
Para Dudai (2002, p.157), a memória pode ser definida como “a retenção de representações internas dependentes da experiência ao longo do tempo, ou a capacidade de reativar ou reconstruir tais representações”, sendo essas representações versões do mundo codificadas em neurônios e que podem, potencialmente, guiar o comportamento (DUDAI, 1992, 2002, 2007). Uma outra visão é a de que uma memória é o produto da interação entre o engrama e a evocação (MOSCOVITCH, 2007). Sendo o engrama o traço da memória, ou seja, sua representação física no cérebro, que, quando interage com pistas que levem a evocação, resulta na emergência da memória (DUDAI, 2002; MOSCOVITCH, 2007;

SEMON, 1921). Por fim, outra definição popular é a memória como a capacidade de codificar, armazenar e evocar informações (IZQUIERDO, 2011; SCHACTER, 2007; TULVING, 2005). A partir desses três conceitos podemos construir uma ideia geral de que a memória engloba os processos biológicos pelos quais codificamos, armazenamos e somos capazes de evocar informações representadas internamente na forma do engrama.

Atualmente, é um consenso de que a memória não se trata de um processo único, e sim, abrange diferentes sistemas, que se distinguem com base no tipo de aprendizado e memória que processam e nos mecanismos cerebrais e seus reflexos em nível comportamental (BUCKNER, 2007; ROLLS, 2007; SCHACTER; TULVING, 1994; SQUIRE, 2004, 2007). Esses diferentes sistemas de memória operam independentemente, em paralelo e interagindo entre eles durante o nosso dia-a-dia para modificarmos e formarmos novas memórias, assim como para sermos capazes de executar diversas tarefas (FERBINTEANU, 2019; ROLLS, 2007; SQUIRE, 2004).

Embora seja questionada (FERBINTEANU, 2019), a divisão clássica e mais frequente da memória é em dois grandes grupos: memórias declarativas e memórias não-declarativas (procedurais) (Figura 1) (IZQUIERDO, 2011, 2015; SCHACTER; TULVING, 1994; SQUIRE, 2004, 2007). As memórias declarativas são aquelas que chamamos simplesmente de “memória” na linguagem cotidiana. Elas são uma maneira de modelar o mundo externo e se expressam através das lembranças (SQUIRE, 2004, 2007). Já as memórias não-declarativas são denominadas dessa forma como um termo guarda-chuva e, diferente das declarativas, não se referem a um sistema específico, mas compreendem os demais sistemas de memória que não se encaixam no das memórias declarativas (Figura 1) (SCHACTER; TULVING, 1994; SQUIRE, 2004, 2007).

As memórias declarativas podem ainda ser subdivididas em semânticas, àquelas relacionadas ao conhecimento de fatos sobre o mundo, e episódicas, que se referem ao conhecimento sobre eventos específicos e autobiográficos (Figura 1). Sendo que as memórias episódicas são definidas pela presença dos elementos o que, onde e quando (DUDAI, 2002; IZQUIERDO, 2011, 2015; RIEDEL; BLOKLAND, 2015; SQUIRE, 2004; TULVING, 1983, 2005).



**Figura 1** - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração em mamíferos. (Modificado de SQUIRE, 2004). A memória de longa-duração em mamíferos é dividida em dois grandes grupos: declarativas e não-declarativas. A memória declarativa é subdividida em memória para fatos (semântica) e para eventos (episódica), ambas têm como estrutura central para o seu processamento o lobo temporal medial. Compreendem o grupo das demais memórias (não-declarativas), os sistemas de memória para habilidades e hábitos, “priming” e aprendizado perceptual, condicionamento clássico e aprendizado não associativo (SCHACTER; TULVING, 1994; SQUIRE, 2004, 2007). Na parte inferior são mencionados os principais substratos que participam de cada sistema de memória, embora estes também possam participar no processamento de outros tipos de memória.

No que diz respeito aos mamíferos não-humanos, a perspectiva dominante na literatura é de que esses animais não possuem um sistema de memórias episódicas (BINDER; DERE; ZLOMUZICA, 2015; DERE, 2011; DUDAI, 2002; ROBERTS, 2011; SQUIRE, 2004; TULVING, 2005). Entretanto, a definição desse tipo de memória costuma ser antropocêntrica, pois coloca a linguagem como característica central desse processo. Isso pode ser representado pela descrição, segundo Tulving (2005), de quatro características essenciais para que uma memória possa ser considerada episódica: (1) a função dessa memória é a capacidade de viajar mentalmente no tempo ou recordar lembranças; (2) essa memória depende de um “eu” que lembra, ou seja, o indivíduo lembra do passado segundo a sua perspectiva;

(3) essas lembranças são expressas por meio de uma consciência “autonoética”, ou seja, o indivíduo se coloca no tempo, espaço e local no qual a lembrança acontece; e (4) essa memória se relaciona com o tempo percebido subjetivamente ou “cronestesia” (habilidade de viajar no tempo mentalmente) (DUDAI, 2002; TULVING, 2005).

Embora muitos trabalhos afirmem que alguns paradigmas comportamentais são adequados para avaliar memórias episódicas em mamíferos não-humanos (ex: tarefas de reconhecimento em roedores e macacos) (DERE; HUSTON; DE SOUZA SILVA, 2007; MARTIN; BESHEL; KAY, 2007; MCLEAN et al., 2018; RIEDEL; BLOKLAND, 2015; ROY et al., 2016; WANG et al., 2018), de acordo com a definição desse tipo de memória, essas tarefas não são capazes de distinguir entre a lembrança para eventos e para fatos. A maioria destes testes avalia a memória para “o que” e algumas para “onde”, e apesar de alguns grupos terem tentado (revisado por BINDER; DERE; ZLOMUZICA, 2015; DERE, 2011; ROBERTES, 2011) é muito difícil elaborar uma tarefa capaz de testar o “quando” (DUDAI, 2002; SQUIRE, 2004; TULVING, 2005). Portanto, o máximo que podemos dizer quando usamos tais testes em laboratório é que estamos estudando um tipo de memória declarativa.

No caso dos roedores, mais precisamente dos camundongos, podemos destacar as tarefas de reconhecimento como capazes de permitir o acesso à memória declarativa desses animais (BIALA, 2012; BIRD, 2017; CLARKE et al., 2010; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011). As memórias de reconhecimento em geral, podem ser definidas como processos que permitem aos indivíduos classificarem um estímulo como familiar ou novo (DUDAI, 2002; NORMAN; O'REILLY, 2003; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008). Essas memórias são testadas rotineiramente em diversos laboratórios ao redor do mundo não só para o estudo dos seus mecanismos, mas também para a padronização de modelos animais de doenças e caracterização de novos fármacos (BIALA, 2012; HU et al., 2020; LEMAIRE, 2004; MUMTAZ et al., 2018; PODDAR et al., 2020).

Os testes de reconhecimento em murinos se baseiam em uma característica inata desses animais: a neofilia, ou seja, a preferência em explorar o que é novo. A partir disso, espera-se que ao entrar em contato com um estímulo familiar, o indivíduo o explore menos, pois ele o reconhece como conhecido (BIALA, 2012;

ENGELMANN; WOTJAK; LANDGRAF, 1995; ENNACEUR; DELACOUR, 1988; THOR; HOLLOWAY, 1982). Sobre o processamento fisiológico do reconhecimento, a teoria mais aceita é que ele pode ser dividido em dois processos distintos: a familiaridade e a recordação (BIRD, 2017). A familiaridade sendo o reconhecimento do estímulo como conhecido e a recordação como a lembrança da situação em que o estímulo foi apresentado (BIRD, 2017; COHEN; STACKMAN, 2015; DUDAI, 2002; NORMAN; O'REILLY, 2003; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008).

Dentre as tarefas de reconhecimento, ressaltamos duas: o teste de reconhecimento social (RS) e o teste de reconhecimento de objeto novo (RON) (BIRD, 2017; CAMATS PERNA; ENGELMANN, 2015; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011). O RS avalia a memória de reconhecimento social (MRS), que se refere à habilidade dos indivíduos de se lembrarem de outros da mesma espécie (THOR; HOLLOWAY, 1982), sendo, portanto, uma memória fundamental para o estabelecimento das relações intraespecíficas (ARAKAWA et al., 2008; FERGUSON; YOUNG; INSEL, 2002; KAVALIERS; CHOLERIS, 2017; SOKOLOWSKI et al., 2010). Já o RON testa a memória de reconhecimento de objetos (MRO). Pensando nas consequências da MRS e da MRO e na formação de uma memória episódica é possível sugerir que essas memórias são fundamentais para o estabelecimento da lembrança de um evento, ao contribuírem com o componente “o que” do episódio (BIRD, 2017; OKUYAMA, 2017).

Dentre os substratos neurais centrais no processamento das memórias de reconhecimento, se destacam as estruturas do lobo temporal medial, como o hipocampo (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; CLARK, 2017; CLARKE et al., 2010; FERBINTEANU, 2019; GUARNIERI et al., 2020; KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; NORMAN; O'REILLY, 2003; OPITZ, 2014; PENA et al., 2014; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008). No que diz respeito à MRO, são reconhecidas duas regiões como essenciais para o seu processamento: o hipocampo (HIP) e o córtex perirrinal (PR) (BIALA, 2012; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008; TANIMIZU; KONO; KIDA, 2018; WARBURTON; BROWN, 2015). Historicamente, a participação desses substratos foi demonstrada em diversos trabalhos utilizando lesões em roedores e macacos (BIALA, 2012; COHEN; STACKMAN, 2015; WARBURTON; BROWN, 2015), porém, durante esses estudos emergiram também resultados conflitantes principalmente a respeito da participação do HIP na MRO (BIRD, 2017;

WARBURTON; BROWN, 2015). É comum na literatura uma hipótese que atribui papéis distintos a essas duas regiões. Essa explicação tem como base a teoria de que as memórias declarativas podem ser separadas em dois processos distintos (familiaridade e recordação). Segundo esta hipótese, o córtex perirrinal estaria por trás da percepção de familiaridade do estímulo, enquanto o hipocampo seria essencial apenas para a recordação (BIALA, 2012; BIRD, 2017; OPITZ, 2014; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008; WARBURTON; BROWN, 2015). Baseado nisso, existem argumentos de que tarefas como a do RON não seriam dependentes do hipocampo, pois elas testariam apenas o componente da familiaridade da memória de reconhecimento (WARBURTON; BROWN, 2015).

Todavia, essa hipótese ainda não foi capaz de explicar as evidências antagônicas acerca da participação do hipocampo (BIRD, 2017). Em uma revisão publicada em 2014, Cohen e Stackman Jr. reúnem em uma tabela resultados publicados em artigos que tentaram investigar a participação do HIP na tarefa de RON com o uso de lesões ou inativação desse substrato. Eles discutem que os resultados conflitantes podem derivar da falta de consistência entre os protocolos do RON utilizados, já que qualquer mudança nas condições da tarefa pode alterar seus resultados, além de prejudicar o valor de comparação entre os diferentes estudos (COHEN; STACKMAN, 2015).

Existem outras críticas à hipótese do PR responsável pelos processos de familiaridade e do HIP por trás da recordação. Essa explicação costuma desconsiderar as diferenças entre memórias de curto (STM, do inglês *short term memory*) e longo prazo (LTM do inglês, *long term memory*) (BIALA, 2012; BIRD, 2017; COHEN; STACKMAN, 2015). A hipótese mais favorecida pelas evidências parece ser a de que o hipocampo não é essencial para a STM, mas sim para a LTM (BIALA, 2012; CLARKE et al., 2010; COHEN; STACKMAN, 2015; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008). Desse modo, o PR, onde convergem estímulos visuais, olfatórios e somatossensoriais, seria capaz de manter a memória de reconhecimento por curtos períodos, mas essa representação decairia com o tempo e a memória passaria a ser dependente do HIP, o qual seria capaz de manter a representação dessa memória por um período maior (BIALA, 2012; COHEN; STACKMAN, 2015; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008).

Evidências que concordam com a dependência hipocampal da MRO podem ser ilustradas por trabalhos nos quais a inativação dessa região por injeções locais de muscimol (agonista GABAérgico) antes e depois da codificação do RON, prejudicaram a LTM (COHEN; MUNCHOW; RIOS, 2013). A injeção de muscimol antes do teste do RON, também foi capaz de prejudicar a evocação da LTM, sendo esse efeito revertido 24 horas depois quando não havia mais a inativação local do HIP (STACKMAN et al., 2016). Ademais, através de registro eletrofisiológico, foram detectados processos plásticos ocorrendo em sinapses no HIP durante a consolidação e após o teste da MRO (CLARKE et al., 2010). Tanimizu, Kono e Kida (2018) também mostraram, através da marcação de c-fos, que CA1, CA3 e o giro denteado estavam mais ativos depois da exposição a objetos novos no RON.

Quanto à MRS, Kogan, Frankland e Silva (2000) foram os primeiros a mostrar que lesões no hipocampo de camundongos prejudicavam, inclusive, a memória social de curto prazo. Tal achado foi corroborado por diversos trabalhos posteriores (CARUANA; ALEXANDER; DUDEK, 2012; HITTI; SIEGELBAUM, 2014; OKUYAMA et al., 2016; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017, 2018). Por exemplo, Tanimizu e colaboradores (2017) mostraram que a expressão de c-fos e Arc em CA1 e CA3 é maior após o encontro com um estímulo social e que a inibição da síntese proteica no hipocampo logo após o treino é capaz de prejudicar a memória social de longo prazo. Concomitante a isso, Lüscher e colaboradores identificaram um aumento na expressão de c-fos no giro denteado após a exposição dos camundongos a um juvenil familiar (reconhecimento). Já Meira e colaboradores (2018), observaram, com o auxílio de DREADD (do inglês *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug*) e optogenética, que a inativação de neurônios piramidais de CA2 do hipocampo dorsal, era capaz de prejudicar a aquisição e consolidação da MRS. Em conjunto, estes resultados indicam que o hipocampo é uma região crucial para o processamento dessa memória.

Além do hipocampo, e diferentemente da MRO, a MRS depende das vias olfatórias principal e acessória, já que esse é o sentido principal usado pelos roedores para identificarem seus coespecíficos (CAMATS PERNA; ENGELMANN, 2015; FERGUSON; YOUNG; INSEL, 2002; INSEL; FERNALD, 2004; PENA et al., 2014; VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012). Outras regiões cerebrais que também aparecem na literatura como possíveis participantes do circuito neural da MRS são:

córtex entorrinal (LEUNG et al., 2018), núcleo accumbens (OKUYAMA et al., 2016), os núcleos basolateral e medial da amígdala (LÜSCHER DIAS et al., 2016; LI et al., 2017; TANIMIZU et al., 2017) e o córtex pré-frontal medial (LÜSCHER DIAS et al., 2016; TANIMIZU et al., 2017).

Em síntese, o conceito de memória ainda não é um consenso, mas em geral se refere ao processo pelo qual codificamos, armazenamos e evocamos informações. Com essa definição é possível abranger os diferentes sistemas de memória que se distinguem pelo tipo de informação processada e pelos mecanismos subjacentes. Dentre esses sistemas, destacamos as memórias declarativas, que podem ser testadas em laboratório através de tarefas de reconhecimento. No caso dos roedores, salientamos as memórias de reconhecimento social e de objeto, testadas neste trabalho e que possuem substratos neurais em comum, com um destaque para a região da formação hipocampal.

## 1.2 O hipocampo

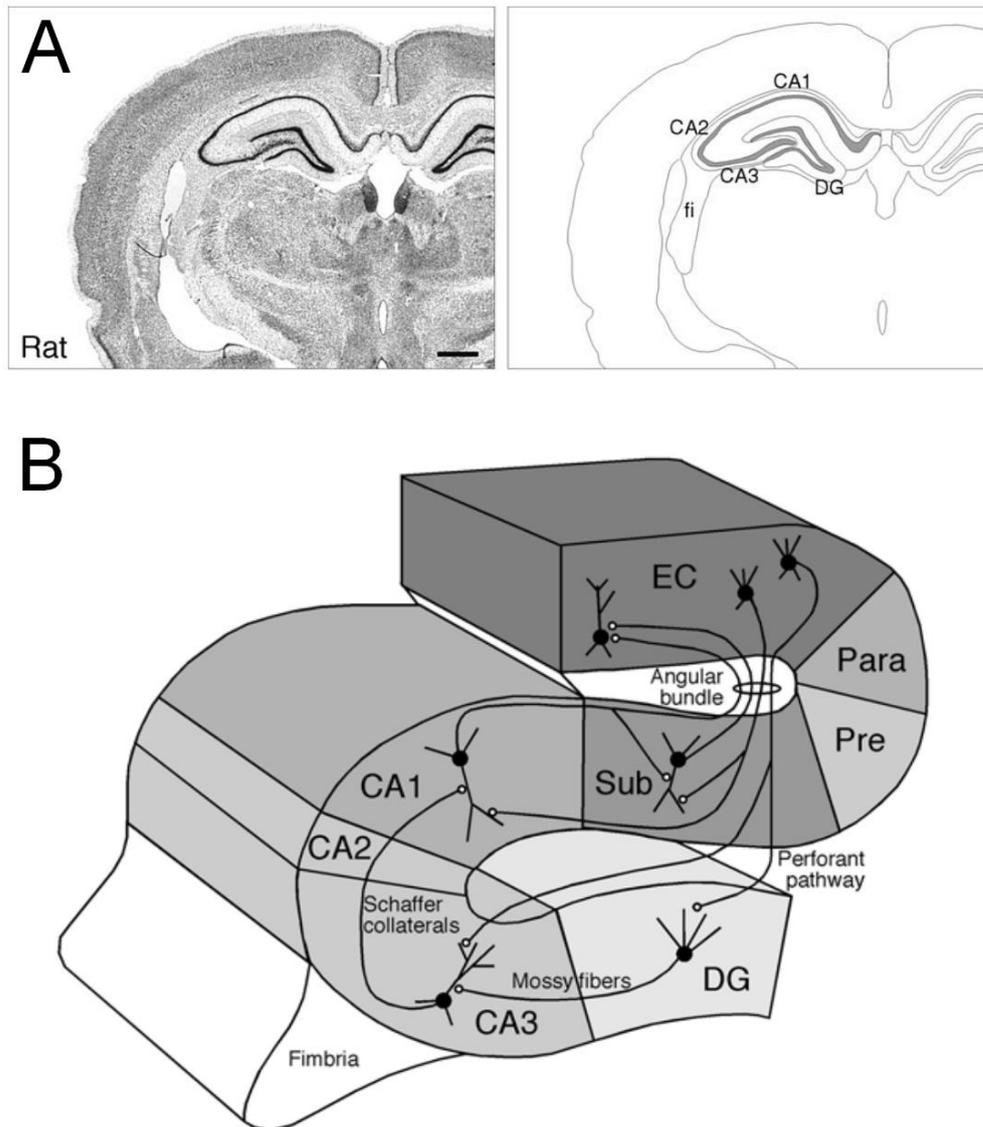
*“The seahorse won, and established itself quite firmly as a recurrent protagonist in the dreams or nightmares of brain scientists world-wide.”*

*(Yadin Dudai, 2002)*

O hipocampo compreende o sistema funcional chamado formação hipocampal que é constituído por 4 regiões: giro denteado; hipocampo (CA1, CA2 e CA3) (Figura 2.A); complexo subicular (subículo, pré-subículo e para-subículo) e córtex entorrinal (Figura 2) (AMARAL; WITTER, 1989; AMARAL; LAVENEX 2006). Ele apresenta uma estrutura de arquicórtex que se interconecta com áreas corticais e subcorticais. Hoje esse sistema é visto como tendo um papel essencial em certos tipos e fases da memória (DUDAI, 2002).

A estrutura hipocampal se destaca por possuir um circuito trissináptico excitatório bem descrito na literatura. Grande parte da informação neocortical chega ao hipocampo por meio do córtex entorrinal (CE), as células dessa região fazem sinapses com neurônios do giro denteado (GD), sendo o conjunto dessas sinapses denominada via perforante. As células do GD enviam suas projeções para CA3 pelas fibras musgosas. Enquanto as células de CA3 fazem sinapses, através do colateral de Schaffer com CA1. Por fim, CA1 se conecta com o CE de forma direta

ou fazendo sinapses com células do subículo (Figura 2.B) (AMARAL; WITTER, 1989; AMARAL; LAVENEX 2006).



**Figura 2** – O hipocampo e seu circuito trissináptico. (A) Fatia transversal do cérebro de um rato marcada com Nissil (esquerda) e ilustração da organização geral das subdivisões do hipocampo (direita). fi: fimbria; DG: giro dentado; escala: 1 mm. (B) O circuito trissináptico clássico da formação hipocampal. EC: córtex entorrinal; Para: para-subículo; Pre: pré-subículo; Sub: subículo. Imagem modificada de AMARAL; LAVENEX, 2006.

Outra divisão comum do hipocampo se dá ao longo do seu eixo rostro-caudal nas zonas: dorsal ou rostral; intermediária, com características das duas porções vizinhas; e ventral ou caudal. Essa segmentação se fundamenta com base nas

diferentes aferências e eferências que essas regiões possuem, além da distinção funcional que essas áreas parecem ter. O hipocampo dorsal (HD) está mais relacionado com o processamento cognitivo, enquanto o hipocampo ventral (HV) está envolvido com a resposta ao estresse e o processamento emocional (FANSELOW; DONG, 2010; KNIERIM, 2015; MORRIS, 2006; MOSER; MOSER, 1998).

No que se refere ao envolvimento do hipocampo com o aprendizado e memória, os estudos procurando compreender essa relação se popularizaram após as evidências decorrentes do estudo do paciente H.M., que depois da remoção bilateral do lobo temporal medial, que inclui o hipocampo, apresentou prejuízo da função mnemônica, incluindo o reconhecimento de figuras e palavras, lembrança de pares de palavras e posição de objetos (MILNER, 1965; MILNER; CORKIN; TEUBER, 1968; SCOVILLE; MILNER, 1957). Essas evidências foram futuramente confirmadas em diversos outros trabalhos, e lesões mais precisas da região hipocampal deram forças para o envolvimento desse substrato com a memória (FERBINTEANU, 2019; MOSER; MOSER, 1998; STRANGE et al., 2014).

Vale a pena ressaltar que o prejuízo mnemônico no paciente H.M. se restringia às memórias declarativas de longo prazo adquiridas próximas ou após a cirurgia, sua memória de trabalho, seu nome e lembranças da infância, habilidades motoras, reflexos simples e condicionamentos podiam ser lembrados (MOSER; MOSER, 1998; SCHACTER; WAGNER, 2013; STRANGE et al., 2014). Essas evidências foram cruciais para o estabelecimento, principalmente, de duas ideias: as memórias podem ser divididas em diferentes sistemas, já que nem todos os tipos de memória estavam prejudicados, e, o hipocampo é importante para a consolidação e, conseqüentemente, formação de memórias de longo prazo, já que as memórias remotas, já consolidadas, permaneceram intactas, mas memórias recém aprendidas eram esquecidas (FERBINTEANU, 2019; POLDRACK; PACKARD, 2003; SCHACTER; TULVING, 1994; SCHACTER; WAGNER, 2013).

Posteriormente, mais evidências salientaram o papel de destaque do hipocampo no processamento de memórias. A potenciação de longo prazo, um dos modelos da base celular da formação de memórias (BLISS; GARDNER-MEDWIN, 1973; KNIERIM, 2015), as *place* e *grid cells* e sua importância para a memória

espacial (MOSER; MOSER, 1998; O'KEEFE; DOSTROVSKY, 1971; STRANGE et al., 2014), o mecanismo de *pattern separation* (HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016; LEUTGEB et al., 2007) e a neurogênese adulta (ALTMAN, 1962a; ERIKSSON et al., 1998) todos são processos que ocorrem no hipocampo e estão envolvidos de alguma forma na memória, dando força para o protagonismo do hipocampo dentre os estudos na ciência da memória. Todavia, ainda não é possível sumarizar a riqueza de dados sobre essa tema em poucas palavras, e nem responder com certeza à pergunta “qual o papel do hipocampo no aprendizado e memória?” (DUDAI, 2002).

### **1.3 Interferências na memória**

*“Interference effects are highly correlated with the storage of new traces into memory, and with the modification of existing ones.”*

*(Michael C. Anderson , 2003)*

De forma geral, podemos destacar três fases no processamento das memórias declarativas de longo prazo: a aquisição, a consolidação e a evocação (Figura 3) (SCHACTER; WAGNER, 2013). A aquisição é a fase inicial de formação do traço de memória, ou seja, o processo pelo qual novas informações são adquiridas, codificadas e conectadas com conhecimentos prévios (DUDAI, 2002; SCHACTER; WAGNER, 2013). A consolidação é a transformação do traço de memória ao longo do tempo (MÜLLER; PILZECKER, 1900; DUDAI; KARNI; BORN, 2015). Finalmente, a evocação é o que costumeiramente acontece quando dizemos que lembramos de algo. Ela consiste na reativação ou reconstrução de representações internas a partir de dicas que podem ser externas ou internas ao indivíduo (DUDAI, 2002; IZQUIERDO, 2011; SCHACTER; WAGNER, 2013) (Figura 3).

Se pensarmos nas tarefas realizadas em laboratório para o estudo da memória, podemos traçar um paralelo entre suas fases de processamento com as etapas da tarefa. Durante o treino, o indivíduo tem o primeiro contato com o estímulo, portanto esse momento seria equivalente à aquisição de uma nova informação. A consolidação começaria a acontecer durante o treino, assim que a informação sobre o estímulo é adquirida, e, dependendo da espécie em questão,

duraria por minutos, horas ou dias. Já a evocação seria equivalente a quando o indivíduo é capaz de lembrar durante a sessão de teste (ABEL; LATTAL, 2001). Baseado nisso, para que uma memória de longo prazo seja evocada, tanto numa situação rotineira, quanto de laboratório, o êxito desses processos deve ser garantido. Uma interferência em uma dessas fases, seria capaz de causar o esquecimento (DUDAI, 2002; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013b; ROBERTSON, 2012; WIXTED, 2004).

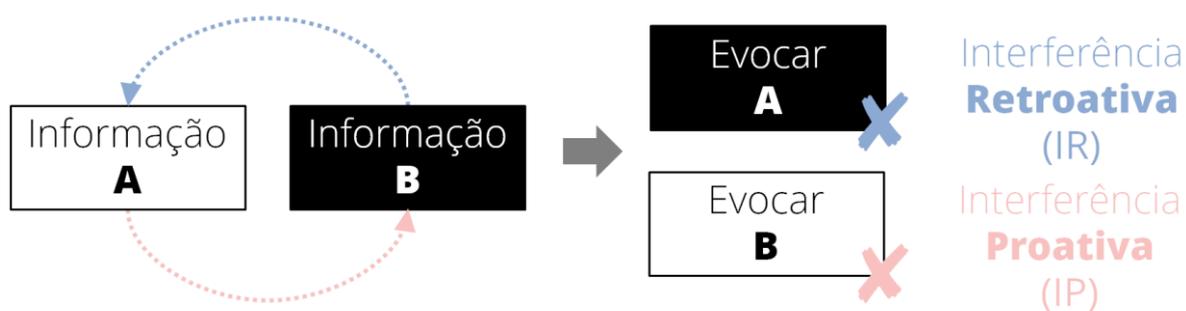


**Figura 3** – Esquema simplificado da formação de memórias. Quando uma nova informação é adquirida seu conteúdo é codificado e conectado com informações prévias durante a aquisição. Essa memória pode passar pela consolidação e ser evocada no futuro. Uma vez que uma memória é evocada, seu traço se torna lábil e novas informações podem ser adicionadas ou modificadas. Posteriormente, essa memória passa pelo processo de reconsolidação.

De fato, a interferência durante as fases da memória é uma das explicações sugeridas para o esquecimento (ALVES; BUENO, 2017; DAVIS; ZHONG, 2017; POLACK; JOZEFOWIEZ; MILLER, 2017; WIXTED, 2004). A teoria da interferência propõe que o esquecimento é causado por informações intervenientes que perturbam a memória-alvo. Desse modo, a interferência pode vir por itens aprendidos anteriormente (interferência proativa – IP) ou posteriormente (interferência retroativa - IR) em relação a memória-alvo (ALVES; BUENO, 2017; ANDERSON; NEELY, 1996; DUDAI, 2002; WIXTED, 2004).

Podemos visualizar esse efeito de forma mais clara tendo em perspectiva o paradigma clássico utilizado para o estudo da teoria da interferência (Figura 4).

Considerando que um indivíduo aprendeu uma informação A seguida pela informação B, a IP se refere a interferência de A sobre B e a IR é a interferência de B sobre A (Figura 4) (ALVES; BUENO, 2017; ANACKER; HEN, 2017; DUDAI, 2002, 2004; LECHNER; SQUIRE; BYRNE, 1999; MÜLLER; PILZECKER, 1900; MILLER; SAHAY, 2019; WIXTED, 2004).



**Figura 4** - Paradigma clássico da teoria da interferência.

Esse paradigma sumarizado na figura 4 é um método clássico usado, principalmente pela psicologia, para o estudo dos processos mnemônicos. Müller e Pilzecker (1900), em seu trabalho essencial para a teoria da interferência, usaram o aprendizado de listas de pares de palavras para o estudo da memória. Após o treino com essas listas, um grupo passou pela apresentação de um segundo conjunto de palavras, outro grupo foi exposto a fotos de paisagens e um terceiro não foi submetido a interferências (controle). Como resultado, os grupos que passaram pelas interferências após a aquisição das listas se lembraram de menos palavras durante o teste do que o grupo controle (LECHNER; SQUIRE; BYRNE, 1999). Para explicar esses achados, Müller e Pilzecker sugeriram a teoria da interferência (ALVES; BUENO, 2017; ANDERSON, 2003; LECHNER; SQUIRE; BYRNE, 1999; WIXTED, 2004).

Existem diversas possíveis explicações de como a interferência seria capaz de levar ao esquecimento. Uma delas é a proposta por Müller e Pilzecker, segundo eles, a consolidação, processo que continua acontecendo após o aprendizado no qual a memória ainda está vulnerável a perturbações, permitiria a interferência por outros estímulos (DUDAI, 2004; LECHNER; SQUIRE; BYRNE, 1999; WIXTED, 2004). Outra possibilidade, seria o conflito entre informações muito semelhantes, nesse caso, aferências sensoriais muito parecidas mas que deveriam levar a

evocação de memórias distintas, acabam desencadeando a lembrança de apenas uma das memórias em detrimento da outra (BECKER, 2005; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013b). Uma terceira explicação é de que as informações adquiridas poderiam competir de alguma forma entre si (ALVES; BUENO, 2017; ROBERTSON, 2012). As duas primeiras alternativas são as que aparecem com mais frequência na literatura (ALVES; BUENO, 2017; BECKER, 2017; DUDAI, 2004; ENDRESS; SIDDIQUE, 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; GLICKMAN, 1961; GUISE; SHAPIRO, 2017; HERSZAGE; CENSOR, 2018; KLAPPENBACH; NALLY; LOCATELLI, 2017; LECHNER; SQUIRE; BYRNE, 1999; MCGAUGH, 1966; POLACK; JOZEFOWIEZ; MILLER, 2017; WIXTED, 2004).

Quando buscamos pelos trabalhos originais que pretenderam estudar a interferência na memória e suas implicações, notamos que a maioria dos estudos é focada na IR na consolidação (Revisados por DUDAI, 2004; WIXTED, 2004). Estes podem ser divididos nos que buscam testar a hipótese da interferência como causa do esquecimento (DAVIS; ZHONG, 2017; WIXTED, 2004) e os que tentam compreender a própria consolidação (DUDAI, 2004; ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011; GLICKMAN, 1961; IZQUIERDO et al., 1999; MCGAUGH, 1966; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017; PERNA et al., 2015; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005; TANIMIZU et al., 2017; WANISCH; WOTJAK; ENGELMANN, 2008). A maioria dos trabalhos na primeira categoria se tratam de estudos na área da psicologia cognitiva com humanos e que utilizaram tarefas com o aprendizado de listas de palavras (ALVES; BUENO, 2017; DARBY et al., 2018; JACOBS et al., 2015; WIXTED, 2004). Outra característica que vale a pena ser mencionada, é que na maioria das vezes, a memória a ser estudada e o estímulo interferente se tratam de aprendizados semelhantes (WIXTED, 2004). Na categoria dos estudos que tentam compreender a consolidação por meio de interferências, encontramos principalmente trabalhos com animais de laboratório e que utilizam, além de aprendizados, outros estímulos como intervenção na consolidação (DUDAI, 2004; ENGELMANN, 2009; IZQUIERDO et al., 1999; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017; PERNA et al., 2015; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005; TANIMIZU et al., 2017; WANISCH; WOTJAK; ENGELMANN, 2008).

Tratando-se da utilização da interferência apenas como uma ferramenta para o estudo da consolidação da memória, alguns estímulos comumente utilizados para as intervenções são: comportamentos, drogas, estresse e lesões anatômicas. Se um estímulo é capaz de interferir em um momento específico após a aquisição, assume-se que aquele tempo pode ser importante para a consolidação da memória em questão (DUDAI, 2004; ROBERTSON, 2012). Isso pode ser observado em diversos estudos sobre a MRS em camundongos (Figura 5). De forma geral, podemos constatar, com base nos resultados sumarizados na figura 5, que os tempos imediatamente, 3h, 6h, 9h, 12h e 15h parecem ser importantes para a consolidação da MRS (ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017; PERNA et al., 2015; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005; TANIMIZU et al., 2017; WANISCH; WOTJAK; ENGELMANN, 2008).

| Referência                   | Interferência        | Horário da interferência |       |    |    |    |     |     |     |     |                 | Linhagem                 | Modelo |
|------------------------------|----------------------|--------------------------|-------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----------------|--------------------------|--------|
|                              |                      | 0h                       | 5 min | 3h | 6h | 9h | 12h | 15h | 18h | 22h |                 |                          |        |
| Richter et al., 2005         | ANI s.c.             | ●                        |       | ●  | ●  |    |     |     |     | ●   |                 | C57BL/6jOlaHsd (9-16 s.) | D      |
| Wanisch et al., 2007         | ANI s.c.             |                          |       |    |    | ●  | ●   | ●   |     |     |                 | C57BL/6jOlaHsd (13 s.)   | D      |
| Engelmann, 2009              | Juvenil desconhecido |                          | ●     | ●  | ●  | ●  | ●   | ●   | ●   | ●   | ●               | C57BL/6jOlaHsd (9-16 s.) | D      |
| Engelmann et al., 2011       | Mudança de caixa     |                          |       | ●  |    |    |     |     |     |     |                 | C57BL/6jOlaHsd           | D      |
| Perna et al., 2015           | Juvenil desconhecido |                          |       | ●  | ●  |    |     |     |     |     | ●               | C57BL/6jOlaHsd (9-16 s.) | D      |
|                              | Objeto novo          |                          |       | ●  | ●  |    |     |     |     |     | ●               |                          |        |
|                              | Odor carvone         |                          |       | ●  | ●  |    |     |     |     |     | ●               |                          |        |
|                              | Som                  |                          |       | ●  | ●  |    |     |     |     |     | ●               |                          |        |
| Tanimizu et al., 2017        | ANI hip              | ●                        |       |    |    |    |     |     |     |     |                 | C57BL/6N(8 s.)           | D      |
|                              | ANI mPFC             | ●                        |       |    |    |    |     |     |     |     |                 |                          |        |
|                              | ANI ACC              | ●                        |       |    |    |    |     |     |     |     |                 |                          |        |
|                              | ANI amy              | ●                        |       |    |    |    |     |     |     |     |                 |                          |        |
| Pena et al., 2014            | ANI OB               | ●                        |       | ●  | ●  |    |     |     |     | ●   | Swiss (8-12 s.) | R                        |        |
|                              | ANI hip              | ●                        |       | ●  | ●  |    |     |     | ●   |     |                 |                          |        |
| Pereira-Caixeta et al., 2017 | TSC                  |                          |       |    | ●  |    |     |     |     |     | Swiss (8-12 s.) | R                        |        |

Memória Social de Longo Prazo

● Déficit da MS

● MS intacta

**Figura 5** – Revisão de trabalhos com memória social e interferência retroativa. A primeira coluna da tabela indica o trabalho de origem dos resultados. A segunda coluna mostra o tipo de interferência utilizada. A terceira coluna expõe o horário em que cada intervenção foi feita e se ela foi capaz de prejudicar (em vermelho) ou não (em verde) a memória social de longo prazo. A quarta coluna indica a linhagem de camundongos utilizada e a quinta, a tarefa para acessar a memória social. ANI: anisomicina; hip: hipocampo; mPFC: córtex pré-frontal medial; ACC: córtex cingulado anterior; amy: amígdala; OB: bulbo olfatório; TSC: teste de suspensão de cauda; MS: memória social; s.:semanas; D: discriminação social; R: reconhecimento social.

O hipocampo aparece em destaque nos trabalhos com IR que atribuem a interferência na consolidação como causa do esquecimento. Argumenta-se que independente das memórias serem semelhantes ou não, se elas estiverem passando pela consolidação podem ser capazes de interferir uma na outra porque os recursos disponíveis para consolidar os traços de memória recentes seriam limitados (FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; WIXTED, 2004). Tendo como base as evidências vindas de indivíduos com remoção do lobo temporal medial ou somente do hipocampo, essa proposta coloca o hipocampo como a estrutura na qual a consolidação e, conseqüentemente, a interferência ocorrem (DAVIS; ZHONG, 2017; WIXTED, 2004). A remoção desse substrato neural é conhecida por seus efeitos de amnésia anterógrada (inabilidade de formar novas memórias) e amnésia retrógrada temporária (prejuízo de memórias que se formaram recentemente) (MILNER, 1965; MILNER; CORKIN; TEUBER, 1968; SCOVILLE; MILNER, 1957). Uma das explicações mais aceitas é de que essas implicações são causadas porque as estruturas ausentes são importantes para a consolidação, ou seja, com a remoção do hipocampo, memórias que estavam em processo de consolidação são perdidas (amnésia retrógrada) e novas memórias não persistem porque não são passíveis de serem consolidadas (amnésia anterógrada) (WIXTED, 2004).

No caso dos estudos com a IP, muitos trabalhos com roedores assumem que essa interferência acontece entre diferentes memórias que estão ligadas a aferências sensoriais muito semelhantes, ou seja, no momento da evocação, pistas parecidas que deveriam levar a reativação de traços de memória diferentes, acabam levando a evocação de apenas uma dessas memórias (EPP et al., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; MILLER; SAHAY, 2019). Outra abordagem comum para estudos com murinos, é atribuir à IP episódios de redução da flexibilidade cognitiva (capacidade de modificar a resposta a um mesmo estímulo) (ANACKER; HEN, 2017; DARBY et al., 2018; GARTHE; BEHR; KEMPERMANN, 2009; GUISE; SHAPIRO, 2017; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016). Nesse caso, uma memória antiga estaria interferindo em um aprendizado que poderia atualizar esse traço de memória. Por fim, uma perspectiva mais comum em estudos com humanos é se referir à IP como a explicação para situações em que não há a evocação de uma memória-alvo porque uma mesma pista estaria associada a diferentes traços

de memória (DAVIS; ZHONG, 2017; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; WIXTED, 2004).

Em suma, no nosso dia-a-dia estamos expostos a diferentes estímulos capazes de formarem novas memórias e modificar lembranças antigas. No entanto, nós não estamos conscientes dos mecanismos por trás desses processos. Quando nossas memórias são adquiridas e evocadas, elas passam por um processo de consolidação, sendo que os traços se encontram lábeis durante esses períodos. A labilidade das memórias associadas a diferentes estímulos que causam novos aprendizados pode resultar em interferências entre as memórias levando ao esquecimento. Nesse cenário, o hipocampo emerge como uma estrutura central onde tais processos acontecem. Todavia, ainda é desconhecido como ocorre a interação entre memórias e o que determina qual memória será esquecida e qual será lembrada, assim como os mecanismos neurais subjacentes a esses processos.

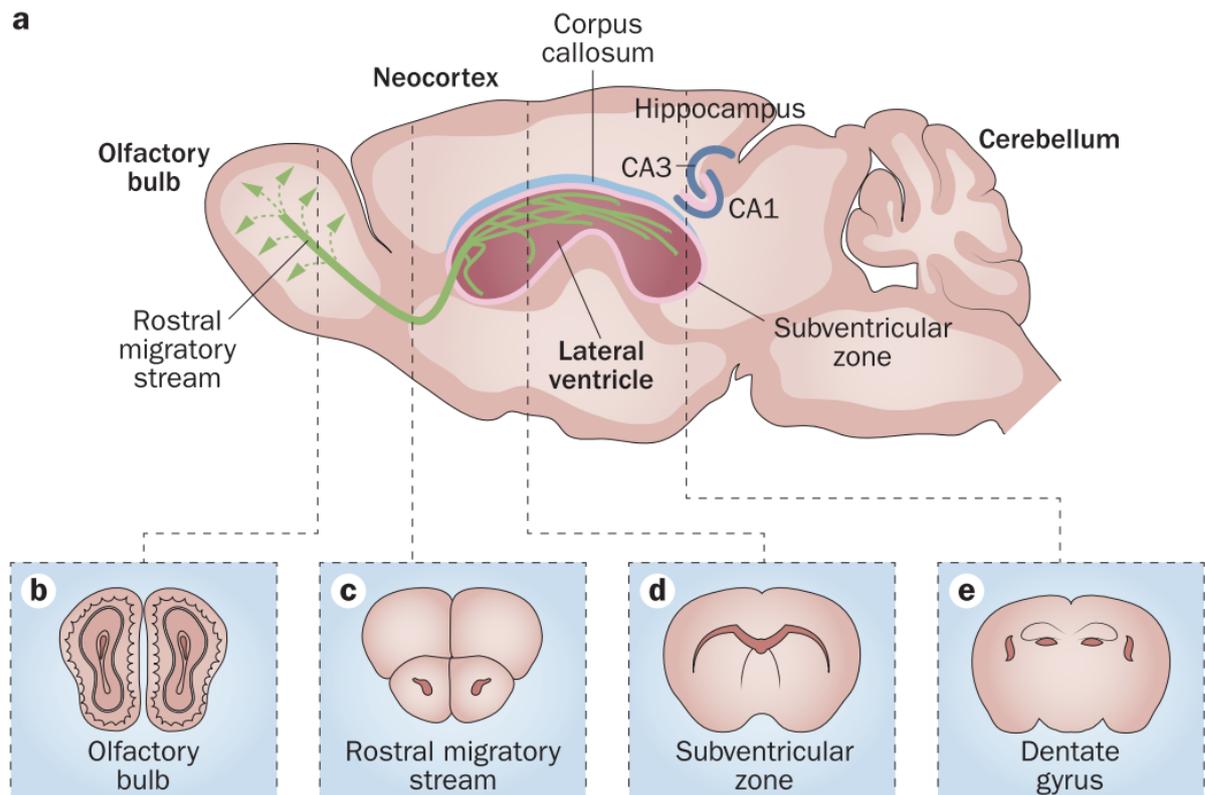
#### **1.4 Neurogênese adulta e interferência**

*“While it initially seemed logical that new neurons should be casually related to enhanced learning, the evidence for this causal relationship is still equivocal despite extremely intensive research trying to establish such link”*  
(Anat Barnea & Vladimir Pravosudov, 2011)

A neurogênese adulta é um evento plástico envolvendo a geração contínua de novos neurônios em duas regiões do cérebro adulto de mamíferos: a zona subventricular dos ventrículos laterais e a zona subgranular do giro denteado do hipocampo (Figura 6) (AGUILAR-ARREDONDO; ZEPEDA, 2018; DREW; FUSI; HEN, 2013; YAU; LI; SO, 2015; ZIEGLER; LEVISON; WOOD, 2015). Apesar das células progenitoras se originarem nessas duas regiões mencionadas, as que se multiplicam na zona subventricular podem migrar, pela via migratória rostral, e chegar ao bulbo olfatório. Desse modo, se reconhecem 4 regiões neurogênicas clássicas no cérebro murino adulto (Figura 6) (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; ZHAO; DENG; GAGE, 2008; ZIEGLER; LEVISON; WOOD, 2015).

Embora a discussão sobre a existência de neurogênese adulta, principalmente em humanos, atravesse décadas (ALTMAN, 1962a; ALTMAN; DAS, 1965; BOLDRINI et al., 2018; DREW; FUSI; HEN, 2013; ERIKSSON et al., 1998; LUCASSEN et al., 2019; PAROLISI; COZZI; BONFANTI, 2018; SORRELLS et al.,

2018; TAUPIN, 2006), a quantidade de evidências de que esse processo ocorre em roedores nos permite considerá-lo uma verdade científica (ALTMAN, 1962b, 1962a; ALTMAN; DAS, 1965; GONÇALVES; SCHAFFER; GAGE, 2016; PAROLISI; COZZI; BONFANTI, 2018; ZHAO; DENG; GAGE, 2008).



**Figura 6** – Áreas neurogênicas no cérebro murino adulto. (a) Vista sagital das áreas onde a neurogênese ocorre. As regiões em rosa escuro indicam as zonas onde encontramos células novas. Neurônios imaturos (verde) gerados na zona subventricular migram ao longo da via migratória rostral para o bulbo olfatório. (b-e) Fatias coronais do bulbo olfatório (b), via migratória rostral (c), zona subventricular (d) e giro dentado (e). Retirada de Ziegler, Levison e Wood (2014).

Entretanto, as funções fisiológicas da neurogênese em mamíferos ainda não são claras a muitos trabalhos se dedicam a tentar compreendê-las (AKERS et al., 2014c; DENG; AIMONE; GAGE, 2010; EPP et al., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; PEREIRA-CAIXETA et al., 2018; SAHAY et al., 2011; WINOCUR et al., 2012). No que diz respeito ao envolvimento dos neurônios novos na interferência da memória existem duas hipóteses que se destacam na literatura. A primeira se refere ao envolvimento da neurogênese com o processo de *pattern*

*separation* (FRANÇA et al., 2017; JOHNSTON et al., 2016; MILLER; SAHAY, 2019; TUNCDEMIR; LACEFIELD; HEN, 2019), enquanto a segunda, relaciona os neurônios novos à flexibilidade cognitiva (FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; WEISZ; ARGIBAY, 2012).

O processo de padrão de separação (*pattern separation*) pode ser definido como um mecanismo pelo qual aferências similares são transformados em eferências dissimilares, em outras palavras, os padrões de disparos dos neurônios do *output* são mais distintos uns dos outros do que os padrões de disparos dos neurônios do *input* (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; KUHL et al., 2010; MILLER; SAHAY, 2019). Essa função é atribuída ao giro denteado (GD), onde os padrões similares de ativação de neurônios que se sobrepõem no córtex entorrinal passam por uma desambiguação ao fazer sinapse com o GD, isso se reflete em populações distintas de neurônios sendo ativos em CA3 (FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016; LEUTGEB et al., 2007; MILLER; SAHAY, 2019). Pensando na memória, esse mecanismo é crucial para a evocação de diferentes informações que estão associadas a pistas muito semelhantes (ANACKER; HEN, 2017; BECKER, 2017; DENG; AIMONE; GAGE, 2010; LEUTGEB et al., 2007). Essas memórias com características similares e codificadas de formas parecidas geram interferências que levam a falhas futuras na evocação, nesse caso o *pattern separation* emerge como uma função essencial para evitar a interferência entre memórias (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016).

A neurogênese nesse contexto é uma facilitadora do processo de *pattern separation* e conseqüentemente modula positivamente a habilidade de formar memórias hipocampais distintas (AIMONE; DENG; GAGE, 2011; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016). As primeiras evidências do envolvimento dos neurônios novos com o *pattern separation* surgiram de modelos computacionais (BECKER, 2017; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016), posteriormente, experimentos com redução da neurogênese em modelos animais mostraram que essa condição causava prejuízo em tarefas comportamentais que dependem do *pattern separation*, enquanto que o aumento da formação de neurônios novos melhorava o desempenho nessas tarefas (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; FRANÇA et al., 2017; JOHNSTON et al., 2016). Em nível neuronal, Niibori e colaboradores (2012) mostraram que a redução da neurogênese levava a aumento na colocalização de neurônios ativos em CA3 em

contextos similares, reforçando a ligação dos neurônios novos com o processo de *pattern separation*. Embora existam muitas hipóteses, os mecanismos pelos quais essas células novas estão envolvidas com o *pattern separation* ainda não são conhecidos (FRANÇA et al., 2017; JOHNSTON et al., 2016; MILLER; SAHAY, 2019; TUNCDEMIR; LACEFIELD; HEN, 2019). Ademais, também existem resultados conflitantes quando à participação da neurogênese no *pattern separation* (BECKER, 2017).

Por outro lado, a flexibilidade cognitiva diz respeito à resposta diferencial a um mesmo estímulo, sendo crucial para a sobrevivência se considerarmos que o ambiente pode mudar com frequência (DARBY et al., 2018). Os trabalhos que relacionam esse processo à neurogênese propõem que os neurônios novos no hipocampo permitem a desestabilização de lembranças antigas e favorecem a codificação de novas memórias, possibilitando, desse modo, a atualização de informações sobre um mesmo estímulo (ANACKER; HEN, 2017; EPP et al., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013). Essa hipótese também tem origem em estudos com modelos computacionais, que se amparam em trabalhos que encontraram prejuízo comportamental sob a inibição da neurogênese apenas em condições de conflito que requerem a atualização da informação acerca de um determinado estímulo, como por exemplo, a mudança do local do choque em uma tarefa de *active place avoidance* ou a mudança da posição da plataforma no labirinto aquático de Morris (EPP et al., 2016; GARTHE; BEHR; KEMPERMANN, 2009; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016; SAHAY et al., 2011).

No que se refere à memória declarativa, são poucos os trabalhos que procuraram avaliar um possível envolvimento da neurogênese com as memórias de reconhecimento. No caso da MRO, Melani e colaboradores (2017) mostraram que o alojamento de camundongos em ambiente enriquecido, um estímulo conhecido pelo seu efeito pró-neurogênico (BROWN et al., 2003; KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997; VAN PRAAG; KEMPERMANN; AND GAGE, 1999), era capaz de aumentar a persistência da MRO. Bolz e colaboradores (2016) observaram que camundongos com acesso à roda de corrida, e conseqüente aumento da neurogênese, eram capazes de distinguir entre objetos muito similares na tarefa de RON. Ademais, Jessberger et al. (2009) revelaram que o bloqueio específico da neurogênese do GD em ratos era capaz de prejudicar a MRO desses animais.

Nosso grupo de pesquisa vem mostrando ao longo dos anos que a neurogênese está envolvida no processamento da memória social (GUARNIERI et al., 2020; MONTEIRO et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017, 2018; JAIMES et al., submetido). Manipulações que aumentam a neurogênese e potencializam a maturação dessas células foram capazes de aumentar a persistência da MRS (PEREIRA-CAIXETA et al., 2017; JAIMES et al., submetido). Em contrapartida, condições capazes de reduzir a neurogênese prejudicaram a MRS de longo-prazo (MONTEIRO et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017, 2018). Em particular, o trabalho de Pereira-Caixeta e colaboradores (2017) mostrou que uma interferência retroativa pelo teste de suspensão pela cauda (TSC) 6h após a aquisição da MRS é capaz de prejudicar a memória social de longa duração. Esse efeito pôde ser revertido pelo alojamento prévio dos animais em ambiente enriquecido. Além disso, o efeito promnésico do ambiente enriquecido é revertido quando a neurogênese é diminuída pela administração intra-cerebral do antimitótico AraC, dando suporte para a participação dos neurônios novos nesse processo (PEREIRA-CAIXETA et al., 2017).

Em conclusão, novos neurônios nascem todos os dias no cérebro adulto de roedores, mas a função exata dessas novas células, bem como o envolvimento desses neurônios em processos mnemônicos ainda é tema de diversos trabalhos e debates. Uma das funções propostas para os neurônios novos que nascem no giro denteado é a participação em mecanismos capazes de prevenir que uma memória seja capaz de interferir em outra. Além disso, também existem evidências da participação dessas células no processamento de memórias declarativas. Com base nisso, nós levantamos a hipótese de que o aumento da neurogênese no giro denteado seria capaz de proteger uma memória hipocampo dependente da interferência.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na vida cotidiana, passamos por diversos eventos de aprendizado em rápida sucessão, isso proporciona as circunstâncias para que diferentes memórias possam interagir entre si e, conseqüentemente, interferirem uma nas outras. Contudo, ainda desconhecemos como uma memória pode interagir com outra e causar a interferência, assim como o que determina qual memória será esquecida e qual será lembrada.

Na maioria das vezes que nos referimos a memória no dia-a-dia, estamos falando de memórias declarativas, àquelas lembranças capazes de modelar o mundo externo, referentes a conhecimentos do mundo e eventos da nossa vida (SQUIRE, 2004). Essas memórias também são aquelas que estão comprometidas em diversas doenças neurodegenerativas (CHENG et al., 2014; DUDAI, 2002; STANOJLOVIC et al., 2019). Em laboratório, um dos modelos de memórias declarativas mais usados são as memórias de reconhecimento, mais precisamente, de reconhecimento social e de objetos em roedores (BIALA, 2012; BIRD, 2017; CLARKE et al., 2010; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011). O estudo da neurobiologia dessas memórias permite a compreensão de seu funcionamento em situações fisiológicas, o que permite a investigação de suas modificações durante patologias, e conseqüentemente, o uso desse conhecimento para o desenvolvimento de futuros tratamentos.

Ademais, a memória social constitui uma característica crucial para o estabelecimento de relações intraespecíficas e vida em sociedade (ARAKAWA et al., 2008; KAVALIERS; CHOLERIS, 2017; OKUYAMA, 2017; SOKOLOWSKI et al., 2010), logo, conhecer suas bases contribui para a compreensão dos mecanismos por trás da relação entre indivíduos.

Tanto a memória social, quanto da memória de reconhecimento de objetos estão sujeitas a interferência e fornecem um modelo adequado para que estudemos esse fenômeno em laboratório (ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017; PERNA et al., 2015; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005; TANIMIZU et al., 2017; WANISCH; WOTJAK; ENGELMANN, 2008). A interferência é implicada como uma das explicações do esquecimento (ALVES; BUENO, 2017; DAVIS; ZHONG, 2017;

POLACK; JOZEFOWIEZ; MILLER, 2017; WIXTED, 2004), portanto, compreender as bases neurais de como a interferência ocorre, nos dá pistas dos mecanismos por trás do esquecimento.

Paralelamente, os neurônios novos que nascem no hipocampo vem sendo propostos como envolvidos nos processos capazes de minimizar a interferência entre memórias e também em mecanismos dos esquecimento (FRANÇA et al., 2017; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; JOHNSTON et al., 2016; MILLER; SAHAY, 2019; TUNCDEMIR; LACEFIELD; HEN, 2019; WEISZ; ARGIBAY, 2012), apesar de a função dessas células novas ainda não serem bem compreendidas, por conseguinte, ainda são necessários mais estudos afim de desvendar a relação da neurogênese com a interferência entre memórias.

Além disso, nosso grupo de pesquisa vem mostrando ao longo dos anos que a neurogênese está envolvida no processamento da memória social (GUARNIERI et al., 2020; MONTEIRO et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017, 2018; JAIMES et al., submetido) mas os mecanismos pelo qual essa relação se dá ainda não são bem compreendidos.

Diante do exposto, o presente trabalho se encaixa de forma a contribuir para o entendimento das bases neurais de memórias declarativas, da interferência entre memórias, da função dos neurônios novos no cérebro adulto e para a relação entre a neurogênese, o processamento de memórias e a interferência entre elas. Assim como para a continuação de uma linha de pesquisa já em andamento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a interferência em memórias dependentes do hipocampo e se esse fenômeno pode ser revertido pela administração de um fármaco capaz de aumentar a neurogênese.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar, em três linhagens diferentes de camundongo, se a mudança de um ambiente enriquecido ou mais espaçoso para um ambiente padrão é capaz de interferir na consolidação da memória social;
- Verificar se o teste de suspensão de cauda é capaz de interferir na consolidação da memória social e se esse efeito é restrito a uma janela de tempo específica em camundongos C57BL/6;
- Verificar se aprendizados dependentes do hipocampo são capazes de causar interferências entre si levando a prejuízos na aquisição ou consolidação dessas memórias em C57BL/6;
- Avaliar se a administração da memantina com o fim de aumentar a neurogênese no giro denteado é capaz de proteger os traços de memória da interferência.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Todos os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Nº do protocolo: 3019/2019) (Anexo).

No primeiro conjunto de experimentos, nós utilizamos três linhagens distintas de camundongos (Swiss, CD1 e C57BL/6) as quais já foram utilizadas em trabalhos anteriores do nosso grupo com memória social (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017, 2018; CASTRO, dados não publicados). Os animais experimentais eram machos com idades entre 7 a 12 semanas. Como estímulo social, foram utilizados camundongos juvenis machos das mesmas linhagens com idades entre 21 a 30 dias. Na segunda parte dos experimentos, nós optamos por utilizar apenas animais C57BL/6 pensando na perspectiva de usarmos ferramentas otimizadas para essa linhagem no futuro

Os animais da linhagem Swiss foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO), enquanto os CD1 E C57BL/6 foram comprados do Biotério Central da UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério de experimentação exclusivo para camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, onde ficaram alojados em gaiolas padrão para camundongo (28cm x 17cm x 12cm), com exceção dos animais em ambiente enriquecido ou caixa grande (item 4.2), mantidas em uma estante ventilada (Alesco, Brasil) com temperatura ambiente ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (40-70%) controlados, ciclo claro-escuro 12/12 horas e água e comida disponíveis *ad libitum*.

Após a alocação dos animais no biotério de experimentação, foi mantido um período de no mínimo três dias para o início dos experimentos afim de que os camundongos se habituassem ao novo alojamento. Sempre que os animais foram movidos para as salas onde ocorreram os experimentos, foi respeitado um período de uma hora para que os animais se habituassem ao novo ambiente.

### **4.2 Condições de alojamento diferenciadas**

Diferentes condições de alojamento foram utilizadas afim de serem trocadas para servirem como estímulo interferente da memória social. Os três tipos diferentes de ambientes foram: (1) ambiente enriquecido (AE) – composto por uma caixa

grande (40cm x 33cm x 16cm) contendo diversos objetos, como rolos de papelão, tocas, peças de lego e tiras de papel celofane; (2) caixa grande (CG) – consistia na mesma caixa utilizada no AE, porém sem os objetos; e (3) ambiente padrão (AP) – composto pela caixa padrão de camundongos (28cm x 17cm x 12cm). Os animais foram mantidos em AE ou CG por uma semana e trocados para o AP após o treino da memória social afim de interferir na consolidação.

Nas três condições de alojamento, o assoalho foi coberto com maravalha. A limpeza da caixa foi realizada duas vezes na semana, os mesmos objetos foram utilizados ao longo do AE, com exceção dos rolos de papelão que eram substituídos por novos no dia da limpeza da caixa quando se encontravam roídos.

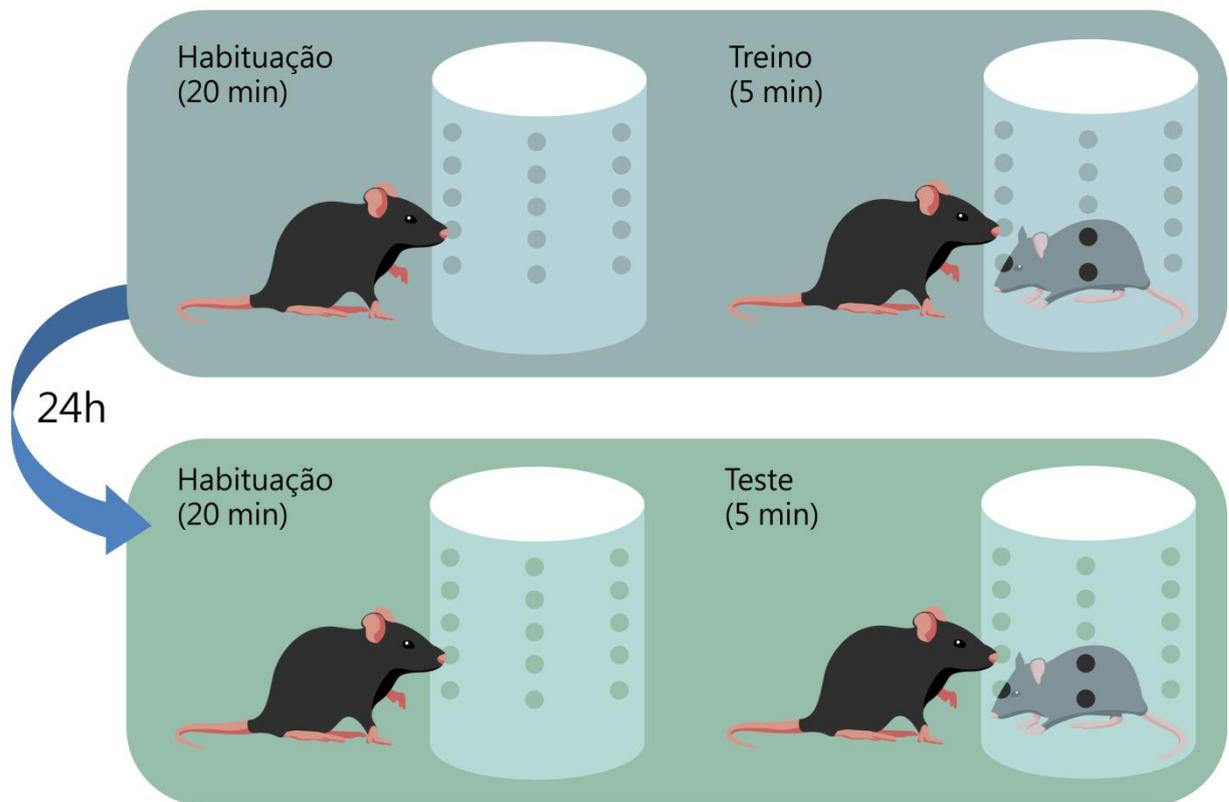
### **4.3 Ensaios comportamentais**

#### *4.3.1 Tarefa de reconhecimento social*

A tarefa de reconhecimento social (RS) foi utilizada para acessar a memória de reconhecimento social (MRS). O protocolo seguido foi adaptado da primeira versão proposta por Thor e Holloway em 1982 e já descrito em outros trabalhos do nosso grupo (GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; LÜSCHER DIAS et al., 2016; MONTEIRO et al., 2014; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017, 2018).

O teste é composto por três fases: habituação, treino e teste (Figura 7). Cada animal passou pela tarefa individualmente em um aparato que consistia de: (1) caixa padrão de camundongo (28cm x 17cm x 12cm) nova com o assoalho coberto de maravalha, e (2) um cilindro de acrílico transparente contendo 60 orifícios igualmente espaçados em sua parede e posicionado no centro da caixa. Todo o aparato foi limpo com álcool 70% entre os treinos e testes dos diferentes animais.

Durante a habituação foi permitido que os animais explorassem a nova caixa contendo o cilindro vazio por 20 min. Imediatamente após essa fase, o estímulo social (camundongo juvenil) foi introduzido no cilindro para a sessão de treino, a qual dura 5 min. (Figura 7. Superior). A memória para o juvenil foi testada 24h depois do treino na sessão de teste. O teste ocorreu da mesma forma que o treino e também foi precedido pela habituação (Figura 7. Inferior).



**Figura 7** - Tarefa de reconhecimento social. No primeiro dia da tarefa o animal experimental passa por uma habituação de 20 min. ao aparato no qual será realizado o teste e, em seguida, durante a sessão de treino, o estímulo social é inserido no cilindro e pode ser explorado por 5 min. A memória social de longo-prazo é testada 24h depois em uma sessão de teste que é idêntica ao treino e precedida pela habituação.

Com o auxílio de um cronômetro de mão, a variável quantificada durante o treino e teste foi o tempo de exploração social, ou seja, o tempo que o animal experimental passou explorando o estímulo social, que é padronizada como os momentos em que o camundongo mantém seu focinho e/ou vibrissas nos orifícios do cilindro.

Foram excluídos das análises finais, animais que exploraram menos do que 20s no treino. Esse tempo foi considerado como insuficiente para que o animal tenha a formação da MRS. Também foram eliminados animais que tiveram contratempos durante a tarefa (ex: fuga do estímulo social, troca do juvenil no dia do teste, ausência de exploração do ambiente/juvenil durante a tarefa).

Foi calculado um índice de reconhecimento social (IRS) de acordo com a fórmula:

$$IRS = \frac{\text{Tempo de exploração social no teste}}{\text{Tempo de exploração social no treino} + \text{no teste}}$$

O IRS foi comparado com o valor da chance de exploração do animal juvenil se esse é tido como uma novidade, ou seja 0,5 (50%). Consideramos que um grupo experimental possuía a MRS quando a média do seu IRS era significativamente menor do que 0,5 (GUARNIERI et al., 2020; PEREIRA-CAIXETA et al., 2018).

#### 4.3.2 *Teste de suspensão pela cauda*

O teste de suspensão pela cauda (TSC) é uma tarefa amplamente utilizada para avaliar o comportamento do tipo depressivo (GUARNIERI et al., 2020; STERU et al., 1985), mas no presente trabalho utilizamos o TSC como um estímulo estressante afim de tentar interferir retroativamente na MRS (PEREIRA-CAIXETA et al., 2017).

O TSC consistiu em suspender individualmente os animais experimentais pela cauda e fixá-los, com auxílio de fita adesiva, a uma estrutura posicionada a 60 cm do chão durante um período de 6 min (Figura 8) (GUARNIERI et al., 2020; STERU et al., 1985).



**Figura 8** - Desenho esquemático da posição do camundongo durante o TSC.

#### 4.3.3 *Tarefa de reconhecimento de objeto novo*

A tarefa de reconhecimento de objeto novo (RON) foi utilizada para acessar a memória de reconhecimento de objeto (MRO). O protocolo seguido foi de acordo com o publicado por Gresack e Frick (2006) (também utilizado por FERNANDEZ et al., 2008; PEREIRA et al., 2014).

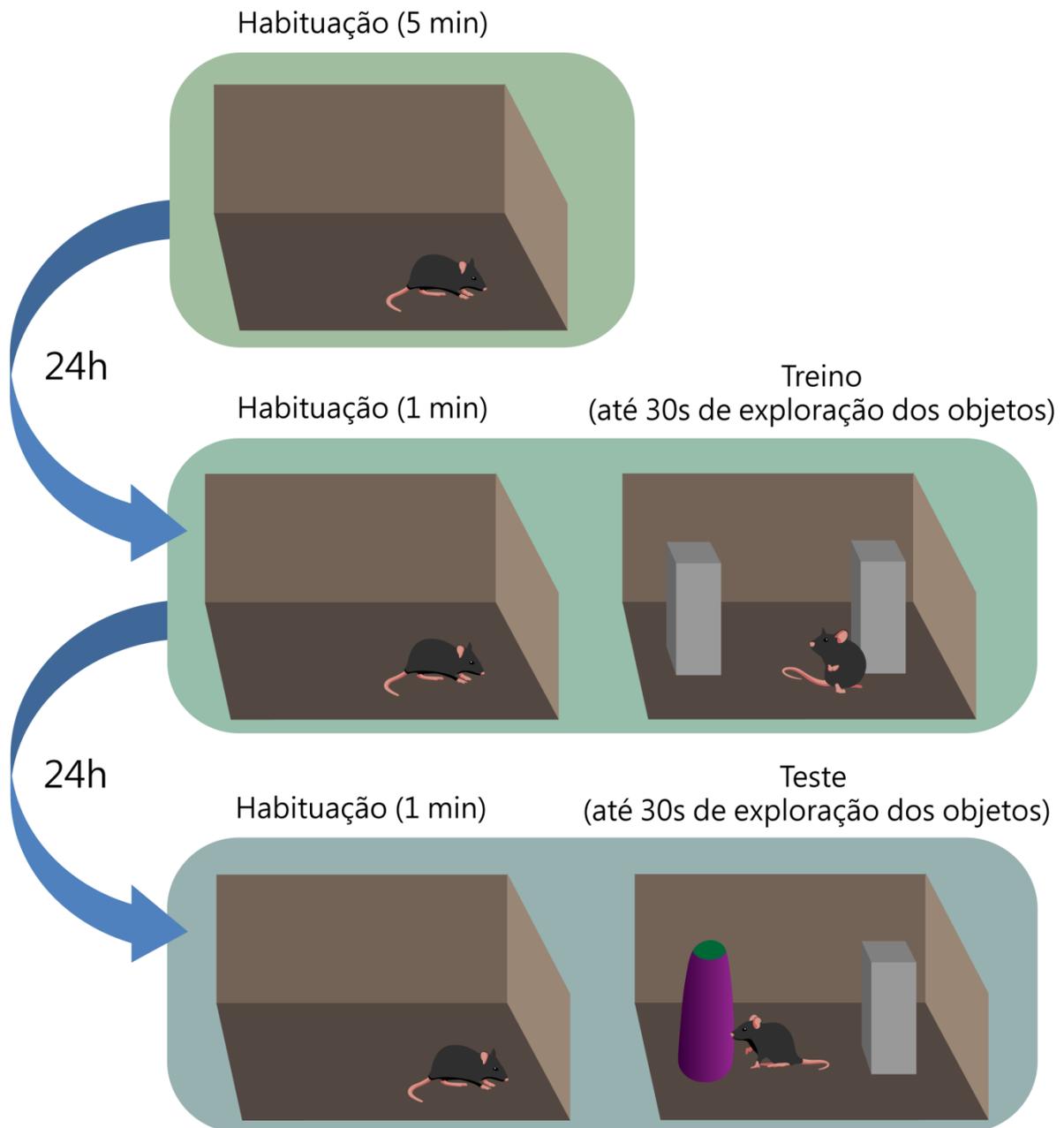
O teste é composto por três fases: habituação, treino e teste (Figura 9). Cada animal passou pela tarefa individualmente em um aparato que consistia de: (1) uma caixa preta com as dimensões de 50cm x 30cm x 16cm, e (2) dois pares de objetos, um consistia em potes de vidro transparente no formato de um paralelepípedo, contendo areia cinza no seu interior, e o outro par de objetos eram garrafas cilíndricas de vidro transparente na cor roxa contendo líquido em seu interior e uma tampa verde. Todo o aparato foi limpo com álcool 70% entre os treinos e testes dos diferentes animais.

Durante o primeiro dia do protocolo os animais foram habituados individualmente por 5 min. na caixa preta vazia (Figura 9. Superior). A sessão de treino ocorreu 24h depois, primeiramente os animais passaram por 1 min. de reabilitação à caixa preta vazia, em seguida, os objetos foram posicionados na caixa de modo que ficassem igualmente espaçados da parede e do centro. Foi permitido que o animal experimental explorasse ambos objetos até que a soma da exploração dos dois objetos fosse de 30s (Figura 9. Meio). A sessão de teste ocorreu 24h depois do treino e também foi precedida por uma reabilitação de 1 min. à caixa preta. Para a sessão de testes, um dos objetos utilizado no treino foi substituído por um novo objeto do par que não foi empregado no treino. Entretanto a posição dos objetos não variou entre treino e teste. Foi permitido que o animal experimental explorasse ambos objetos até que a soma da exploração dos dois objetos fosse de 30s (Figura 9. Inferior). O lado em que o objeto novo foi posicionado foi contrabalanceada entre os animais.

A exploração dos objetos e o tempo total da sessão de treino e teste foram quantificados com o auxílio de cronômetros de mão. A exploração dos objetos foi padronizada como o posicionamento da cabeça do indivíduo em direção ao objeto dentro de um raio de ~2cm ao redor dele. Não foi contado como exploração quando o animal se apoiava com as patas dianteiras no objeto e as traseiras no assoalho da caixa (*rearing*) (D'ISA; BRAMBILLA; FASANO, 2014).

Para a análise da memória, a média de cada grupo para o tempo de exploração de cada objeto foi comparada com a chance de investigação dos itens caso ambos fossem desconhecidos, ou seja 50% do tempo total de exploração (15s). Consideramos que o grupo tinha a MRO quando a média da investigação do

objeto familiar era significativamente menor do que 15s e a do objeto novo, significativamente maior do que 15s (FERNANDEZ et al., 2008; GRESACK; FRICK, 2006; PEREIRA et al., 2014).



**Figura 9** - Tarefa de reconhecimento de objeto novo. No primeiro dia o animal é habituado por 5 min. à caixa vazia onde a tarefa será realizada. (superior). 24h depois, o indivíduo é reabilitado por 1 min. à caixa vazia. Em seguida, um par de objetos idênticos são inseridos para a sessão de treino, que dura até que a soma da exploração dos dois objetos pelo animal seja de 30s (meio). 24h depois, o animal é reabilitado por 1 min. à caixa vazia. Em seguida, um par de objetos é inserido na caixa para a sessão de teste. Dessa vez, um dos objetos familiares é substituído por um novo. O teste dura até que a soma da exploração dos dois objetos seja de 20s (inferior).

#### 4.3.4 Caixa locomotora

A caixa locomotora consiste em um aparato composto por monitores de atividade locomotora (LE8811 IR Motor Activity Monitors), que compreendem uma unidade controle acoplada a um plano com sensores de infravermelho localizados ao redor da caixa com dimensões de 23cm x 23cm x 35cm. Esse sistema é controlado pelo programa ACTITRACK (v2.7.13), que possibilita a determinação da posição do sujeito experimental ao longo do tempo, permitindo a avaliação de diversos parâmetros.

Os animais passaram por uma sessão de 5 minutos na caixa para a avaliação da locomoção e atividade exploratória. Para isso, os seguintes dados foram levados em consideração: distância percorrida total, distância percorrida ao longo da sessão (avaliação em blocos de 1 min.) e número total de *rearings* (ou exploração vertical, se refere ao comportamento no qual os roedores se levantam mantendo apenas as patas traseiras no assoalho). A caixa teve seu assoalho e paredes limpas com álcool 70% entre as sessões com os diferentes sujeitos.

#### 4.4 Tratamento com memantina

A memantina (MEM) é uma droga utilizada clinicamente no tratamento da doença de Alzheimer e que apresenta benefícios em casos moderados a severos (ALAM et al., 2017; JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006; MAEKAWA et al., 2009). Seu principal mecanismo de ação é o antagonismo dos receptores glutamatérgicos NMDA (NMDAR). A MEM é classificada como um bloqueador de canal aberto, porque atua nos NMDAR entrando em seus canais, após sua abertura, e bloqueando o fluxo de corrente (ALAM et al., 2017; JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006).

Diferentes grupos de pesquisa reportaram aumento da proliferação celular e da neurogênese hipocampal após a administração desta droga em roedores, fazendo com que ela fosse usada posteriormente como um método para a manipulação da neurogênese (AKERS et al., 2014; ISHIKAWA et al., 2014, 2016; MAEKAWA et al., 2009; JAIMES et al., submetido).

No presente trabalho, a memantina (cloridrato de memantina 10mg; Eurofarma, Brasil) foi injetada em uma dose única de 25 mg/kg i.p. (AKERS et al.,

2014; ISHIKAWA et al., 2016; JAIMES et al., submetido) dissolvida em salina 0,9% com o objetivo de aumentar a neurogênese hipocampal. Os animais do grupo controle receberam o volume equivalente de salina 0,9%. Ambos os grupos passaram pela eutanásia no oitavo dia após a administração da droga ou controle.

#### **4.5 Imunohistoquímica**

Após os experimentos, os animais passaram pela perfusão intra-cardíaca (Figura 10). Para isso eles receberam uma injeção letal com cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e tiveram a sensibilidade a dor averiguada pelo reflexo de retirada da pata. Na ausência de sensibilidade, eles tiveram o coração perfundido com 10 mL de tampão fosfato e salina 0,01M (PBS 0,01M: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM; pH=7.4) seguidos de formaldeído 4% (m/v) em PBS 0,01M (FA 4%).

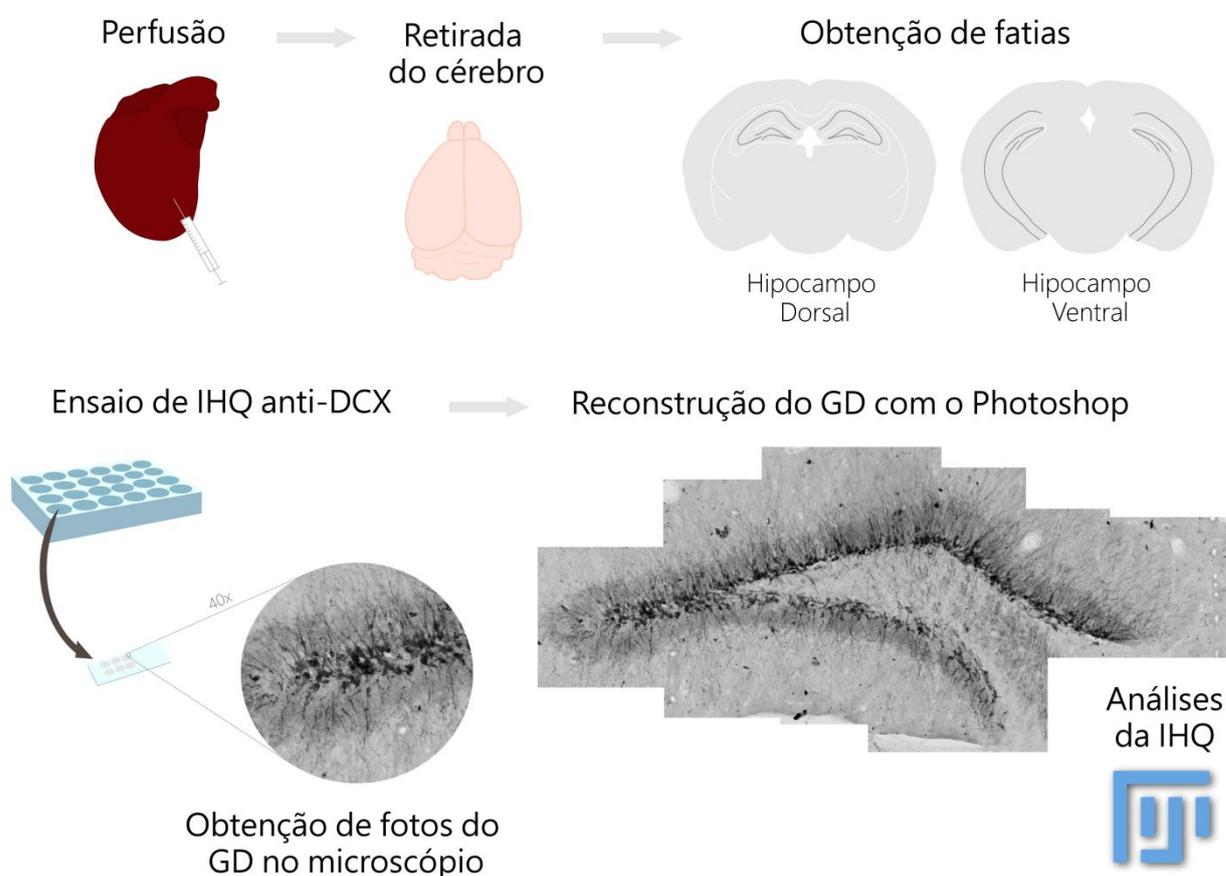
Imediatamente após a perfusão, os cérebros foram removidos e armazenados em FA 4% por 24h. Em seguida, eles foram transferidos para uma solução de sacarose 30% (m/v) em PBS 0,01M, onde permaneceram até serem fatiados.

Com o auxílio de um criostato, foram obtidas fatias de 40µm das regiões do hipocampo dorsal (HD) e ventral (HV) (Figura 10). As fatias foram armazenadas em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 0,01M 50% v/v e etileno glicol 30% v/v) até o ensaio de imunohistoquímica (IHQ).

A IHQ foi feita para marcar células positivas para a doublecortina (DCX) (Figura 10). A DCX é uma proteína associada a microtúbulos expressa exclusivamente em neurônios novos e, portanto, utilizada como marcador para esse tipo celular (PLÜMPE et al., 2006; RAO; SHETTY, 2004).

O protocolo da IHQ foi realizado em uma placa de 24 poços com o auxílio de pipetas de Pasteur de vidro. Foi padronizado a utilização de 10 fatias de hipocampo (5 do dorsal e 5 do ventral) por poço, sendo que cada poço correspondia a um animal. As fatias passaram por oito lavagens de 5 min. com PBS 0,01M e em seguida foram submetidas a temperatura de ~70°C na estufa por 30 min. em uma solução de Citrato 10 mM (pH=6.0). Depois disso as fatias foram lavadas com PBST 0,01% (Solução de PBS 0,01M e triton 0,1% v/v) por três vezes de 5 min. e com PBS 0,01M por três vezes de 2 min. Em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase

endógena passando as fatias por uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% m/v por 15 min. Após isso as fatias foram lavadas em PBS 0,01M por três vezes de 2 min. e deixadas incubando por 12h em BSA 5% em PBST 0,03% a ~4°C. Em seguida, sem retirar essa solução, foi adicionado o anticorpo primário anti-DCX feito em goat (SC-8066; Santa Cruz, USA) na concentração de 1:200 $\mu$ L, que ficou incubado por 48h a ~4°C. Após isso, as fatias foram lavadas em PBST 0,01% por três vezes de 2 min. e incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-goat (BA-5000; Vector Laboratories, USA) na concentração de 1:500 $\mu$ L em BSA 5% em PBST 0,3% por 24h a ~4°C. Em seguida, as fatias foram lavadas por três vezes de PBST 0,1%, seguida da incubação com o AB (1 gota de A, 1 gota de B para 5 mL de PBS 0,01M) (PK-4000, Vector Laboratories, USA). Após isso, as fatias foram lavadas por três vezes de 2 min. em PBS 0,01M e finalmente coradas com uma solução de DAB-Níquel (0,2 mg/mL de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), 25 mg/mL de Sulfato de Níquel, 0,083  $\mu$ L/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em Tris HCl 0,05M). Em seguida, elas foram lavadas por três vezes de 5 min. em PBS 0,01M e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. As lâminas foram deixadas secando por 24h e então foram diafanizadas, cobertas com o meio de montagem e lamínula para a observação no microscópio (Figura 10).



**Figura 10** - Sequência de métodos para a quantificação da neurogênese. Após os experimentos comportamentais, os animais foram anestesiados e passaram pela perfusão cardíaca seguida de retirada dos cérebros. Posteriormente, com o auxílio do criostato, foram obtidas fatias contendo os hipocampus dorsal e ventral. Essas fatias foram utilizadas para o ensaio de imunohistoquímica (IHQ) anti-doublecortina (DCX), uma proteína presente apenas nos neurônios novos. Mais tarde, os giros denteados (GD) foram fotografados com o auxílio de um microscópio no aumento de 40x. As fotos foram utilizadas para reconstrução do GD por inteiro e posterior análise do número de células marcadas/ área usando o software Fiji.

#### **4.6 Aquisição das imagens**

O giro denteado (GD) dos hipocampus dorsal e ventral foram fotografados nos aumentos de 5x e 40x no microscópio de luz Axiomager M2-Zeiss System com o auxílio do software Carl Zeiss Axiovision 4.8 (Figura 10).

Com o auxílio da ferramenta photomerge do Adobe Photoshop, todas as fotos do aumento de 40x de uma mesma fatia foram utilizadas para a reconstrução de uma imagem única de todo o giro denteado (Figura 10). A imagem resultante foi utilizada posteriormente para a análise das células marcadas.

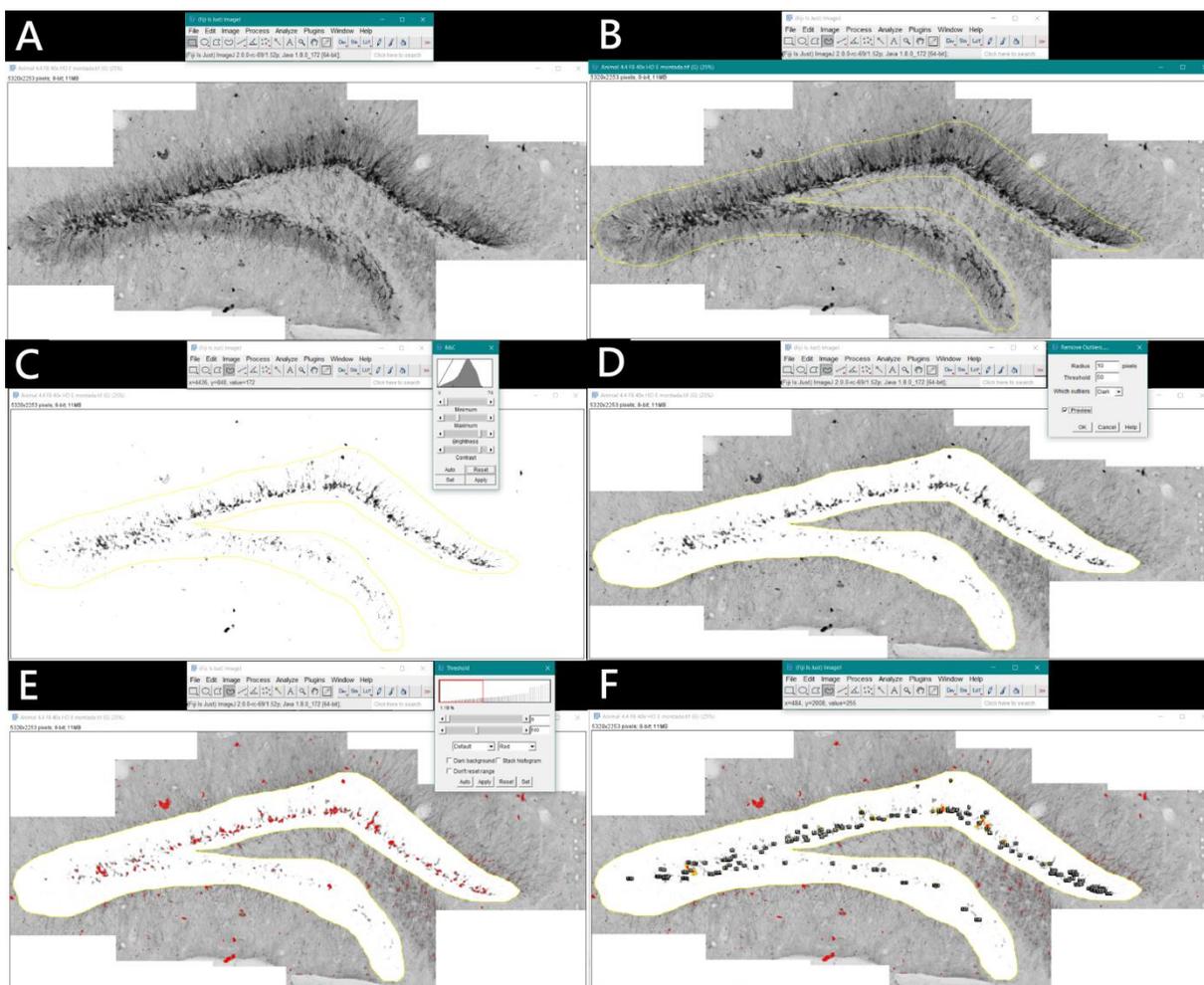
#### **4.7 Análise das imagens**

A análise das imagens foi feita com o auxílio do software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012) (Figura 10). O Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*) é uma versão aprimorada do programa de código aberto, amplamente utilizado pela comunidade científica, ImageJ (SCHINDELIN et al., 2015; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). O Fiji se diferencia basicamente por atualizar a arquitetura por trás do ImageJ afim de facilitar o desenvolvimento de novas soluções para a análise de imagens biológicas (SCHINDELIN et al., 2012).

Para a quantificação do número de células positivas para a marcação anti-DCX por área, a foto montada foi aberta no Fiji e teve seu tipo alterado para 8-bit (Figura 11.A). A camada granular do GD foi delimitada e teve a medida de sua área analisada pelo *software* (Figura 11.B). A imagem teve seu brilho aumentado (padronização na redução do valor do *maximum* até 75) (Figura 11.C) afim de criar um contraste maior entre as células e o *background* do tecido para reduzir o número de falsos positivos durante a análise. Em seguida, houve a exclusão de partículas escuras menores do que 10µm (Figura 11.D) e a passagem de um *threshold* de 0 e 100 (Figura 11.E). Finalmente, foi utilizada a ferramenta *analyze particles* (Figura

11.F), que é capaz de informar o número de células marcadas (DCX+) dentro da área delimitada.

Foram analisadas no mínimo 3 fatias de cada porção do hipocampo (dorsal e ventral) por animal, sendo que o valor do número de células DCX+ por área de cada indivíduo foi a média do valor obtido entre as fatias analisadas.



**Figura 11** - Análise do número de células DCX+ utilizando o software Fiji. (A) Foto a ser analisada aberta no programa. (B) Delimitação das camadas granular e subgranular do GD (circundada em amarelo). (C) Aumento do brilho da imagem. (D) Remoção de partículas escuras <10  $\mu\text{m}$ . (E) Aplicação do *threshold*. (F) Contagem das partículas.

#### 4.8 Análise estatística

Os dados obtidos passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov no *software* MINITAB (Versão 14) (ENNOS, 2012). Não foram detectados grupos que apresentaram distribuição fora da normalidade. Portanto, todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os testes foram

executados com o auxílio do *software* GraphPad Prism 8, considerando o nível de significância  $\alpha=0,05$ .

Para a análise do IRS e do tempo de exploração dos objetos familiar e novo foi utilizado o teste t de uma amostra para comparação das médias de IRS com o valor teórico de 0,5 (item 4.3.1) e do tempo de exploração com o valor da chance de 15s (item 4.3.3). Para demais comparações (tempo de duração dos treinos e teste, tempo de exploração do juvenil no treino, nº de células DCX+, distância percorrida total, número de *rearings*) contendo apenas uma variável e dois grupos, foi utilizado o teste t de Student.

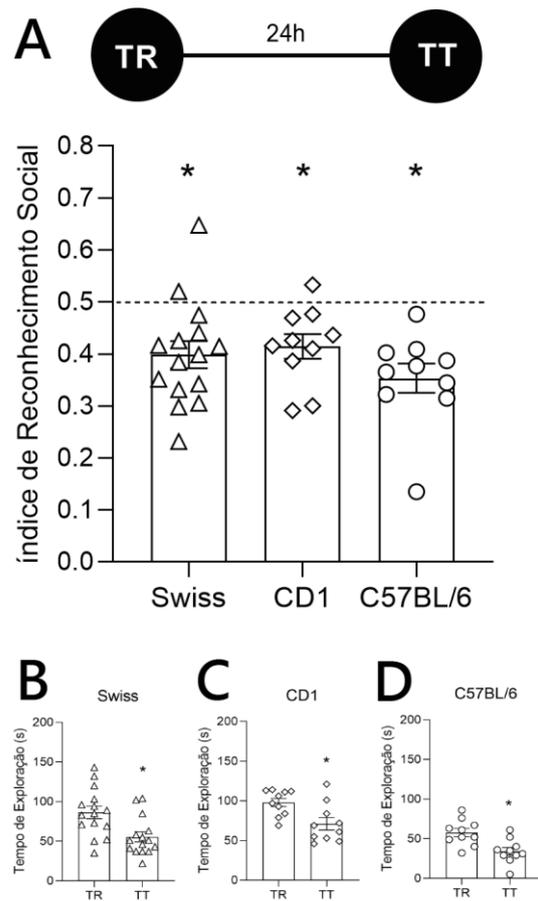
No caso da presença de duas variáveis (exploração dos objetos na direita e na esquerda e distância percorrida min. a min. por mais de um grupo), foi utilizado o ANOVA de duas vias. Análises *post-hoc* foram executadas conforme a necessidade e estão mencionadas nos resultados. Nesses casos utilizamos o teste de Bonferroni.

## 5. RESULTADOS

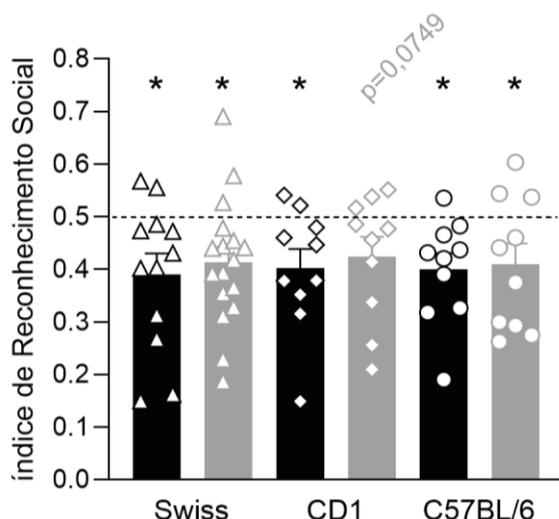
### 5.1 A mudança de ambiente não é capaz de interferir na memória social de longa duração

Primeiramente, quantificamos a memória social em três linhagens diferentes de camundongos (Swiss, CD1 e C57BL/6). Esses animais passaram apenas pelo treino (TR) e teste (TT) da memória social de longo prazo (Figura 12.A). Como esperado, os animais das três linhagens apresentaram a MRS de 24h. Isso foi demonstrado pela diferença significativa da média do IRS quando comparado com o valor hipotético de 0,5 (Figura 12.A) (teste t de uma amostra; Swiss:  $t=3,883$ ,  $P=0,0017$ ; CD1:  $t= 3,606$ ,  $P=0,0057$ ; C57BL/6:  $t=5,157$ ,  $P=0,0006$ ). A evidência da capacidade desses animais de formarem a MRS de longo prazo também foi apoiada pela diferença no tempo de exploração do indivíduo social entre o TR e o TT para as três linhagens (Figura 12.B-D) (teste t pareado; Swiss:  $t=4,945$ ,  $P=0,0002$ ; CD1:  $t=3,433$ ,  $P=0,0075$ ; C57BL/6:  $t=7,341$ ,  $P<0,0001$ ).

A seguir, nos perguntamos se a mudança de ambiente, de uma condição enriquecida para uma condição padrão seria capaz de interferir na consolidação da memória social. Os camundongos das três linhagens foram divididos em dois grupos. Um deles ficou alojado por uma semana em ambiente enriquecido (AE), e o outro, em uma caixa grande (CG). No sétimo dia os animais passaram pelo TR da MRS e em seguida passaram pela mudança de caixa como estímulo interferente. A partir desse momento, todos os animais de ambos os grupos foram alojados em ambiente padrão. A memória social foi testada 24h depois do TR no TT (Figura 13.A). De forma geral, a mudança de alojamento não foi um estímulo suficiente para causar a interferência na memória social, já que os grupos ambiente enriquecido e caixa grande de todas as linhagens apresentaram a memória social de longo prazo (Figura 13.B) (teste t de uma amostra; Swiss: AE:  $t=2,723$ ;  $P=0,0198$ ; CG:  $t=2,940$ ,  $P=0,0096$ ; CD1: AE:  $t=0,0254$ ,  $P=0,0254$ ; CG:  $t=2,014$ ;  $P=0,0749$ ; C57BL/6: AE:  $t=3,194$ ,  $P=0,0109$ ; CG:  $t=3,194$ ,  $P=0,0481$ ).



**Figura 12** – Camundongos das linhagens Swiss, CD1 e C57BL/6 são capazes de formar a memória social de longo prazo. Desenho experimental: diferentes linhagens de camundongo passaram pelo treino do reconhecimento social (TR) seguido 24h depois pelo teste (TT). (A) índice de reconhecimento social de cada grupo contrastado com o valor teórico de 0,5 no TT RS 24h. Os grupos são considerados como tendo a MRS quando apresentam média significativamente menor do que 0,5. \*diferente de 0,5;  $P < 0,05$ . (B-D) Tempo de exploração no TR e TT de camundongos Swiss (B), CD1 (C) e C57BL/6 (D). \*diferente do treino;  $P < 0,05$ .

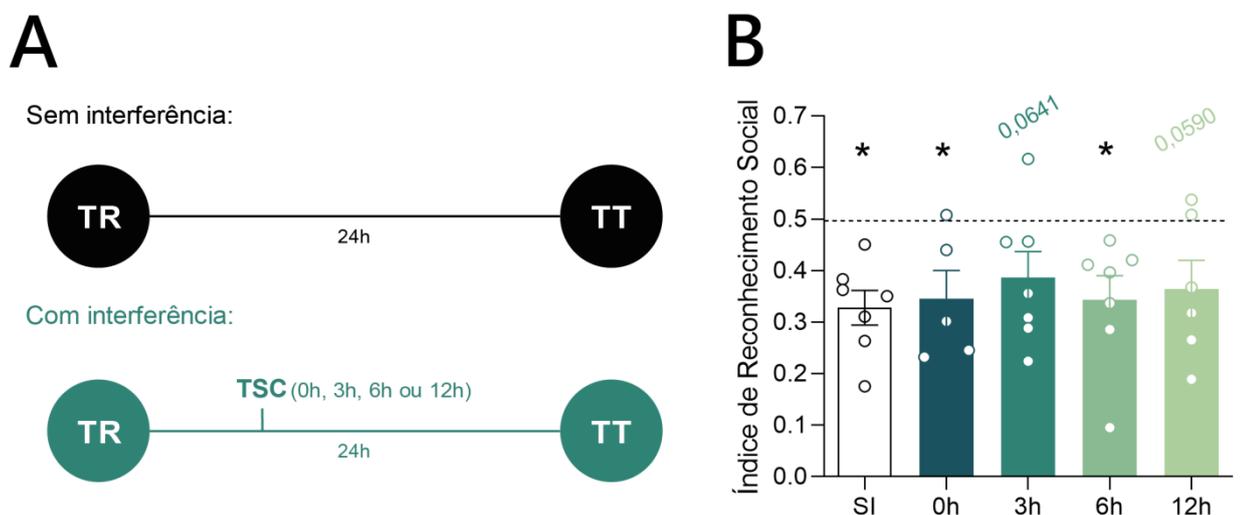
**A****B**

**Figura 13** - A mudança de ambiente, de uma condição enriquecida para uma padrão, não é capaz de interferir na memória social de longa duração. (A) Desenho experimental: os animais foram alojados em ambiente enriquecido ou na caixa grande por uma semana, no sétimo dia eles passaram pelo treino (TR) da memória social e em seguida foram transferidos para o ambiente padrão, onde foram mantidos até o teste (TT) da memória social, 24h após o TR. (B) Todos os grupos parecem ter a memória social de longo prazo. \*diferente de 0,5;  $P < 0,05$ .

## 5.2 O teste de suspensão pela cauda não causa interferência retroativa na memória social de camundongos C57BL/6

Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que o TSC é capaz de causar a interferência retroativa na MRS, quando apresentado 6h após a aprendizagem em camundongos da linhagem Swiss (PEREIRA-CAIXETA et al., 2017). Nós nos perguntamos se esse efeito também aconteceria em animais C57BL/6 e se ele seria restrito a alguma janela temporal específica durante a consolidação (ex: 6h após o treino), visto que as interferências têm efeitos diferentes de acordo com o horário em que são apresentadas (Figura 5).

Os animais foram distribuídos em cinco grupos: grupo controle sem interferência (SI) e grupos interferência pelo TSC imediatamente (0h), 3h, 6h ou 12h após o treino. Os horários das intervenções foram escolhidos com base em resultados prévios da literatura (Figura 5). O grupo controle passou apenas pelo treino (TR) e, 24 horas depois, pelo teste (TT) do RS, retornando para as suas caixas durante o intervalo entre TR e TT. Os grupos experimentais passaram pelo TR, seguido pelo TSC em diferentes horários de acordo com seu grupo, e pelo TT 24h depois do TR. Os animais retornaram para suas caixas nos intervalos entre TR e TSC e TSC e TT (Figura 14.A).



**Figura 14** - O teste de suspensão pela cauda não causa interferência retroativa na memória social de camundongos C57BL/6. (A) Desenho experimental: em preto o grupo controle sem interferência (SI) que passou apenas pelo treino (TR) seguido pelo teste (TT) da memória social; em verde os grupos com interferência pelo teste de suspensão de cauda (TSC) que passaram pelo TR seguido pelo TSC (0h, 3h, 6h ou 12h após o TR) e pelo TT 24h depois do TR. (B) índice de reconhecimento social de cada grupo contrastado com o valor teórico de 0,5. Os grupos são considerados como tendo a MRS quando apresentam média significativamente menor do que 0,5. \* $P < 0,05$ . Os valores apresentados acima das barras indicam os demais valores de P.

Os resultados mostraram que os grupos SI, 0h e 6h tiveram a média do IRS significativamente diferente de 0,5 (teste t de uma amostra; SI:  $t=5,117$ ,  $P=0,0022$ ; 0h:  $t=2,820$ ,  $P=0,0478$ ; 6h:  $t=3,358$ ,  $P=0,153$ ), ou seja, esses grupos foram capazes de lembrar do juvenil durante o TT, isso quer dizer que o TSC não foi capaz de interferir na MRS quando apresentado imediatamente ou 6h após o TR (Figura 14.B). Na análise estatística, os grupos 3h e 12h obtiveram valor de P muito próximo

do limite 0,05 (3h:  $t=2,265$ ,  $P=0,0641$ ; 12h:  $t=2,435$ ,  $P=0,0590$ ), dessa forma, nós interpretamos que a probabilidade de haver significância estatística, caso houvesse o aumento do tamanho da amostra, seria grande (Figura 14.B). Portanto, concluímos que o TSC também não foi capaz de interferir na MRS quando apresentado nestes tempos.

### **5.3 A memória social é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado no treino do reconhecimento de objeto novo**

Já que não conseguimos observar uma interferência na memória social pelo TSC, nos perguntamos se um aprendizado que depende de substratos neurais em comum com a MRS seria capaz de interferir nessa memória. Para responder essa pergunta, testamos tanto a possibilidade de uma interferência retroativa (IR) quanto de uma interferência proativa (IP). A janela de tempo de 3h foi escolhida com base na literatura (Figura 5) (ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011; PENA et al., 2014; PERNA et al., 2015). Para isso tivemos dois grupos: IR: os animais passaram pelo TR do RS, 3h depois pelo TR do reconhecimento de objeto novo (RON), a MRS foi testada 24h depois do TR RS durante o TT RS; IP: os animais foram submetidos ao TR RON e 3h depois ao TR RS, a memória foi testada 24h depois do TR RS no TT RS (Figura 15. A).

O grupo IR teve a MRS intacta no teste 24h depois (teste t de uma amostra;  $t=3,362$ ,  $P=0,0152$ ), enquanto o IP não apresentou memória (teste t de uma amostra;  $t=0,8729$ ,  $P=0,4227$ ) (Figura 15.B). Consequentemente, nós concluímos que o aprendizado do RON foi capaz de interferir proativamente na aquisição da MRS durante TR RS.

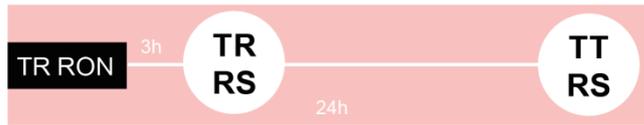
As análises para o tempo de duração do TR RON (teste t não pareado;  $t=0,9026$ ;  $P=0,3786$ ) não revelaram diferenças entre os grupos. O ANOVA de duas vias indicou diferença entre a exploração dos objetos no TR RON ( $F(1, 28)=7,766$ ,  $P=0,0095$ ; Interação:  $F(3, 28)=0,5500$ ,  $P=0,6523$ ; Grupos:  $F(3, 28)=0,000$ ,  $P>0,9999$ ), mas o pós-teste de Bonferroni não detectou diferenças significantes (Figura 15.B Gráficos menores).

**A**

Interferência Retroativa:



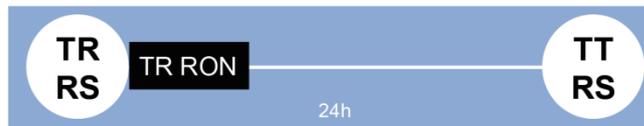
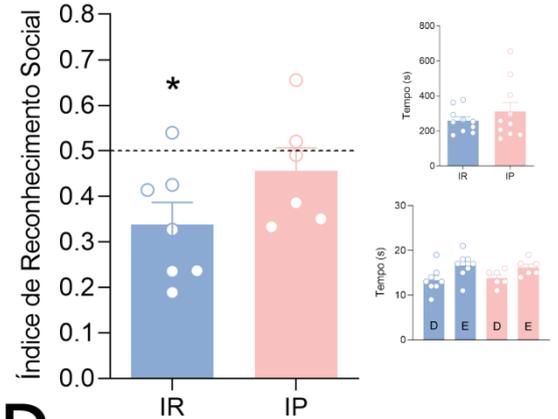
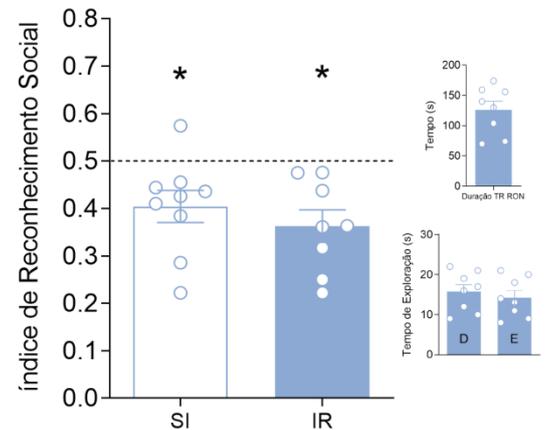
Interferência Proativa:

**C**

Sem interferência:



Interferência retroativa imediatamente depois:

**B****D**

**Figura 15** - A memória social é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado no treino do reconhecimento de objeto novo. (A) Desenho experimental: em azul o grupo interferência retroativa (IR), o treino para a tarefa de reconhecimento de objeto novo (RON) é feito 3h após o treino para o reconhecimento social (TR RS); em rosa o grupo interferência proativa (IP), o TR RON é feito 3h antes do TR RS. Ambos grupos são testados para a memória social 24h após TR RS na sessão de teste (TT RS). (B) Índice de reconhecimento social (IRS) dos grupos IR e IP. Os gráficos menores mostram a duração e a exploração dos objetos na direita e na esquerda do TR RON. (C) Desenho experimental: em branco o grupo sem interferência (SI) e em azul o grupo IR imediatamente após TR RS. Ambos os grupos passaram pelo TR RS e 24h depois pelo TT RS. O grupo IR passou pelo TR RON imediatamente após TR RS. (D) IRS dos grupos SI e IR. Os gráficos menores mostram a duração e a exploração dos objetos na direita e na esquerda durante o TR RON. \* $P < 0,05$ .

Ademais, nos perguntamos se a ausência da IR não teria sido por causa da janela de tempo de 3h escolhida com base na literatura, já que a interferência retroativa é amplamente relatada (Figura 5) (ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017; PERNA et al., 2015; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005; TANIMIZU et al., 2017;

WANISCH; WOTJAK; ENGELMANN, 2008) e nossa hipótese inicial era que seríamos capazes de observá-la acontecendo nesse modelo. Para testar isso, expusemos os animais a IR (TR RON) imediatamente após o TR RS, a MRS foi avaliada 24h após TR RON. O grupo controle (SI) passou apenas pelo TR e TT RS (Figura 15.C).

Em suporte aos resultados anteriores, nós observamos que o RON não foi capaz de interferir retroativamente na MRS, já que ambos grupos, SI e IR, foram capazes de lembrar do estímulo social 24h depois, como revelado pelo teste t de uma amostra (SI:  $t=2,825$ ,  $P=0,0223$ ; IR:  $t= 4,001$ ,  $P=0,0052$ ) (Figura 15.D). Como esperado, a análise para o tempo de exploração de cada objeto (teste t pareado;  $t=0,4286$ ,  $P=0,6811$ ) durante o TR RON do grupo IR mostraram que não houve diferença entre os objetos posicionados na direita (D) e na esquerda (E) (Figura 15.D inferior). Em conclusão, o RON foi capaz de interferir na MRS apenas quando apresentado antes da aquisição dessa memória social.

#### **5.4 A memória de reconhecimento de objeto é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado social**

Desde que observamos no experimento anterior que o aprendizado da tarefa de RON era capaz de interferir na aquisição da MRS, nós nos perguntamos se o contrário também seria capaz de acontecer. Isto é, se a MRS seria capaz de interferir na MRO.

Para investigarmos isso tivemos dois grupos: IR: os animais passaram pelo TR RON, seguido pelo TR RS 3h depois; IP: os animais passaram pelo TR RS, seguido pelo TR RON 3h depois. A MRO foi testada em ambos os grupos numa sessão de teste (TT RON) 24h depois do TR RON (Figura 16.A).

As médias do tempo de exploração dos objetos familiar e novo durante o TT RON foram contrastados com o valor da chance de exploração dos objetos caso ambos fossem novos (50%, ou seja, 15s). O teste t de uma amostra revelou que o grupo IR explorou significativamente mais do que 15s o objeto novo ( $t=3,844$ ,  $P=0,0039$ ) e menos do que 15s o objeto familiar ( $t=3,844$ ,  $P=0,0039$ ). Diferente do que IP, no qual não houve diferença significativa (Novo:  $t=1,894$ ,  $P= 0,1001$ ; Familiar:  $t=1,894$ ,  $P=0,1001$ ) (Figura 16.B).

Como esperado, os grupos não diferiram um do outro no tempo de duração do TR RON (teste t não pareado;  $t=0,01124$ ,  $P=0,9912$ ) e TT RON (teste t não pareado;  $t=1,042$ ,  $P=0,3127$ ). Também não houve diferença nos tempos de exploração dos objetos da D e da E durante TR RON (ANOVA de duas vias seguido do *post-hoc* Bonferroni; Interação:  $F(1, 16)=1,210$ ,  $P=0,2876$ ; Objeto:  $F(1, 16)=4,173$ ,  $P=0,0579$ ; Grupo:  $F(1,16)=0,000$ ,  $P>0,9999$ ) (Figura 16.B). Em síntese, nossos resultados mostram que o aprendizado social foi capaz de interferir na MRO apenas quando apresentado antes da aquisição dessa memória.

# A

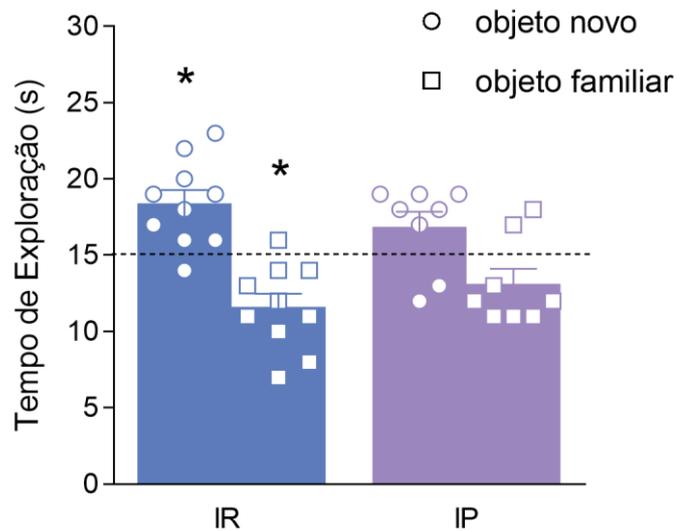
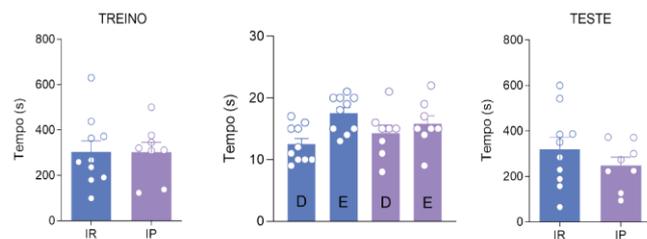
Interferência Retroativa:



Interferência Proativa:



# B



**Figura 16** - A memória de reconhecimento de objeto é suscetível à interferência proativa pelo aprendizado social. (A) Desenho experimental: o grupo interferência retroativa (IR), em azul, passou pelo treino do reconhecimento de objeto novo (TR RON) e 3h depois pelo treino do reconhecimento social (TR RS); o grupo interferência proativa (IP), em roxo, passou pelo TR RS e 3h depois pelo TR RON. Ambos os grupos tiveram a memória de reconhecimento de objeto avaliada 24h depois do TR RON numa sessão de teste (TT RON). (B) Superior: tempo de duração do TR RON, tempo de

exploração dos objetos da direita (D) e da esquerda (E) durante TR RON) e tempo de duração do TT RON; Inferior: tempo de exploração dos objetos novo e familiar durante TT RON. \* $P < 0,05$ .

### **5.5 Não é possível detectar aumento da neurogênese 8 dias após a administração da memantina**

Nós formulamos a hipótese de que o aumento da neurogênese no giro denteado (GD) do hipocampo talvez fosse capaz de prevenir a interferência proativa observada. Afim de testar essa hipótese, escolhemos como método capaz de aumentar a neurogênese, o antagonista de receptores NMDA, memantina (item 4.4). No primeiro dia do desenho experimental, um dos grupos experimentais recebeu uma dose única de memantina (25 mg/kg i.p.) (MEM), enquanto o grupo controle recebeu salina (SAL) em um volume equivalente. Nós aguardamos um período de 7 dias entre a administração da droga e o início dos experimentos comportamentais. Os animais passaram pelo TR RON como estímulo de interferência e, 3h depois, pelo TR RS, 24 horas depois a memória foi testada no TT RS (Figura 17.A).

Diferente do que esperávamos, nenhum dos grupos teve a memória social (teste t de uma amostra; SAL:  $t=2,129$ ,  $P=0,0773$ ; MEM:  $t=3538$ ,  $P=0,7379$ ) (Figura 17.B). As análises do tempo de duração (teste t não pareado;  $t=0,9546$ ,  $P=0,3603$ ) e da exploração dos objetos durante o TR RON (ANOVA de duas vias; Interação:  $F(1, 11)=0,04840$ ,  $P=0,8299$ ; Objeto:  $F(1, 11)=1,062$ ,  $P=0,3249$ ; Droga:  $F(1, 11)=0,000$ ,  $P>0,9999$ ) não revelaram diferenças entre os grupos (Figura 17. B gráficos menores). Surpreendentemente, o teste t não pareado detectou uma diferença entre a exploração social durante o treino, sendo que o grupo MEM investigou menos o animal juvenil do que o grupo SAL ( $t=3,504$ ,  $P=0,0049$ ) (Figura 17.B gráfico menor inferior).

Devido a redução da exploração social durante o TR RS no grupo MEM, nós decidimos avaliar a função locomotora de animais que receberam essa droga, para testar a hipótese de que a redução da investigação social pudesse ser devido a um possível prejuízo na locomoção. Para isso, um grupo recebeu memantina como no experimento anterior e outro grupo recebeu salina. Esses animais foram testados na caixa locomotora 7 dias depois da injeção. Não houveram diferenças no total de distância percorrida (teste t não pareado;  $t=0,4290$ ,  $P=0,6749$ ), nem no número de *rearings* (teste t não pareado;  $t=0,5790$ ,  $P=0,5725$ ), e nem na dinâmica da distância

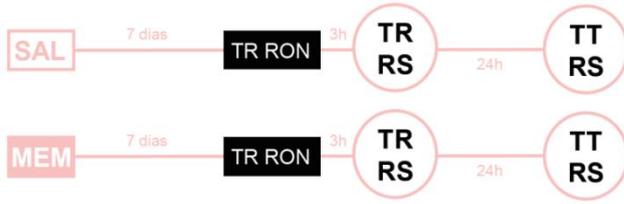
percorrida ao longo da sessão (ANOVA de duas vias; Interação:  $F(4, 52)=1,039$ ,  $P=0,3959$ ; Tempo:  $F(4, 52)=0,2206$ ; Droga:  $F(1, 13)=0,1818$ ,  $P=0,6768$ ) (Figura 17.E). Esses dados, nos permitiram concluir que a MEM não reduz a exploração social por déficit locomotor.

Os animais que passaram pela tarefa de RS tiveram seus cérebros perfundidos, retirados e fatiados para a obtenção de secções contendo os hipocampus dorsal e ventral. Essas fatias foram posteriormente submetidas a imunohistoquímica para a marcação da DCX, permitindo a quantificação dos neurônios novos no GD do hipocampo. Inesperadamente, não foi possível detectar aumento dos neurônios novos nem no hipocampo dorsal (teste t não pareado;  $t=0,2905$ ,  $P=0,7788$ ) (Figura 17.C), nem no ventral (teste t não pareado;  $t=1,140$ ,  $P=0,2874$ ) (Figura 17.D).

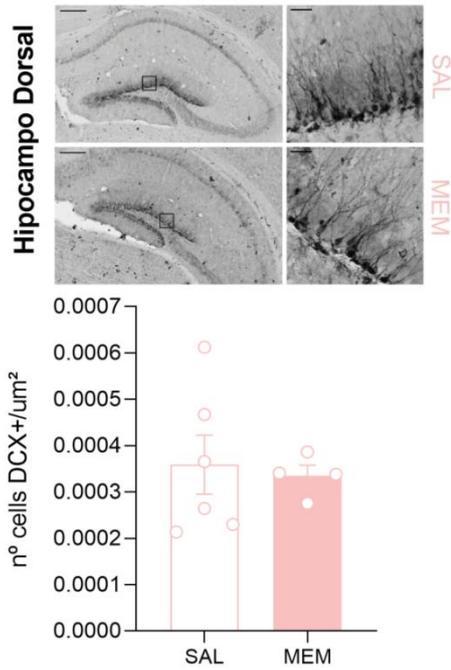
Alguns experimentos na literatura mostram efeitos do aumento da neurogênese quando o estímulo neurogênico é aplicado após o treino da tarefa comportamental (AKERS et al., 2014; EPP et al., 2016). Com o intuito de testar a hipótese de que esse não seria o caso no nosso experimento, outro grupo de animais passou pelo TR RON, seguido 3h depois pelo TR RS e 24h depois recebeu a administração de MEM ou SAL. A MRS foi testada 6 dias após a injeção (Figura 17.F superior). Novamente, nenhum dos grupos foi capaz de se lembrar do juvenil (teste t de uma amostra; SAL:  $t=0,4406$ ,  $P=0,6749$ ; MEM:  $t=1,290$ ,  $P=0,2380$ ) (Figura 17.F). Não houveram diferenças no tempo de duração do TR RON ( $t=0,8026$ ,  $P=0,4366$ ), na exploração dos objetos (ANOVA de duas vias; Interação:  $F(1, 13)=0,8531$ ,  $P=0,3725$ ; Objetos:  $F(1, 13)=4,645$ ,  $P=0,0505$ ; Droga:  $F(1, 13)=0,000$ ,  $P>0,999$ ) e na exploração social durante TR RS (teste t não pareado;  $t=0,041196$ ,  $P=0,9672$ ).

Em síntese, podemos concluir com base nesses resultados que a memantina não foi capaz de aumentar a neurogênese durante a janela de tempo de 8 dias. Além disso, ela não foi capaz de prevenir o TR RON de interferir proativamente no aprendizado da memória social.

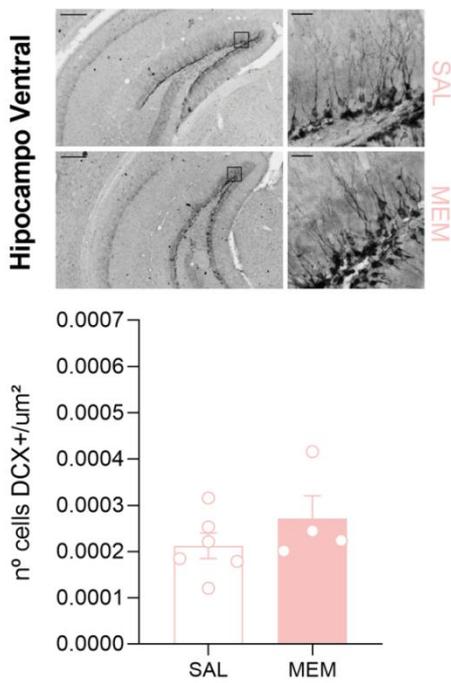
**A**



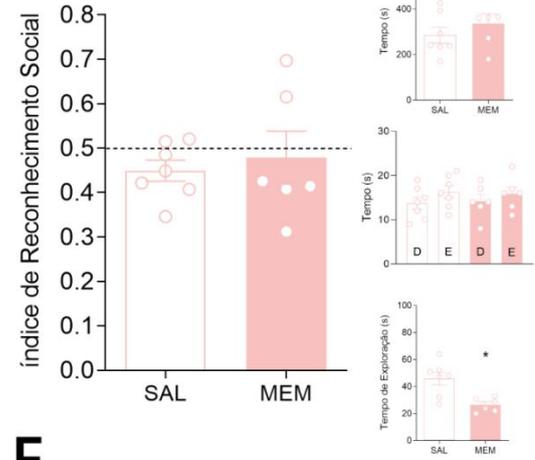
**C**



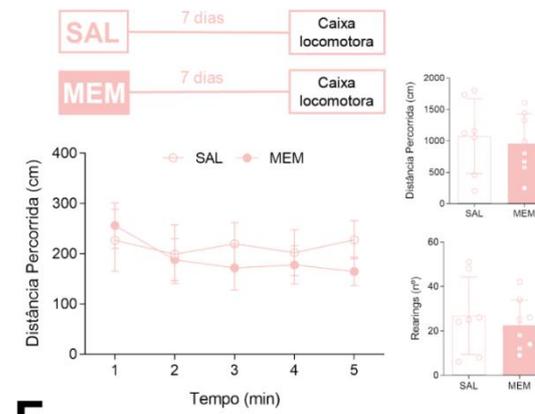
**D**



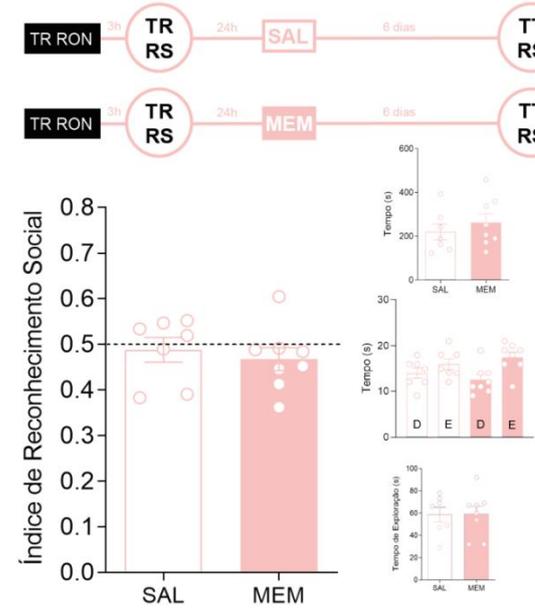
**B**



**E**



**F**



**Figura 17** - Não é possível detectar aumento da neurogênese 8 dias após a administração da memantina. (A) Desenho experimental: no primeiro dia do protocolo os animais receberam salina (SAL) ou memantina (MEM), 7 dias depois eles passaram pelo treino do reconhecimento de objeto novo (TR RON), seguido 3h depois pelo treino do reconhecimento social (TR RS), 24h depois eles foram submetidos ao teste do reconhecimento social (TT RS). (B) Esquerda: índice de reconhecimento social (IRS) dos grupos SAL e MEM; superior: tempo de duração do TR RON; meio: tempo de exploração dos objetos da direita e da esquerda durante o TR RON; inferior: tempo de exploração social durante o TR RS. (C-D) Imagens representativas e quantificação do número de células positivas para doublecortina por área ( $n^{\circ}$  cells DCX+/um<sup>2</sup>) nos hipocampus dorsal (C) e ventral (D) (escala do aumento menor (objetiva de 5x) = 200um; escala do aumento maior (objetiva de 40x) = 20um). (E) Desenho experimental: no primeiro dia os animais receberam SAL ou MEM, 7 dias depois eles tiveram a mobilidade avaliada na caixa locomotora. Esquerda: dinâmica da distância percorrida (cm) a cada minuto durante a sessão de 5 min; direita superior: distância percorrida total; direita inferior: número total de *rearings*. (F) Desenho experimental: os animais passaram pelo TR RON, seguido 3h depois pelo TR RS. 24h depois um dos grupos recebeu SAL e o outro MEM. 6 dias depois eles testados no TT RS. Esquerda: IRS; direita superior: tempo total de duração do TR RON; direita meio: tempo de exploração dos objetos durante TR RON; direita inferior: tempo de exploração social durante o TR RS. \*P<0,05.

## 6. DISCUSSÃO

Nosso grupo de pesquisa vem investigando a neurobiologia da memória social ao longo dos últimos anos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012; LÜSCHER DIAS et al., 2016; MONTEIRO et al., 2014; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017, 2018; JAIMES et al., submetido; CASTRO et al., dados não publicados). Esses trabalhos reúnem resultados em três linhagens distintas de camundongos (Swiss, CD1 e C57BL/6), por esse motivo, escolhemos utilizar essas três linhagens no nosso primeiro experimento. Nossos resultados reproduziram dados prévios que mostram que todas essas linhagens possuem a MRS de longo prazo. De maneira interessante, podemos observar que os tempos de exploração principalmente entre as linhagens heterogênicas em comparação com o C57BL/6, uma linhagem isogênica, parecem diferir. De fato, existem particularidades com relação às diferentes linhagens que as tornam mais adequadas a determinados estudos (BROOKS et al., 2005; KIM et al., 2017; NGUYEN et al., 2000; PARMIGIANI et al., 1999; SCHIMANSKI; NGUYEN, 2004). Para o presente trabalho, a linhagem C57BL/6, apesar de apresentar tempos de exploração menores, foi a escolhida para os experimentos subsequentes, pois é relatada como capaz de aprender muito bem tarefas de memórias (BROOKS et al., 2005; PARMIGIANI et al., 1999; SCHIMANSKI; NGUYEN, 2004) e possui altos níveis de neurogênese (KIM et al., 2017).

Ainda utilizando as linhagens Swiss, CD1 e C57BL/6, nossos resultados indicam, de maneira geral, que a troca de ambiente após o treino não interfere na memória social. Isso se opõe à situação observada por Engelmann, Hädicke e Noack (2011). Eles expuseram camundongos C57BL/6JOlaHsd a uma nova caixa por 4 min. 3h depois do treino da memória social e observaram um prejuízo da memória de longo prazo. Entretanto, uma hipótese possível para a divergência entre os nossos resultados pode ser porque eles utilizaram um paradigma diferente do que nós empregamos para avaliar a memória social.

Por outro lado, a memória social em camundongos Swiss é sensível a interferência pela exposição ao teste de suspensão de cauda (TSC) (PEREIRA-CAIXETA et al., 2017), Entretanto, nós não encontramos um efeito robusto do TSC como interferente na memória social de camundongos C57BL/6. Uma interpretação

para esse resultado seria a de que constitutivamente a MRS desses animais é mais resistente à interferência, o que é compatível com o fenótipo de bons aprendizes que esses animais apresentam (BROOKS et al., 2005; PARMIGIANI et al., 1999; SCHIMANSKI; NGUYEN, 2004). De fato, nosso grupo já encontrou distinções quanto a memória social nessas duas linhagens (Swiss e C57BL/6), sendo a persistência dessa memória mais longa nos animais C57BL/6 (MANSK et al., dados não publicados; JAIMES et al., dados não publicados). Ademais, o efeito de interferência do TSC pode ser atribuído a carga estressante que essa experiência apresenta (CAN et al., 2011; HIRAOKA et al., 2017) e existem evidências indicando que camundongos C57BL/6 parecem mais resilientes ao estresse (POULTER et al., 2010; SAVIGNAC; DINAN; CRYAN, 2011), o que também pode explicar a ausência de interferência na MRS por esse estímulo.

Uma vez que a memória social de animais C57BL/6 apresentou-se resistente a interferências estressoras (TSC) e à novidade (mudança de ambiente), nós decidimos testar a teoria da interferência do ponto de vista clássico de um aprendizado interferir no outro. A seguir, levantamos a hipótese de que outra memória hipocampo dependente, como a MRO, poderia interferir na consolidação da MRS. Entretanto, o treino no RON realizado imediatamente ou 3h após o treino do RS não foi suficiente para interferir de forma retrógrada na MRS. Também testamos se o treino no RS podia interferir na consolidação da MRO, e igualmente, não observamos a IR. Essa ausência de IR foi inesperada, já que a maioria dos trabalhos com interferência na memória relatam esse efeito ou usam desse efeito para estudar a consolidação (DUDAI, 2004; ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011; GLICKMAN, 1961; IZQUIERDO et al., 1999; MCGAUGH, 1966; NETTO; DIAS; IZQUIERDO, 1985; PENA et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017; PERNA et al., 2015; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005; TANIMIZU et al., 2017; WANISCH; WOTJAK; ENGELMANN, 2008; WIXTED, 2004).

Paralelamente aos experimentos testando a IR, também usamos um desenho experimental que testou outra forma clássica de interferência, que é a proativa (IP). Nossos resultados mostraram que a aquisição e os estágios iniciais de consolidação de uma memória interferiram na formação de uma memória subsequente. Sendo que isso foi observado tanto para a MRO, quanto para a MRS.

A IP vem sendo observada entre memórias muito semelhantes (ANACKER; HEN, 2017; EPP et al., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; GARTHE; BEHR; KEMPERMANN, 2009; GUISE; SHAPIRO, 2017; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016; MILLER; SAHAY, 2019), entre uma memória antiga que impede um aprendizado capaz de atualizar esse traço (ANACKER; HEN, 2017; GARTHE; BEHR; KEMPERMANN, 2009; GUISE; SHAPIRO, 2017; HVOSLEF-EIDE; OOMEN, 2016), e durante interferências no momento da evocação que impedem a recuperação de uma memória-alvo (DAVIS; ZHONG, 2017; EPP et al., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; MILLER; SAHAY, 2019; WIXTED, 2004). Entretanto, em todas essas interpretações, tanto a memória, quanto o tipo de interferência utilizados são semelhantes ou usam pistas em comum. Isso difere do modelo utilizado por nós, no qual as memórias não compartilham conteúdos semelhantes, mas sim possuem substratos neurais centrais em comum. Isso nos faz levantar a hipótese de que a interferência está ocorrendo a nível dos substratos ou mecanismos neuronais envolvidos no processamento dessas memórias e não por causa de conteúdos em comum.

Ao examinarmos a dinâmica temporal dos acontecimentos, o aprendizado de A (MRO ou MRS), 3h antes do aprendizado de B (MRS ou MRO), foi capaz de causar o esquecimento de B, propomos duas hipóteses prováveis para explicar a causa da interferência de A sobre B: (1) durante a aquisição de B, ainda estão ocorrendo processos neurais da consolidação de A, provavelmente envolvendo algum substrato neural em comum com a aquisição de B, e tais mecanismos de alguma forma interferem na formação de uma memória de B (ROBERTSON, 2012), ou (2) ambas as memórias, (MRO e MRS) são formadas, porém de alguma forma elas se tornam associadas e uma é capaz de interferir na outra no momento da evocação. Nós acreditamos que a chance da primeira hipótese ser verdadeira é maior, já o caso de interferência de memórias na evocação costuma ser reportado entre memórias parecidas (EPP et al., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; MILLER; SAHAY, 2019; WIXTED, 2004). A primeira hipótese é possível de ser testada em futuros experimentos utilizando inibidores de síntese protéica capazes de impedir a consolidação da memória de A, sem afetar a formação da memória de B. Dessa forma, se a memória de B estiver intacta 24h depois, essa evidência dará

força para que processos subjacentes a consolidação de A estão interferindo na aquisição de B (CROSSLEY et al., 2019).

Dentre os trabalhos que estudam a interferência de uma memória sobre a outra, são menos comuns os que utilizam como estímulo interferente um traço de memória que não compartilha semelhanças com a memória sob interferência, sendo que esses trabalhos geralmente relatam a ocorrência de uma IR (NETTO; DIAS; IZQUIERDO, 1985; PERNA et al., 2015; POLACK; JOZEFOWIEZ; MILLER, 2017). Os estudos que observam a ocorrência de IP são ainda mais raros (CROSSLEY et al., 2019; ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011) e não encontramos na literatura casos que utilizam traços de memória diferentes e observam a IP ocorrendo, como no presente trabalho.

Um resultado semelhante ao que observamos em relação a IP é apresentado no trabalho de Crossley e colaboradores (2019). Eles submeteram caracóis da espécie *Lymnaea stagnalis* ao aprendizado de dois condicionamento apetitivos espaçados entre si por intervalos de 1 ou 2h, a memória era testada 24h depois. Quando o intervalo entre os dois aprendizados era de 1h eles observaram uma IP, entretanto quando o intervalo era de 2h, não havia mais o efeito de IP, mas sim uma IR. Por outro lado, quando a memória interferente era um condicionamento aversivo, eles não observaram IP, apenas a IR na janela de tempo de 2h. Eles explicaram esses achados sugerindo que o efeito da IP só ocorria entre memórias apetitivas porque elas usavam o mesmo circuito, diferente do condicionamento aversivo, que usaria um circuito distinto. Posteriormente, eles demonstraram, por meio de registro eletrofisiológico de células gigantes cerebrais, que os paradigmas apetitivos causavam a mesma mudança celular, enquanto o treino aversivo não afetava as propriedades desse neurônio, favorecendo a hipótese de que essas memórias são codificadas por circuitos diferentes. Novamente, embora esse trabalho também visualize uma IP, as demais observações são difíceis de serem comparadas com os nossos achados.

Outro resultado semelhante ao nosso foi exposto por Engelmann, Hädicke e Noack (2011). Dez minutos antes das sessões de treino e teste eles transferiram os camundongos para uma nova caixa e observaram uma interferência desse estímulo na memória social de longo prazo. Entretanto, o trabalho deles difere do nosso

porque utiliza a tarefa de discriminação social<sup>1</sup> para avaliar a memória social, além disso, eles realizam a exposição à caixa nova antes do treino e do teste, o que deixa margem para dúvida se o estímulo interferente está tendo ação sobre a sessão de treino ou a de teste. Ademais, em outro trabalho, Engelmann (2009) mostrou resultados de que a IP na memória social também ocorria quando um juvenil novo era exposto para exploração pelo animal experimental 5min., 3h ou 6h antes do treino para o juvenil que foi utilizado como estímulo social da tarefa. A IP não ocorria quando era feita 9h, 12h, 15h, 18h ou 22h antes do treino. Entretanto, esse estudo também detectou IR quando um novo juvenil diferente do utilizado no treino era exposto 5 min., 3h, 6h, 9h, 12h, ou 15h depois do treino. Ademais, eles utilizaram o paradigma da discriminação social, que difere do nosso.

Com um modelo de interferência na memória finalmente definido, nós tentamos finalmente manipular a neurogênese para investigarmos o possível envolvimento dos neurônios novos com a interferência na memória. Para isso, nós administramos o antagonista glutamatérgico, a memantina, com o fim de aumentar a neurogênese. A droga foi administrada uma semana antes dos experimentos comportamentais, visto que nós detectamos efeitos promnésicos em nosso laboratório utilizando essa faixa de tempo (dados não publicados). A concentração do fármaco também foi escolhida com base em trabalhos publicados (AKERS et al., 2014; ISHIKAWA et al., 2014, 2016; MAEKAWA et al., 2009) e em experimentos prévios do nosso laboratório (JAIMES et al., submetido) que evidenciaram o aumento da neurogênese.

Surpreendentemente, nós não fomos capazes de detectar um aumento da neurogênese nessa janela de tempo (8 dias após a administração), como evidenciado pela marcação de DCX no GD dos hipocampus dorsal e ventral. Apesar de haverem evidências de que a memantina aumenta a neurogênese (AKERS et al., 2014; ISHIKAWA et al., 2014, 2016; MAEKAWA et al., 2009; JAIMES et al., submetido), os trabalhos que relataram os efeitos dessa droga em janelas de tempo

---

<sup>1</sup> A discriminação social é um paradigma para a avaliação da memória social. Durante o treino o animal experimental entra em contato pela primeira vez com um estímulo social. No teste, o indivíduo é confrontado com o mesmo estímulo social do treino (familiar) e um novo. Com base na neofilia, se o animal experimental possui a memória, espera-se que ele explore significativamente mais o novo estímulo social (ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011; ENGELMANN; WOTJAK; LANDGRAF, 1995).

curtas ( $\leq 7$  dias) avaliaram somente o número de células marcadas com BrdU<sup>2</sup> e a migração de neurônios novos (ISHIKAWA et al., 2014; MAEKAWA et al., 2009; NAMBA et al., 2009, 2011).

Namba e colaboradores (2009) demonstraram um aumento de células BrdU+ 4 dias após a administração de memantina na dose de 50 mg/kg. Em outro trabalho, Namba e colaboradores (2011) mostraram uma alteração na migração de células marcadas para DCX 2 dias após a administração da memantina nas doses de 50 e 30 mg/kg, mas não na de 10 mg/kg. Já Ishikawa e colaboradores (2014), reportaram um aumento de células BrdU+ 7 dias depois da administração de memantina 50 mg/kg. Ademais, em concordância com esses achados, Maekawa e colaboradores (2009) mostraram um aumento das células marcadas com BrdU 1 dia e 7 dias depois da injeção de memantina na dose de 50 mg/kg em concordância com as evidências anteriores, entretanto, eles só avaliaram a neurogênese (através da marcação BrdU/NeuN) e a encontraram aumentada 28 dias após a administração da droga. Em conjunto, essas evidências nos mostram que a memantina é sim capaz de alterar a proliferação celular no GD em uma janela de tempo curta ( $\leq 7$  dias), entretanto, não existem relatos da detecção ou não de um aumento na neurogênese nesse período. Consequentemente, nós suspeitamos que no nosso desenho experimental, o tempo aguardado entre a administração da droga e a avaliação comportamental e quantificação dos neurônios novos foi insuficiente para permitir a visualização do efeito neurogênico da memantina. Ademais, a quantificação da proliferação celular se faz necessária futuramente em nosso trabalho para que mostremos que apenas o surgimento de novas células não é um mecanismo suficiente para impedir a interferência entre duas memórias dependentes do hipocampo.

Simultaneamente, nós não detectamos uma prevenção da IP nesse experimento, de modo que especulamos que esse resultado pode ter ocorrido pela falha em aumentar a neurogênese. Por outro lado, nós identificamos uma variação comportamental nos animais administrados com a memantina, esses apresentaram uma redução do tempo de exploração do estímulo social durante o TR RS. Em vista

---

<sup>2</sup> O 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) é um análogo de timidina que é incorporado ao DNA das células em divisão durante a fase S da mitose e é utilizado como um marcador exógeno de proliferação celular.

disso, nós avaliamos a atividade locomotora desses animais afim de assegurar que tal impacto comportamental não estava sendo causado por um possível prejuízo na função motora desencadeado pela substância administrada. Como esperado, nós não encontramos alterações na locomoção e atividade exploratória desses animais.

Em concordância com esses achados, Ishikawa e colaboradores (2014) mostraram que animais treinados na tarefa de reconhecimento social por 1,5 min. não possuem a memória social de longo prazo, entretanto, quando recebem memantina na dose de 50 mg/kg 3 semanas antes do treino, a duração da sessão de 1,5 min. é suficiente para a formação de uma memória social de longo prazo. Esses achados em conjunto com os nossos resultados sugerem que a memantina possui um efeito sobre a exploração social e nos faz levantar a hipótese de que essa droga possui um efeito de diminuir o tempo necessário para a aquisição da memória, facilitando de algum modo esse processo.

Por fim, nós administramos a memantina 24h depois do treino da memória social, com o propósito de testar se algum efeito promnésico relacionado a evocação poderia ocorrer. Desse modo, a memória foi testada 7 dias depois do treino, afim de mantermos a mesma janela de tempo de amadurecimento dos neurônios novos sob efeito da droga. Todavia, os animais não tiveram uma recuperação da memória. Isso vai de acordo com nossa hipótese anterior de que o efeito promnésico que nós esperávamos se daria durante a aquisição dessas memórias e não na fase da evocação. Não obstante, ainda é válido o argumento de que a ausência desse efeito pode se dar pelo mesmo motivo explicitado anteriormente, ou seja, que o tempo aguardado não foi suficiente para o aumento da neurogênese e portanto para uma consequência promnésica. Entretanto, esse resultado concorda com a literatura que mostra que o aumento da neurogênese após o aprendizado não favorece a persistência da memória, mas sim seu esquecimento (AKERS et al., 2014; EPP et al., 2016; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; ISHIKAWA et al., 2016)

É importante ressaltar que os mecanismos pelos quais a memantina é capaz de aumentar a neurogênese ainda são desconhecidos. Nós acreditamos que é difícil conectar qualquer possível efeito da memantina observado uma semana ou mais tempo depois da sua administração com a sua ação aguda sobre os receptores

glutamatérgicos NMDA. Dessa forma, comumente atribuímos nossas observações a efeitos de longo-prazo dessa droga, como o aumento neurogênese.

Com base nos dados expostos, nós propomos futuramente tentar aumentar a neurogênese com a utilização da memantina novamente, entretanto, aguardando uma janela de tempo maior (17 dias), na qual já visualizamos o aumento da neurogênese anteriormente (JAIMES et al., submetido). Dessa forma, esperamos observar um efeito promnésico capaz de permitir a aquisição de ambos os traços de memória, minimizando a interferência entre eles.

## **7. CONCLUSÃO**

A partir dos achados expostos, concluímos que o aprendizado de uma memória hipocampo-dependente é capaz de interferir na aquisição de outra memória que tem esse substrato neural em comum, sugerindo uma interação entre o processamento dessas memórias. Nossos resultados também contribuem para a afirmação de que diferentes linhagens de camundongos possuem susceptibilidades distintas quanto a interferência na memória. Além disso, nós mostramos pela primeira vez que não é possível detectar um aumento da neurogênese pela memantina oito dias após a sua administração. Finalmente, futuros experimentos ainda são necessários para esclarecermos a questão de se o aumento da neurogênese é capaz de proteger o traço de memória da interferência observada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 180–187, 2001.
- AGUILAR-ARREDONDO, A.; ZEPEDA, A. Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 6, p. 1–19, 2018.
- AIMONE, J. B.; DENG, W.; GAGE, F. H. Perspective : Point / Counterpoint Resolving New Memories : A Critical Look at the Dentate Gyrus , Adult Neurogenesis , and Pattern Separation. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 589–596, 2011.
- AKERS, K. G. et al. Hippocampal Neurogenesis Regulates Forgetting During Adulthood and Infancy. **Science**, v. 344, n. 598, 2014.
- ALAM, S. et al. Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 9, p. 1823–1829, 2017.
- ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. Social isolation impairs the persistence of social recognition memory by disturbing the glutamatergic tonus and the olfactory bulb-dorsal hippocampus coupling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- ALTMAN, J. Autoradiographic Regenerative Cells Study Proliferation with Tritiated of Degenerative of Neuroglia Thymidine. **Experimental Neurology**, v. 318, n. 4, p. 302–318, 1962a.
- ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, v. 135, n. 3509, p. 1127–1128, 1962b.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 124, n. 3, p. 319–335, jun. 1965.
- ALVES, M. V. C.; BUENO, O. F. A. Interferência retroativa: o esquecimento como uma interrupção na consolidação da memória. **Temas em Psicologia**, v. 25, n. 3, p. 1043–1054, 2017.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 571–591, 1989.

AMARAL, David; LAVENEX, Pierre. Hippocampal Neuroanatomy. *In*: ANDERSEN, Per; MORRIS, Richard; AMARAL, David; BLISS, Tim; O'KEEFE, John. **The Hippocampus Book**. Oxford University Press, 2007. p. 37-110.

ANACKER, C.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 335–346, 4 jun. 2017.

ANDERSON, M. C. **Rethinking interference theory: Executive control and the mechanisms of forgetting**. [s.l: s.n.]. v. 49

ANDERSON, M. C.; NEELY, J. H. Interference and Inhibition in Memory Retrieval. **Memory**, p. 237–313, 1996.

ARAKAWA, H. et al. Scent marking behavior as an odorant communication in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 7, p. 1236–1248, 2008.

BARNEA, A.; PRAVOSUDOV, V. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 884–907, set. 2011.

BECKER, S. A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. **Hippocampus**, v. 15, n. 6, p. 722–738, 2005.

BECKER, S. Neurogenesis and pattern separation: time for a divorce. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 8, n. 3, p. 1–15, 2017.

BIALA, M. A. G. The novel object recognition memory : neurobiology , test procedure , and its modifications. p. 93–110, 2012.

BINDER, S.; DERE, E.; ZLOMUZICA, A. A critical appraisal of the what-where-when episodic-like memory test in rodents: Achievements, caveats and future directions. **Progress in Neurobiology**, v. 130, p. 71–85, jul. 2015.

BIRD, C. M. The role of the hippocampus in recognition memory. **Cortex**, v. 93, n. 0,

p. 155–165, 2017.

BLISS, T. V. P.; GARDNER- MEDWIN, A. R. Long- lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, n. 2, p. 357–374, 1973.

BOLDRINI, M. et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 4, p. 589- 599.e5, 2018.

BOLZ, L.; HEIGELE, S.; BISCHOFBERGER, J. Running Improves Pattern Separation during Novel Object Recognition. **Brain Plasticity**, v. 1, n. 1, p. 129–141, 2016.

BROOKS, S. P. et al. Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: Cognitive tests. **Genes, Brain and Behavior**, v. 4, n. 5, p. 307–317, 2005.

BROWN, J. P. et al. Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 1, p. 1–10, 2003.

BUCKNER, Randy L. Memory systems: An incentive, not an endpoint. *In*: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. **Science of Memory: Concepts**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 359-366.

CAMATS PERNA, J.; ENGELMANN, M. Recognizing Others: Rodent's Social Memories. *In*: [s.l: s.n.]. p. 25–45.

CAN, A. et al. The tail suspension test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, p. 3–7, 2011.

CARUANA, D. A.; ALEXANDER, G. M.; DUDEK, S. M. New insights into the regulation of synaptic plasticity from an unexpected place: Hippocampal area CA2. **Learning & Memory**, v. 19, n. 9, p. 391–400, 2012.

CHENG, D. et al. Long-term cannabidiol treatment prevents the development of social recognition memory deficits in alzheimer's disease transgenic mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 42, n. 4, p. 1383–1396, 2014.

CLARK, R. E. Current Topics Regarding the Function of the Medial Temporal Lobe

Memory System. In: **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**. [s.l.: s.n.]. p. 13–42.

CLARKE, J. R. et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2652–2657, 2010.

COHEN, S. J.; MUNCHOW, A. H.; RIOS, L. M. Report The Rodent Hippocampus Is Essential for Nonspatial Object Memory. p. 1–6, 2013.

COHEN, S. J.; STACKMAN, R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 105–117, 2015.

CROSSLEY, M. et al. Proactive and retroactive interference with associative memory consolidation in the snail *Lymnaea* is time and circuit dependent. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2019.

D'ISA, R.; BRAMBILLA, R.; FASANO, S. Behavioral Methods for the Study of the Ras–ERK Pathway in Memory Formation and Consolidation: Passive Avoidance and Novel Object Recognition Tests. In: [s.l.: s.n.]. v. 1120p. 131–156.

DARBY, K. P. et al. Cognitive flexibility and memory in pigeons, human children, and adults. **Cognition**, v. 177, n. 1, p. 30–40, ago. 2018.

DAVIS, R. L.; ZHONG, Y. *The Biology of Forgetting—A Perspective*. 2017.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 339–50, maio 2010.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 5, p. 673–704, 2007.

DERE, Ekrem, ZLOMUZICA, Armin; HUSTON, Joseph P.; SILVA, Maria A. De Souza. Animal episodic memory. In: DERE, Ekrem; EASTON, Alexander; NADEL, Lynn; HUSTON, Joseph P. **Handbook of Episodic Memory**. Elsevier Science, 2008. p. 155-184.

DREW, L. J.; FUSI, S.; HEN, R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 20, n. 12, p. 710–29, dez. 2013.

DUDAI, Y. **Why Learning and Memory Should be Redefined (Or, An Agenda for Focused Reductionism) Concepts in Neuroscience**, 1992. Disponível em: <isi:A1992JN77800004>

DUDAI, Y. **Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond**. Oxford: [s.n.].

DUDAI, Y. THE NEUROBIOLOGY OF CONSOLIDATIONS, OR, HOW STABLE IS THE ENGRAM? **Annu. Rev. Psychol**, v. 55, p. 51–86, 2004.

DUDAI, Y.; KARNI, A.; BORN, J. Perspective The Consolidation and Transformation of Memory. **NEURON**, v. 88, n. 1, p. 20–32, 2015.

DUDAI, Yadin; ROEDIGER III, Henry L.; TULVING, Endel. Memory Concepts. *In*: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. **Science of Memory: Concepts**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 1-9.

DUDAI, Yadin. Memory: It's all about representations. *In*: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. **Science of Memory: Concepts**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 13-16.

ENDRESS, A. D.; SIDDIQUE, A. The cost of proactive interference is constant across presentation conditions. **Acta Psychologica**, v. 170, p. 186–194, 2016.

ENGELMANN, M. Competition between two memory traces for long-term recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2009.

ENGELMANN, M.; HÄDICKE, J.; NOACK, J. Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1152–1162, 2011.

ENGELMANN, M.; WOTJAK, C. T.; LANDGRAF, R. Social discrimination procedure: An alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. **Physiology and Behavior**, 1995.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of

memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, nov. 1988.

ENNOS, Roland. *Statistical and Data Handling Skills in Biology*. Pearson Education Limited 2012.

EPP, J. R. et al. Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference. **Nature Communications**, v. 7, p. 5–12, 2016.

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **NATURE MEDICINE**, v. 4, n. 11, 1998.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, jan. 2010.

FERBINTEANU, J. Memory systems 2018 – Towards a new paradigm. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 157, n. 1, p. 61–78, jan. 2019.

FERGUSON, J. N.; YOUNG, L. J.; INSEL, T. R. The neuroendocrine basis of social recognition. **Front Neuroendocrinol**, v. 23, n. 2, p. 200–224, 2002.

FERNANDEZ, S. M. et al. Estradiol-Induced Enhancement of Object Memory Consolidation Involves Hippocampal Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Membrane-Bound Estrogen Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 35, p. 8660–8667, 27 ago. 2008.

FRANÇA, T. F. A. et al. Hippocampal neurogenesis and pattern separation: A meta-analysis of behavioral data. **Hippocampus**, v. 27, n. 9, p. 937–950, set. 2017.

FRANKLAND, P. W.; KÖHLER, S.; JOSSELYN, S. A. Hippocampal neurogenesis and forgetting. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 9, p. 497–503, set. 2013.

GARTHE, A.; BEHR, J.; KEMPERMANN, G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 2009.

GLICKMAN, S. E. Perseverative neural processes and consolidation of the memory trace. **Psychological Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 218–233, 1961.

GONÇALVES, J. T.; SCHAFER, S. T.; GAGE, F. H. **Adult Neurogenesis in the**

## **Hippocampus: From Stem Cells to Behavior**Cell, 2016.

GRESACK, J. E.; FRICK, K. M. Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 1, p. 112–119, 2006.

GUARNIERI, L. O. et al. Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. **Translational Psychiatry 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

GUISE, K. G.; SHAPIRO, M. L. Medial Prefrontal Cortex Reduces Memory Interference by Modifying Hippocampal Encoding. **Neuron**, v. 94, n. 1, p. 183–192.e8, abr. 2017.

GUSMÃO, I. D. et al. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 440–446, 2012.

HERSZAGE, J.; CENSOR, N. Modulation of Learning and Memory: A Shared Framework for Interference and Generalization. **Neuroscience**, v. 392, n. August, p. 270–280, 2018.

HIRAOKA, K. et al. Pattern of c-Fos expression induced by tail suspension test in the mouse brain. **Heliyon**, v. 3, n. 6, p. e00316, 2017.

HITTI, F. L.; SIEGELBAUM, S. A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. v. 508, n. 7494, p. 88–92, 2014.

HU, T. et al. Quercetin protects against diabetic encephalopathy via SIRT1 / NLRP3 pathway in db / db mice. n. January, p. 1–11, 2020.

HVOSLEF-EIDE, M.; OOMEN, C. A. Adult neurogenesis and pattern separation in rodents: A critical evaluation of data, tasks and interpretation. **Frontiers in Biology**, v. 11, n. 3, p. 168–181, 2016.

INSEL, T. R.; FERNALD, R. D. HOW THE BRAIN PROCESSES SOCIAL INFORMATION: Searching for the Social Brain. **Annual Review of Neuroscience**, 2004.

ISHIKAWA, R. et al. Time-dependent enhancement of hippocampus-dependent memory after treatment with memantine: Implications for enhanced hippocampal adult neurogenesis. **Hippocampus**, v. 24, n. 7, p. 784–793, 2014.

ISHIKAWA, R. et al. Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval. **eLife**, v. 5, n. September, p. 1–17, 2016.

IZQUIERDO, I. et al. Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in the hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 3323–3328, set. 1999.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2ª Edição ed. [s.l.] Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I. **The art of forgetting**. [s.l.: s.n.].

JACOBS, H. I. L. et al. Consolidation in older adults depends upon competition between resting-state networks. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, n. JAN, p. 1–16, 2015.

JESSBERGER, S. et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. **Learning and Memory**, v. 16, n. 2, p. 147–154, 2009.

JOHNSON, J. W.; KOTERMANSKI, S. E. Mechanism of action of memantine. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 1 SPEC. ISS., p. 61–67, 2006.

JOHNSTON, S. T. et al. Paradox of pattern separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing memory resolution and robustness. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 129, n. November, p. 60–68, 2016.

KAVALIERS, M.; CHOLERIS, E. Social Cognition and the Neurobiology of Rodent Mate Choice. **Integrative and Comparative Biology**, v. 57, n. 4, p. 846–856, 1 out. 2017.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 1997.

KIM, J. W. et al. Comparison of Adult Hippocampal Neurogenesis and Susceptibility to Treadmill Exercise in Nine Mouse Strains. **Neural Plasticity**, v. 2017, 2017.

KLAPPENBACH, M.; NALLY, A.; LOCATELLI, F. F. Parallel memory traces are built after an experience containing aversive and appetitive components in the crab *Neohelice*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 23, p. E4666–E4675, 2017.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Current Biology**, v. 25, n. 23, p. R1116–R1121, 2015.

KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Long-Term Memory Underlying Hippocampus-Dependent Social Recognition in Mice. v. 1063, p. 47–56, 2000.

KUHL, B. A. et al. Resistance to forgetting associated with hippocampus-mediated reactivation during new learning. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 501–506, 2010.

LÜSCHER DIAS, T. et al. c-Fos expression predicts long-term social memory retrieval in mice. **Behavioural Brain Research**, 2016.

LECHNER, H. A.; SQUIRE, L. R.; BYRNE, J. H. 100 Years of Consolidation—Remembering Müller and Pilzecker. **Neurobiology of Learning and Memory**, p. 77–87, 1999.

LEMAIRE, M. Social Recognition Task in the Rat. **Current Protocols in Pharmacology**, p. 1–11, 2004.

LEUNG, C. et al. Activation of Entorhinal Cortical Projections to the Dentate Gyrus Underlies Social Memory Retrieval Article Activation of Entorhinal Cortical Projections to the Dentate Gyrus Underlies Social Memory Retrieval. **CellReports**, v. 23, n. 8, p. 2379–2391, 2018.

LEUTGEB, J. K. et al. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. **Science**, v. 315, n. 5814, p. 961–966, 2007.

LI, Y. et al. Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice. **Cell**, v. 171, n. 5, p. 1176–1190.e17, 2017.

LUCASSEN, P. J. et al. Limits to human neurogenesis—really? **Molecular Psychiatry**, p. 1–3, 2019.

MAEKAWA, M. et al. NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus. **Neuroscience Research**, v. 63, n. 4, p. 259–266, 2009.

MARTIN, C.; BESHEL, J.; KAY, L. M. An Olfacto-Hippocampal Network Is Dynamically Involved in Odor-Discrimination Learning. **Journal of Neurophysiology**, v. 98, n. 4, p. 2196–2205, 2007.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, n. 3742, p. 1351–1358, 1966.

MCLEAN, F. H. et al. Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

MEIRA, T. et al. A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. **Nature Communications**, n. 2018, p. 1–14, 2018.

MELANI, R. et al. Enriched environment effects on remote object recognition memory. **Neuroscience**, v. 352, n. April, p. 296–305, 2017.

MILLER, S. M.; SAHAY, A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 1565–1575, 2019.

MILNER, B. Visually-guided maze learning in man: Effects of bilateral hippocampal, bilateral frontal, and unilateral cerebral lesions. **Neuropsychologia**, v. 3, n. 4, p. 317–338, 1965.

MILNER, B.; CORKIN, S.; TEUBER, H. L. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of H.M. **Neuropsychologia**, v. 6, n. 3, p. 215–234, 1968.

MONTEIRO, B. M. M. et al. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. **Hippocampus**, v. 24, n. 2, p. 239–248, 2014.

MOSCOVITCH, Morris. Memory: Why the engram is elusive. *In: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. **Science of Memory: Concepts**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 17-21.*

MORRIS, R. G. M. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: The role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 11, p. 2829–2846, 2006.

MORRIS, Richard G.M. Memory: Distinctions and dilemmas. *In: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. **Science of Memory: Concepts**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 29-34.*

MOSER, M. B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 8, n. 6, p. 608–619, 1998.

MÜLLER, G. E.; PILZECKER, A. Experimentelle Beiträge zur Lehre von Gedächtnis. **Z. Psychol. Ergänzungsband**, p. 1-300

MUMTAZ, F. et al. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. May, p. 1205–1222, 2018.

NAMBA, T. et al. The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in adult hippocampus. **Glia**, v. 57, n. 10, p. 1082–1090, 2009.

NAMBA, T. et al. NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 1, p. 34–44, 2011.

NETTO, C. A.; DIAS, R. D.; IZQUIERDO, I. Interaction between consecutive learnings: inhibitory avoidance and habituation. **Behavioral and Neural Biology**, v. 44, n. 3, p. 515–520, 1985.

NGUYEN, P. V. et al. Strain-dependent differences in LTP and hippocampus-dependent memory in inbred mice. **Learning and Memory**, v. 7, n. 3, p. 170–179, 2000.

NIIBORI, Y. et al. Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of

similar contexts in hippocampal CA3 region. **Nature Communications**, v. 3, 2012.

NORMAN, K. A.; O'REILLY, R. C. Modeling hippocampal and neocortical contributions to recognition memory: A complementary-learning-systems approach. **Psychological Review**, v. 110, n. 4, p. 611–646, 2003.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, v. 34, n. 1, p. 171–175, nov. 1971.

OKUYAMA, T. et al. Ventral CA1 neurons store social memory. **Science**, v. 353, n. 6307, p. 1536–1541, 2016.

OKUYAMA, T. Social memory engram in the hippocampus. **Neurosci. Res. Neuroscience Research**, v. xxx, 2017.

OPITZ, B. Memory function and the hippocampus. **The Hippocampus in Clinical Neuroscience**, v. 34, p. 51–59, 2014.

PARMIGIANI, S. et al. Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 957–970, 1999.

PAROLISI, R.; COZZI, B.; BONFANTI, L. Humans and dolphins: Decline and fall of adult neurogenesis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. JUL, p. 1–8, 2018.

PENA, R. R. et al. Anisomycin administered in the olfactory bulb and dorsal hippocampus impaired social recognition memory consolidation in different time-points. **Brain Research Bulletin**, v. 109, p. 151–157, 2014.

PEREIRA-CAIXETA, A. R. et al. Neurogenesis Inhibition Prevents Enriched Environment to Prolong and Strengthen Social Recognition Memory, But Not to Increase BDNF Expression. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 3309–3316, 10 jul. 2017.

PEREIRA-CAIXETA, A. R. et al. Inhibiting constitutive neurogenesis compromises long-term social recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2018.

PEREIRA, L. M. et al. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor  $\alpha$ . **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 1–9, 2014.

PERNA, J. C. et al. Timing of presentation and nature of stimuli determine retroactive interference with social recognition memory in mice. **Physiology and Behavior**, v. 143, p. 10–14, 2015.

PLÜMPE, T. et al. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. **BMC neuroscience**, v. 7, p. 77, 2006.

PODDAR, I. et al. Chronic oral treatment with risperidone impairs recognition memory and alters brain-derived neurotrophic factor and related signaling molecules in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 189, n. January, p. 172853, 2020.

POLACK, C. W.; JOZEFOWIEZ, J.; MILLER, R. R. Stepping back from 'persistence and relapse' to see the forest: Associative interference. **Behavioural Processes**, v. 141, n. 1, p. 128–136, ago. 2017.

POLDRACK, R. A.; PACKARD, M. G. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. **Neuropsychologia**, v. 41, n. 3, p. 245–251, jan. 2003.

POULTER, M. O. et al. Plasticity of the GABAA receptor subunit cassette in response to stressors in reactive versus resilient mice. **Neuroscience**, v. 165, n. 4, p. 1039–1051, 2010.

RAO, M. S.; SHETTY, A. K. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 234–246, 2004.

RICHTER, K.; WOLF, G.; ENGELMANN, M. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. **Learning and Memory**, v. 12, n. 4, p. 407–413, 2005.

RIEDEL, W. J.; BLOKLAND, A. Declarative Memory. **Handbook of Experimental**

**Pharmacology**, v. 228, p. 215–236, 2015.

ROBERTS, William A. The current status of cognitive time travel research in animals. *In*: DERE, Ekrem; EASTON, Alexander; NADEL, Lynn; HUSTON, Joseph P. **Handbook of Episodic Memory**. Elsevier Science, 2008. p. 135-153.

ROBERTSON, E. M. New Insights in Human Memory Interference and Consolidation. **Current Biology**, v. 22, n. 2, p. R66–R71, jan. 2012.

ROLLS, Edmund T. Memory systems: Multiple systems in the brain and their interactions. *In*: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. **Science of Memory: Concepts**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 345-352.

ROY, D. S. et al. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 508–512, 2016.

SAHAY, A. et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 466–470, 2011.

SAVIGNAC, H. M.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Resistance to early-life stress in mice: Effects of genetic background and stress duration. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, n. APRIL, p. 1–12, 2011.

SCHACTER, D. L.; TULVING, E. **Memory Systems**. [s.l.] MIT Press, 1994.

SCHACTER, Daniel L.; WAGNER, Anthony D. Aprendizado e memória. *In*: KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H.; JESSELL, Thomas M.; SIEGELBAUM, Steven A.; HUDSPETH, A.J.. **Princípios de Neurociências**. Artmed, 2014. p. 1256-1272.

SCHACTER, Daniel L. Memory: Delineating the core. *In*: ROEDIGER III, Henry L.; DUDAI, Yadin; FITZPATRICK, Susan M. **Science of Memory: Concepts**. New York: Oxford University Press, 2007. p. 23-27.

SCHIMANSKI, L. A.; NGUYEN, P. V. Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: A focus on inbred mouse strains. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 5, p. 463–483, 2004.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.

**Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jul. 2012.

SCHINDELIN, J. et al. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 7–8, p. 518–529, 2015.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11–21, 1957.

SEMON, R. **The mneme**. [s.l.] London: Allen & Unwin, 1921.

SOKOLOWSKI, M. B. et al. Social interactions in “simple” model systems. **Neuron**, v. 65, n. 6, p. 780–94, 25 mar. 2010.

SORRELLS, S. F. et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. **Nature**, v. 555, n. 7696, p. 377–381, 7 mar. 2018.

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

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T.; CLARK, R. E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. v. 8, n. 11, p. 872–883, 2008.

STACKMAN, R. W. et al. Temporary inactivation reveals that the CA1 region of the mouse dorsal hippocampus plays an equivalent role in the retrieval of long-term object memory and spatial memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 133, p. 118–128, set. 2016.

STANOJLOVIC, M. et al. Early Sociability and Social Memory Impairment in the A53T Mouse Model of Parkinson’s Disease Are Ameliorated by Chemogenetic Modulation of Orexin Neuron Activity. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 12, p. 8435–8450, 2019.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

STRANGE, B. A. et al. **Functional organization of the hippocampal longitudinal axis** *Nature Reviews Neuroscience*, 2014.

TANIMIZU, T. et al. Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 15, p. 4103–4116, 2017.

TANIMIZU, T.; KONO, K.; KIDA, S. Brain networks activated to form object recognition memory. *Brain Research Bulletin*, v. 141, n. May 2017, p. 27–34, 2018.

TAUPIN, P. Adult neurogenesis in mammals. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, v. 8, n. 4, p. 345–351, 2006.

THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 96, n. 6, p. 1000–1006, 1982.

TULVING, E. **Elements of episodic memory**. [s.l: s.n.].

TULVING, E. Episodic memory and auto-noesis: Uniquely human? In H. S. Terrace, & J. Metcalfe (Eds.), *The Missing Link in Cognition* (pp. 4-56). New York, NY: Oxford University Press. *Cognition*, p. 4–56, 2005.

TUNCDEMIR, S. N.; LACEFIELD, C. O.; HEN, R. Contributions of adult neurogenesis to dentate gyrus network activity and computations. *Behavioural Brain Research*, v. 374, n. July, 2019.

VAN DER KOOIJ, M. A.; SANDI, C. Social memories in rodents: Methods, mechanisms and modulation by stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 36, n. 7, p. 1763–1772, 2012.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; AND GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, v. 2 (3), p. 266–270, 1999.

WANG, L. et al. Enriched Physical Environment Attenuates Spatial and Social Memory Impairments of Aged Socially Isolated Mice. v. 21, p. 1114–1127, 2018.

WANISCH, K.; WOTJAK, C. T.; ENGELMANN, M. Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behavioural Brain Research*, 2008.

- WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 131–139, 2015.
- WEISZ, V. I.; ARGIBAY, P. F. Neurogenesis interferes with the retrieval of remote memories: Forgetting in neurocomputational terms. **Cognition**, v. 125, n. 1, p. 13–25, 2012.
- WINOCUR, G. et al. Adult hippocampal neurogenesis and memory interference. **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 2, p. 464–469, 2012.
- WIXTED, J. T. The Psychology and Neuroscience of Forgetting. **Annual Review of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 235–269, 2004.
- YAU, S. Y.; LI, A.; SO, K. F. Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. **Neural Plasticity**, v. 2015, 2015.
- ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645–660, 2008.
- ZIEGLER, A. N.; LEVISON, S. W.; WOOD, T. L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 3, p. 161–170, 2015.

## ANEXO – Aprovação pelo CEUA-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 319/2018

**Título do projeto:** O papel da neurogênese na consolidação da memória social

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Grace Schenatto Pereira

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Fisiologia e Biofísica

**Situação atual:** Decisão Final - Aprovado

Aprovado com recomendação na reunião do dia 29/10/2018. Validade: 29/10/2018 à 28/10/2023 Recomendação: O biotério de acomodação e experimentação (Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica) não está credenciado no sistema CIUCA.

Belo Horizonte, 29/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)