

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
MESTRADO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**KARINE RAMIRES LIMA**

**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA  
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDA POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS  
COMPORTAMENTAIS**

**Uruguaiana, RS  
2021**

**KARINE RAMIRES LIMA**

**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA  
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDA POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS  
COMPORTAMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Pâmela Billig Mello-Carpes

Coorientadora: Profa. Dra. Liane da Silva de Vargas

**Uruguaiiana, RS  
2021**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

L732m Lima, Karine Ramires

Mecanismos dopaminérgicos envolvidos na modulação da  
persistência da memória induzida por diferentes estratégias  
comportamentais / Karine Ramires Lima.

104 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2021.

"Orientação: Pâmela Billig Mello-Carpes".

1. Novidade. 2. Exercício físico agudo. 3. Receptores  
D1/D5. 4. Hipocampo. I. Título.

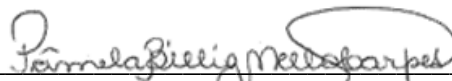
**KARINE RAMIRES LIMA**

**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA MODULAÇÃO DA  
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA INDUZIDA POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS  
COMPORTAMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

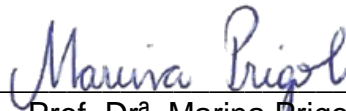
Dissertação de mestrado defendida e aprovada em: 18 de Fevereiro de 2021.

Banca examinadora:



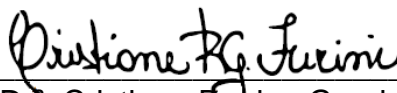
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pâmela Billig Mello-Carpes  
Orientadora  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Marina Prigol  
UNIPAMPA



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Regina Guerino Furini  
PUCRS

Dedico este trabalho aos meus pais (Orpiana e Luiz), por acreditarem nos meus sonhos e me auxiliarem, a cada dia, para que eu possa realizá-los.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** por sempre me mostrar os melhores caminhos a seguir, e por me dar forças para continuar em busca da realização dos meus sonhos. Sou grata por ser tão feliz e realizada ao longo desta caminhada.

À minha **família** por todo o amor, suporte e compreensão. Aos meus pais, **Orpiana** e **Luiz**, que nunca mediram esforços pela minha felicidade e que sempre caminharam ao meu lado ao longo de minha trajetória acadêmica; aos meus filhos de quatro patas, **Heros** (em memória), **Fred** e **Sofia**, que alegam os meus dias; à minha irmã, **Pâmela**, que torce pelas minhas conquistas e está sempre presente, apesar dos quilômetros de distância que nos separam; ao meu sobrinho, **Arthur**, que veio para me mostrar o amor mais puro que já pude sentir; e, em especial, à minha avó, **Maria**, que acompanhou o início da minha trajetória acadêmica e que sempre me apoiou no meu gosto pelos estudos, hoje, em um lugar melhor, sei que a cada nova conquista minha, ela ainda comemora.

Aos meus melhores amigos, **Tayana**, **Jean**, **Mariana** e **Mylena**, agradeço o apoio, a compreensão e a parceria que construímos ao longo desses tantos anos.

À minha orientadora, **Pâmela**, por ter acreditado no meu potencial e ter me proporcionado grandes aprendizados ao longo desses anos de orientação. Serei sempre grata por todos os ensinamentos e oportunidades. És uma inspiração, como pessoa e profissional, não tenho palavras para descrever a minha admiração!

À equipe do **Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis)**, a qual eu considero uma segunda família. Em especial, à minha coorientadora, **Liane**, que muito me ensinou ao longo da minha iniciação científica e, que hoje, também é uma inspiração como professora; e, à minha equipe de trabalho, **Ana**, **Steffanie**, **Shara** e **Náthaly**, que foram essenciais ao longo da execução dos experimentos.

À **Universidade Federal do Pampa**, por permitir que sonhos se tornem realidade.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**, pela oportunidade e pelo apoio da coordenação, professores e demais servidores.

À **CAPES** pela bolsa de estudos concedida.

**Meus sinceros agradecimentos.**

**“Persistir.**

Aos poucos, a vida vai se encaixando. Em cada passo, eu vou realizando o impossível. E eu acordo cada dia mais forte. Cada dia com mais coragem. Insistindo nos meus sonhos. É que dias prósperos não vêm por acaso. Tudo é esforço. A fé em Deus. A paciência. Eu desejo que a minha persistência me leve aos lugares mais incríveis do mundo”.

Edgard Abbehusen

## RESUMO

Algumas memórias duram horas ou dias enquanto outras podem durar meses ou anos. Sabendo disso, vários cientistas concentram-se em estudar os fatores que modulam e determinam a persistência das memórias. Sabe-se que a ativação de regiões do cérebro que estimulam a liberação de dopamina para o hipocampo são importantes e medeiam processos bioquímicos que culminam em um traço de memória mais fortalecido. Neste sentido, estratégias farmacológicas e não-farmacológicas que estimulam este sistema neurotransmissor são propostas na literatura. Duas estratégias comportamentais capazes de estimular a liberação de dopamina ao hipocampo e melhorar os processos cognitivos são: (1) a exposição à novidade e; (2) exercício físico agudo. Até então sabe-se que ambas estratégias atuam sob os receptores dopaminérgicos da família D1, que engloba os receptores D1 e D5. Entretanto, sabendo que estes receptores estão envolvidos em diferentes cascatas de sinalização, ainda não foi evidenciado o mecanismo dopaminérgico exato pelo qual cada uma das estratégias atua para melhorar a memória. Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento dos receptores dopaminérgicos D1 e D5 no efeito modulatório de diferentes estímulos (exposição à novidade e uma sessão de exercício físico) sobre a persistência da memória. Esta dissertação envolveu dois estudos principais que examinaram cada um destes estímulos individualmente. Todos os experimentos foram realizados utilizando animais de laboratório (ratos *Wistar* machos adultos) e tarefas de comportamento padronizadas para este modelo. A memória foi verificada pelo teste de reconhecimento de objetos, com avaliação da memória 24 horas, 7 e 14 dias após o aprendizado, sendo possível verificar sua consolidação e persistência ao longo dos dias. Nossos achados indicam que a exposição à um novo ambiente ou à uma sessão de exercício físico imediatamente após um aprendizado promove a persistência da memória por um mecanismo que depende da ativação dos receptores dopaminérgicos D1 do hipocampo. Nós demonstramos que a promoção da persistência da memória por ambos os estímulos estudados depende da ativação da via PKA, segundo mensageiro dos receptores D1, mas não de PKC, segundo mensageiro dos receptores D5.

Palavras-Chave: Novidade. Exercício Físico Agudo. Receptores D1/D5. Hipocampo.



## ABSTRACT

Some long-term memories last for hours or days while others can last for months or years. In view of this, scientists investigate strategies that modulate the memory persistence. The activation of brain regions that stimulate the dopamine release to hippocampus is important and mediate other biochemical processes that culminate in a stronger memory trace. In this sense, pharmacological and non-pharmacological strategies that stimulate this neurotransmitter system are proposed in the literature. Two behavioral strategies capable of stimulating the dopamine release to the hippocampus and improving cognitive processes are: (1) exposure to novelty; and, (2) acute physical exercise. Until this moment, it is known that both strategies act on the D1 family dopaminergic receptors, which include the D1 and D5 receptors. However, these receptors are involved in different signaling cascades, and the exact dopaminergic mechanism by which each strategy improves memory is not clear. Therefore, this study aimed to investigate the involvement of dopaminergic receptors D1 and D5 in the modulatory effect of different stimuli (exposure to novelty and one physical exercise session) on memory persistence. This work involved two main studies, each one designed to study one of these stimuli individually. All experiments were performed using laboratory animals (adult male *Wistar* rats) and behavior tasks standardized for this model. The memory was evaluated by the object recognition test, with memory evaluation on 24 hours, 7, and 14 days after learning, being possible to verify its consolidation and persistence over the days. Our findings indicate that exposure to a novel environment or one physical exercise session immediately after learning promotes memory persistence through a mechanism that depends on the activation of the hippocampal D1 dopamine receptors. More specifically, we demonstrated that memory persistence promoted by both studied stimuli depends on the activation of the PKA pathway, the second messenger of D1 receptors, but not PKC, the second messenger of D2 receptors.

Keywords: Novelty. Acute Physical Exercise. D1/D5 Receptors. Hippocampus.

## LISTA DE FIGURAS

### PARTE I

Fig. 1. Classificações da memória.....	19
Fig. 2. Protocolo da tarefa de reconhecimento de objetos. ....	22
Fig. 3. Processos envolvidos no estabelecimento da memória.....	23
Fig. 4. Localização do hipocampo.....	24
Fig. 5. Sequência de passos moleculares durante a consolidação da MLD. ....	26
Fig. 6. Cascata de sinalização desencadeada pela estimulação dos receptores dopaminérgicos D1 e D5.....	29
Fig. 7. Mecanismo molecular da hipótese STC.....	31

### PARTE II

#### MANUSCRITO CIENTÍFICO I

Fig. 1. Experimental design.....	44
Fig. 2. Effects of novelty exposure and pharmacological dopamine modulations in the CA1 region of the hippocampus on OR task. ....	49
Fig. 3. Effect of novelty exposure and pharmacological dopamine modulations in the CA1 region of the hippocampus on OR discrimination index. ....	51
Fig. 4. Effect of novelty exposure and pharmacological dopamine modulations in the CA1 region of the hippocampus on OR discrimination index along testing days.....	52

#### MANUSCRITO CIENTÍFICO II

Fig. 2. Effects of one single physical exercise session and hippocampal pharmacological modulations on recognition memory and the role of D1-family dopamine receptors.....	65
Fig. 3. Effects of one single physical exercise and hippocampal pharmacological modulations on the discrimination index in OR task and the role of D1-family dopamine receptors.....	67
Fig. 1. Experimental design.....	70

## LISTA DE TABELAS

### PARTE II

#### MANUSCRITO CIENTÍFICO I

Table 1. OR total exploration time, exploratory and locomotor activities and anxiety.....	53
---	----

#### MANUSCRITO CIENTÍFICO II

Table 1. None of the procedures performed in this study affected OR total exploration, exploratory and locomotor activities, and anxiety.....	72
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC – Adenilato ciclase

AMPA – Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês, *Adenosine triphosphate*)

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*)

BT – Marcação comportamental (do inglês, *Behavioral tagging*)

CA1 – *Cornu ammonis I*

CaMK – Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (do inglês *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*)

cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês, *Cyclic adenosine monophosphate*)

CE – Córtex entorrinal

CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais

CREB – Proteína de ligação responsiva ao AMPc (do inglês, *cAMP responsive-element binding protein*)

DAG – Diacilglicerol (do inglês, *Diacylglycerol*)

ERKs – Quinases reguladas por sinal extracelular (do inglês *extracellular signal-regulated kinases*)

GD – Giro denteado

LC – *Locus coeruleus*

LTP – Potenciação de longa duração (do inglês, *Long term potentiation*)

MCD/STM – Memória de curta duração (do inglês, *Short term memory*)

mGluR – Receptor metabotrópico de glutamato

MLD/LTM – Memória de longa duração (do inglês, *Long term memory*)

MPD – Memória propriamente dita

mRNA – RNA mensageiro

MT – Memória de trabalho

NMDA – N-metil-D-aspartato

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

PKC – Proteína cinase C (do inglês, *Protein kinase C*)

PKG – Proteína cinase G (do inglês, *Protein kinase G*)

PLC – Fosfolipase C (do inglês, *Phospholipase C*)

PRPs – Proteínas relacionadas à plasticidade (do inglês, *Protein related plasticity*)

SN – Substância *nigra*

STC – Marcação e captura sináptica (do inglês, *Synaptic tagging and capture*)

SUB – Subículo

VTA – Área tegmental ventral (do inglês, *Ventral tegmental area*)

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>PARTE I .....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1 Tipos de memória .....	19
2.2 Memória de reconhecimento .....	21
2.3 Formação da memória de longa duração .....	23
2.4 Persistência da memória e o envolvimento do sistema dopaminérgico .....	27
2.5 Estratégias comportamentais que modulam a memória .....	30
2.5.1 Exposição à novidade .....	30
2.5.2 Exercício físico agudo .....	33
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Objetivo geral.....	37
4.2 Objetivos específicos .....	37
<b>PARTE II .....</b>	<b>39</b>
<b>MANUSCRITO CIENTÍFICO I.....</b>	<b>40</b>
<b>MANUSCRITO CIENTÍFICO II.....</b>	<b>62</b>
<b>PARTE III.....</b>	<b>84</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>102</b>

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é composta por dois estudos principais, os quais buscaram investigar os mecanismos dopaminérgicos envolvidos na modulação da persistência memória de reconhecimento utilizando diferentes estratégias comportamentais: a exposição à novidade e o exercício físico agudo. Trata-se de um estudo experimental, que foi desenvolvido após aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA da UNIPAMPA (ANEXO I).

A dissertação encontra-se organizada em 3 partes principais. Na “**Parte I**”, a sessão “Introdução” traz os principais conceitos que fundamentam esta dissertação; em seguida, a “Revisão de literatura” traz as atualizações sobre o que já sabemos sobre as principais temáticas que envolvem este estudo. A revisão de literatura foi realizada a partir de pesquisas na base de dados Pubmed, considerando os descritores “*memory*”, “*memory formation*”, “*long-term memory*”, “*memory recognition*”, “*memory persistence*”, “*dopamine*”, “*dopaminergic system*”, “*novelty*”, “*behavioral tagging*”, “*synaptic tagging*” e “*acute physical exercise*”, os termos foram pesquisados unicamente ou combinados entre si por operadores booleanos no período de Junho a Novembro de 2020. Nesta primeira parte também estão inclusas a “Justificativa” e os “Objetivos”.

A “**Parte II**” é composta por dois manuscritos científicos, que apresentam os materiais e métodos, bem como os resultados que compõe esta dissertação. O “Manuscrito científico I”, intitulado: *Novelty promotes memory persistence by D1 dopamine receptor activation and PKA signaling in rat's hippocampus*, foi submetido ao periódico “*Neurobiology of Learning and Memory*” (ANEXO II); e o “Manuscrito científico II”, intitulado: *One single physical exercise session improves memory persistence by hippocampal activation of D1 dopamine receptors and PKA signaling in rats* foi submetido ao periódico “*Brain Research*” (ANEXO III).

A “**Parte III**” desta dissertação traz as sessões “Discussão” e “Conclusões”, nas quais apresentamos interpretações gerais sobre os achados dos nossos estudos; e, por fim as “Perspectivas futuras” são apresentadas a partir dos nossos achados. Ao final, encontram-se as referências bibliográficas utilizadas na primeira e na terceira parte da dissertação.

## PARTE I



## 1 INTRODUÇÃO

As memórias de longa duração (MLD) podem durar horas, dias, semanas, meses ou anos, e requerem um processo inicial de consolidação celular, que ocorre por pelo menos 6 horas após a aquisição da informação (Izquierdo, 2018). A consolidação da memória consiste em um processo de estabilização da informação após o período de aprendizado e envolve diferentes regiões do cérebro, conforme o tipo de memória formada (McGaugh, 2000). Este processo requer especificamente a síntese de novas proteínas e envolve uma variada gama de processos bioquímicos (Bekinschtein et al., 2008; McGaugh, 2000).

“Mas por que algumas memórias duram mais tempo do que outras?”. Um dos fatores que regula a persistência da memória é o nível de “alerta emocional” no período da consolidação inicial, ou seja, a ativação de regiões e sistemas específicos cerebrais contribuem para a maior duração de uma memória (Izquierdo, 2018). No entanto, nem tudo a que somos expostos relaciona-se à fatores emocionais e, muitas vezes, precisamos que algumas dessas informações sejam consolidadas e que estejam disponíveis para futura evocação. Assim, estudar estratégias comportamentais e farmacológicas que possam contribuir para a persistência da memória é fundamental. Além disso, é importante que saibamos por quais mecanismos elas atuam.

Dentre os mecanismos envolvidos na persistência da memória está a ativação de neurônios dopaminérgicos hipocampais (Rossato et al., 2009). A região CA1 (*Cornu ammonis I*) do hipocampo é uma estrutura essencial para a formação das memórias (Izquierdo, 2018; Mello-Carpes et al., 2016). Esta região possui axônios advindos de outras áreas cerebrais como a área tegmental ventral (VTA, do inglês, *ventral tegmental area*), a substância nigra (SN), o *nucleus accumbens* (NAc) e o *locus coeruleus* (LC), que, por sua vez, são as principais responsáveis pela liberação de dopamina (Edelmann & Lessmann, 2018; Lisman & Grace, 2005; Moncada, 2017). A sinalização de dopamina destas áreas ao hipocampo, antes ou após um aprendizado, resulta no fortalecimento das sinapses e favorece a persistência da memória (Medina et al., 2008; Rossato et al., 2009; Vargas et al., 2020). No hipocampo a dopamina pode interagir com as diferentes famílias de receptores dopaminérgicos presentes na membrana de neurônios pré e pós-sinápticos, sendo

elas a família D1 (receptores D1/D5) e a família D2 (receptores D2/D3/D4) (Hansen & Manahan-Vaughan, 2012). Entretanto, devido ao seu papel significativo na regulação da plasticidade sináptica e das memórias dependentes do hipocampo, a família D1 tem recebido maior atenção em estudos relacionados à memória (Hagena & Manahan-Vaughan, 2016; Shivarama Shetty et al., 2016; Zhang et al., 2018).

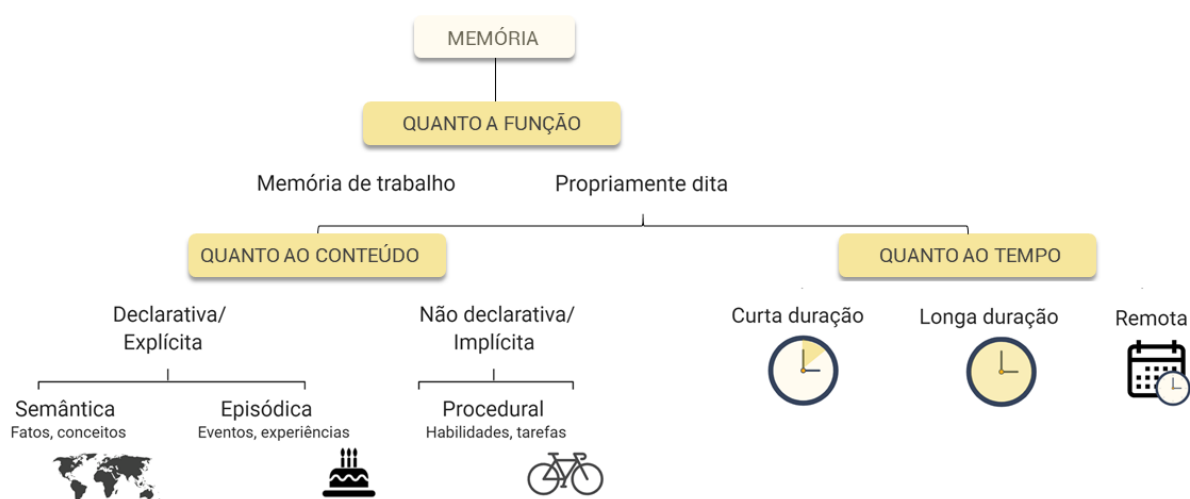
O consenso geral é que a liberação de dopamina durante o período de consolidação seja um dos mecanismos mais importantes para a persistência da memória (Izquierdo, 2018; McGaugh, 2000). Processos que utilizam um segundo evento comportamental que medeia a ativação do sistema dopaminérgico vêm sendo amplamente estudados e utilizados para melhorar a memória (Lima et al., 2019; Moncada, 2017; Moncada et al., 2011; Vargas et al., 2017). Das estratégias comportamentais capazes de ativar o sistema dopaminérgico e melhorar os traços mnemônicos destacamos duas: (1) exposição à novidade e (2) exercício físico agudo. À exposição a uma novidade é capaz de melhorar os processos de consolidação da memória, tornando-a mais forte e duradoura (Ballarini et al., 2009; Moncada et al., 2011; Moncada & Viola, 2007). Em paralelo, recentemente em nosso grupo de pesquisa demonstramos que uma única sessão de exercício físico aeróbico é capaz de modular a consolidação e promover a persistência da memória (Vargas et al., 2017, 2020).

Sabendo que estes dois estímulos comportamentais atuam na modulação das memórias e ativam o sistema dopaminérgico (Daré et al., 2020; Moncada, 2017; Moncada et al., 2011; Vargas et al., 2020), que está diretamente relacionado com os mecanismos de persistência, nesta dissertação, nós investigamos os efeitos da exposição à novidade e do exercício físico agudo sobre a persistência da memória de reconhecimento – uma memória de caráter não emocional e; tendo em vista o papel significativo dos receptores D1 e D5 na formação da MLD, nós propomos investigar o envolvimento destes receptores na modulação da memória induzida por ambas as estratégias comportamentais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tipos de memória

Memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, armazenar e lembrar de informações (Izquierdo, 2018; Kandel et al., 2014). Ao longo da vida, as diversas experiências que temos nos permitem formar diferentes tipos de memórias, que podem ser classificadas sob diferentes aspectos (Squire, 1984; Squire & Zola, 1996). De modo geral, as memórias podem ser classificadas de acordo com sua função, conteúdo e tempo de duração (Figura 1).



**Fig. 1. Classificações da memória.** De acordo com sua função, conteúdo e tempo. Fonte: elaborado pela autora.

Considerando a função, há dois tipos de memória: (1) memória de trabalho (MT) e (2) memória propriamente dita (MPD). A MT ou memória operacional é uma função executiva. Ela é breve e fugaz, serve para “gerenciar a realidade”; a informação adquirida é mantida por segundos ou minutos; não tem uma base de sustentação bioquímica, por isso não deixa traços; usamos a memória de trabalho, por exemplo, para gravar um número de telefone até discá-lo, uma vez feito, a esquecemos (Baddeley, 2003; Izquierdo, 2018). Já a MPD requer uma sustentação bioquímica após sua aquisição, para que processos de armazenamento e lembrança das informações possam ocorrer, as demais classificações abrangem esta memória (Bekinschtein et al., 2007, 2008; Katche et al., 2013).

De acordo com o conteúdo, uma MPD pode ser: (1) declarativa ou explícita e (2) procedural ou implícita. As memórias declarativas são aquelas que podem ser “declaradas” e descritas; estas memórias podem ser sub classificadas em memória semântica e episódica (Baddeley, 2001; Izquierdo, 2018). As memórias semânticas estão relacionadas a conhecimentos gerais, como por exemplo, conhecimentos de geografia, química e matemática (Baddeley, 2001; Izquierdo, 2018). Já as memórias episódicas são autobiográficas e referem-se à eventos que vivenciamos, como por exemplo, as lembranças da nossa formatura ou aniversário (Baddeley, 2001; Izquierdo, 2018). Em experimentos em animais de laboratório a memória episódica é amplamente estudada através da avaliação do comportamento frente à determinados estímulos (reconhecer um evento, seu contexto, etc.) (Chen et al., 2020; Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015). As memórias procedurais, por sua vez, caracterizam as capacidades ou habilidades motoras e/ou sensoriais, são memórias difíceis de “declarar” sem a execução da tarefa em si; andar de bicicleta, nadar e tocar instrumentos musicais são exemplos típicos (Izquierdo, 2018).

De acordo com o tempo de duração, as MPD podem ser (1) memória de curta duração (MCD), (2) memória de longa duração (MLD) ou (3) memória remota. A MCD dura entre 1 e 6 horas e é responsável por manter a informação disponível enquanto a MLD está sendo formada (através de processos paralelos) (Izquierdo et al., 1999; McGaugh, 2000); uma característica principal da MCD é que esta não causa alterações permanentes, uma vez que não requer expressão gênica ou síntese proteica (Lee et al., 2004). Já a MLD demora mais tempo para ser armazenada, uma vez que sua formação depende da síntese de novas proteínas; ela promove a modificação química e estrutural de determinadas sinapses em diversas regiões cerebrais e, com isto, a memória pode durar de dias até muitos meses (Izquierdo et al., 1999; Moncada et al., 2011; Vargas et al., 2017). As MLD que permanecem por longos meses ou anos costumam ser denominadas memórias remotas (Izquierdo, 2018). É importante destacar que o que irá determinar a duração de uma memória é, principalmente, a força do traço mnemônico (que se relaciona com o aprendizado e seu contexto), ou seja, a sua capacidade de causar alterações fisiológicas e/ou estruturais nas sinapses (Katche et al., 2013).

Embora haja classificações para as memórias, tanto em humanos quanto em animais, é comum uma sobreposição entre os diferentes tipos e subtipos (Izquierdo,

2018). Nesta dissertação nós estudamos a memória de reconhecimento, um tipo de memória episódica declarativa. Adicionalmente, nós verificamos sua capacidade de formar uma MLD persistente frente à diferentes estímulos comportamentais e infusões farmacológicas.

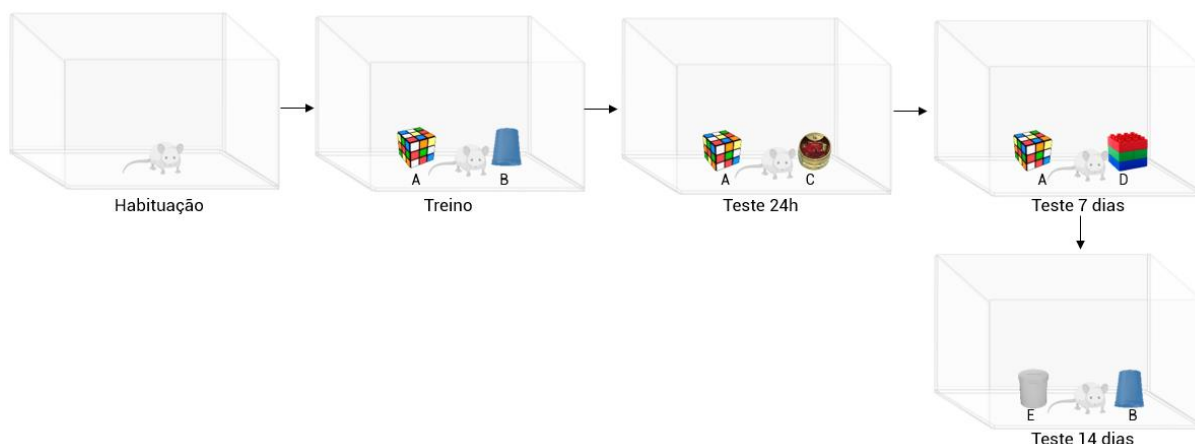
## **2.2 Memória de reconhecimento**

A memória de reconhecimento é uma memória episódica declarativa que permite a discriminação de fatos e eventos (Manns et al., 2003). Ela refere-se à capacidade de identificar determinados estímulos previamente conhecidos que podem ser, por exemplo, pessoas ou objetos (Stern & Hasselmo, 2008). A memória de reconhecimento nos permite reconhecer pessoas como familiares ou não, distinguir qual é nosso carro em um estacionamento, ou até mesmo reconhecer um suspeito de um crime. Uma analogia é que a memória de reconhecimento se assemelha à exames de múltipla escolha, nos quais a resposta está presente, mas deve ser identificada entre outras opções expostas (Stern & Hasselmo, 2008).

Em roedores, uma das tarefas mais comumente utilizadas para o estudo desta memória é a tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaceur, 2010; Ennaceur & Delacour, 1998). Esta tarefa é particularmente atrativa para o estudo da memória, uma vez que não requer motivação externa, recompensa ou punição; requer apenas um tempo prévio de habituação no aparato (um campo aberto) e uma sessão de treino em um período de tempo relativamente curto (Vargas et al., 2017; Vargas et al., 2020). A memória é facilmente testada através da apresentação de dois objetos: um conhecido (explorado na sessão de treino) e um novo; o processo de reconhecimento envolve a recuperação da memória para o objeto conhecido. Neste teste, a tendência é que, por lembrar do objeto conhecido, o animal gaste mais tempo explorando o novo objeto (Ennaceur, 2010; Ennaceur & Delacour, 1998).

A ideia de que o animal explore mais tempo o novo objeto é baseada no interesse natural dos roedores por novidade. O reconhecimento do objeto ocorre a partir das suas diferentes cores, formas e tamanhos; copos, legos, cilindros e brinquedos são comumente usados nesta tarefa. Porém, é importante que os animais não consigam movê-lo, para isso o objeto deve ser pesado ou estar fixo no assoalho do aparato (Antunes & Biala, 2012). Além do mais, os animais não devem

ter preferência pelo objeto, uma vez que a preferência não é um parâmetro indicativo de consolidação da memória. A fim de evitar este viés, em nosso laboratório nós protocolamos combinações específicas de objetos para testes de MLD (Figura 2), conforme testes prévios em animais experimentais. Nestes testes, o tempo de exploração de dois objetos desconhecidos deve ser similar (Neves et al., 2020).



**Fig. 2. Protocolo da tarefa de reconhecimento de objetos.** Sessões de habituação ao aparato (20 minutos/4 dias), treino com dois objetos distintos e desconhecidos e testes de MLD, 24 horas, 7 e 14 dias após a sessão de treino (5 minutos/sessão). Na imagem estão representadas as combinações de objetos utilizadas em cada sessão: A – cubo mágico; B – copo de plástico; C – lata circular; D – peça de legos; E – cilindro metálico. Fonte: elaborado pela autora.

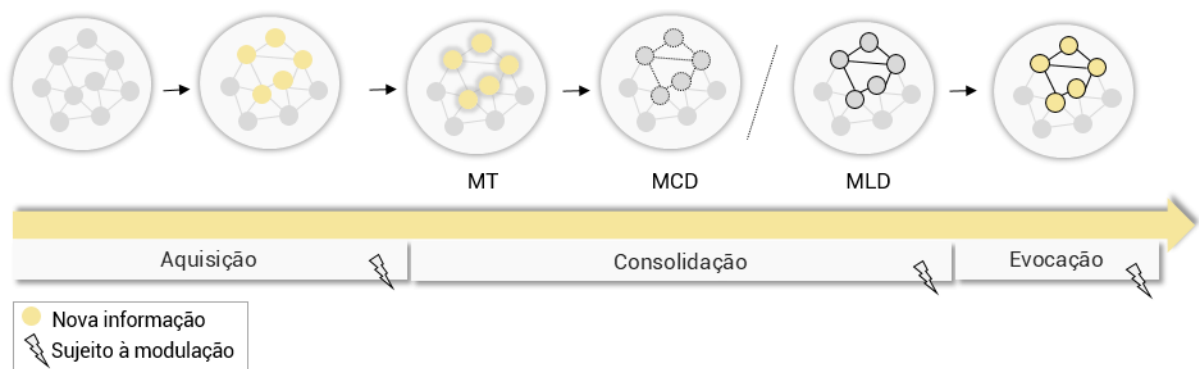
Em animais saudáveis, o nosso protocolo na tarefa de reconhecimento de objetos é suficiente para observarmos a formação da MLD, geralmente testada 24 horas após o treino; entretanto, é comum um esquecimento fisiológico após este tempo (Vargas et al., 2017; Schimidt et al., 2019; Vargas et al., 2020). A partir deste fato, estudos experimentais tem se preocupado em buscar estímulos (farmacológicos ou não) que possam promover a persistência da MLD nesta tarefa (Vargas et al., 2017; Neves et al., 2020; Sosa et al., 2019; Vargas et al., 2020).

A formação da memória de reconhecimento de objetos envolve mecanismos moleculares específicos (Furini et al., 2020), e é dependente, entre outras estruturas estudadas, do hipocampo (Antunes & Biala, 2012; Manns et al., 2003). O hipocampo recebe entradas do córtex perirrinal, que é responsável por integrar as informações como estímulos visuais, olfativos e somatossensoriais, todos eles envolvidos no reconhecimento de objetos (Taylor et al., 2007). Desta forma, manipulações farmacológicas ou eventos comportamentais que atuam sobre esta região do

cérebro podem modular positivamente ou negativamente o aprendizado da tarefa, influenciando os processos que culminam à formação da MLD (Mello-Carpes et al., 2016; Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020).

### 2.3 Formação da memória de longa duração

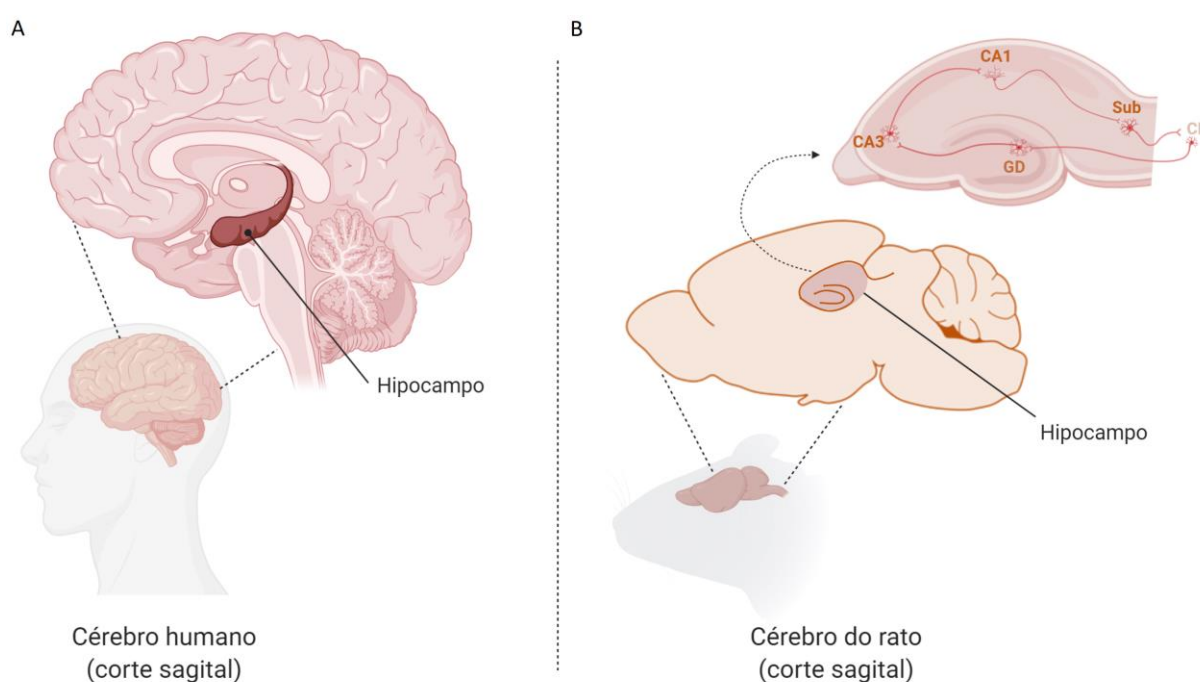
Os processos envolvidos no estabelecimento de uma MLD (Figura 3) envolvem três fases principais: a aquisição, a consolidação e a evocação. A primeira fase consiste na aquisição da informação, também conhecida como aprendizagem; a consolidação é o processo de estabilização da informação e; a evocação corresponde ao momento em que a informação é lembrada (Izquierdo, 2018). A fase de consolidação da MLD compreende o envolvimento de processos metabólicos no hipocampo e outras estruturas cerebrais que requerem entre 3 e 6 horas até a estabilização, neste período a memória pode sofrer forte influência de fatores externos, pois é altamente lábil (McGaugh, 2000; Rossato et al., 2007).



**Fig. 3. Processos envolvidos no estabelecimento da memória.** Representação esquemática de uma rede neural durante as fases de aquisição, consolidação e evocação. A MT precede às MCD e MLD e, auxilia na determinação de que tipo e quanta informação irá seguir nos sistemas de memória de curta e de longa duração. A MCD é consolidada paralelamente à MLD, que após formada, substitui o traço inicialmente fraco da MLD por um traço mais forte, dependente de síntese proteica. Após a consolidação da MLD, que dura entre 3-6 horas, pode haver a sua evocação. Todas estas fases são suscetíveis à modulação. MT = memória de trabalho; MCD = memória de curta duração; MLD = memória de longa duração. Fonte: elaborado pela autora.

A região CA1 do hipocampo (Figura 4) é considerada a estrutura central para a formação de memórias declarativas em mamíferos (Howard, 2001). Ela atua em

conjunto com outras regiões do cérebro e do próprio hipocampo. No hipocampo, a região CA1 atua em um circuito funcional, CA1→subículo→córtex entorrinal→giro denteado→CA3→CA1, através da emissão de fibras excitatórias entre uma região e outra; este circuito participa ativamente nos processos de formação das memórias (Izquierdo, 2018). Ainda assim, embora haja o envolvimento de outras estruturas internas do hipocampo, a região CA1 tem a função relacionada ao aprendizado e à formação da memória melhor documentada (Bekinschtein et al., 2008; Rossato et al., 2007).



**Fig. 4. Localização do hipocampo.** (A) Cérebro humano e (B) cérebro de um roedor (B) com destaque à região do hipocampo. Em (B) observa-se o circuito funcional CA1 → subículo (Sub) → córtex entorrinal (CE) → giro denteado (GD) → CA3 → CA1. Fonte: elaborado pela autora.

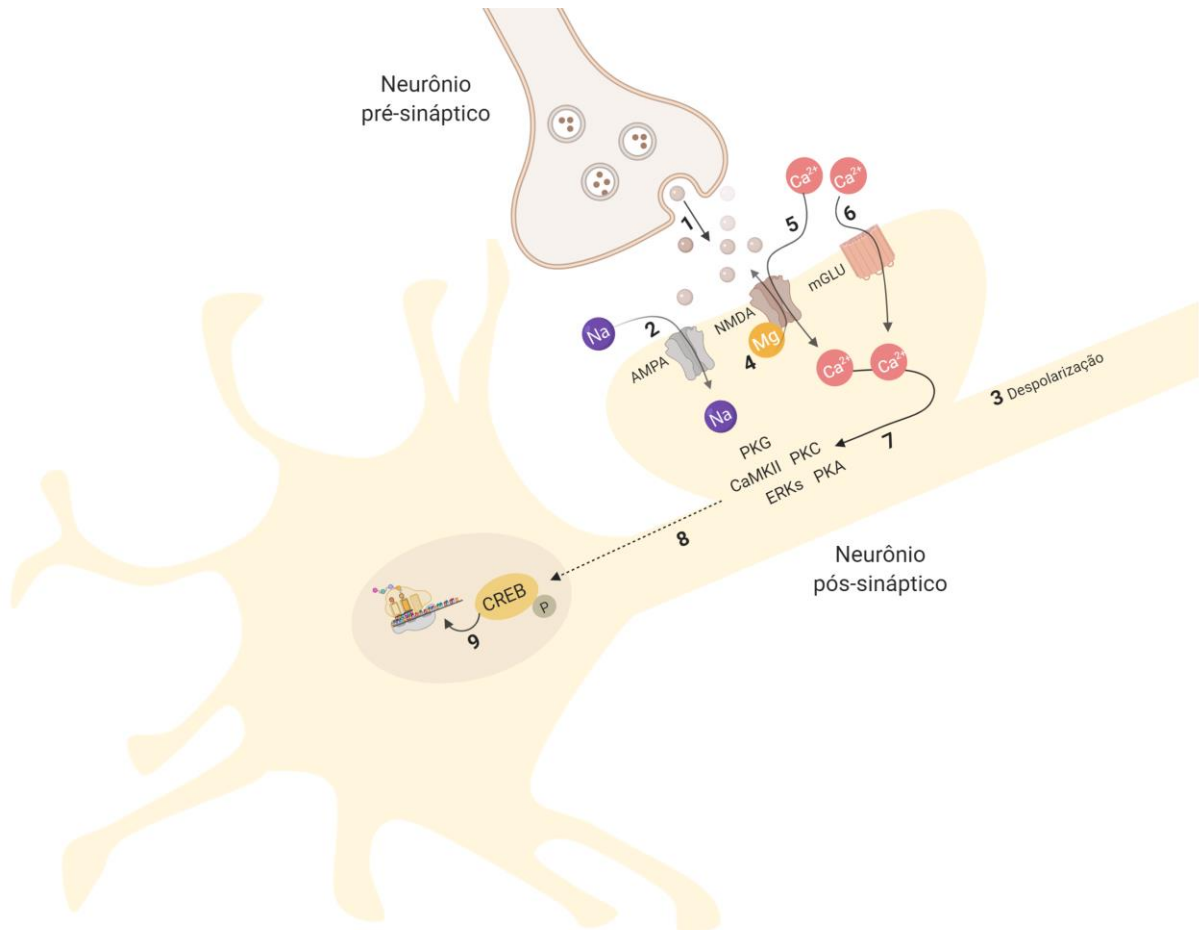
Os mecanismos de formação das MLD começaram a ser desvendados após uma sequência de descobertas de um processo eletrofisiológico denominado potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*). A LTP foi inicialmente estudada na região CA1 hipocampo de roedores, onde observou-se que uma breve estimulação repetitiva de um axônio ou de um conjunto de axônios promove o aumento persistente da resposta de neurônios que fazem sinapses com eles (Bliss & Collingridge, 1993; Collingridge & Bliss, 1987). A resposta de longa duração observada nos neurônios foi comparada a longa duração das memórias



(Abel et al., 1997; Whitlock et al., 2006). Pesquisas posteriores utilizando animais experimentais e a avaliação de diferentes tipos de memórias comprovaram que muitos dos processos bioquímicos envolvidos na formação da LTP intervêm também nos processos de formação e consolidação das memórias na região CA1 do hipocampo (Abel & Lattal, 2001; Bliss & Collingridge, 1993). Portanto, estes achados permitiram considerar que, embora haja algumas (poucas) diferenças entre ambos os processos, a LTP é um processo base para a formação da MLD.

A sequência de passos moleculares da consolidação da MLD (Figura 5) inicia com a excitação repetida das células hipocâmpais por meio da estimulação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), e metabotrópicos (mGlu-R), que respondem principalmente ao neurotransmissor glutamato; este processo inicial desencadeia a entrada de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) na célula, produzindo despolarização. A partir disso, a célula expulsa o íon magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e deixa o receptor glutamatérgico de tipo NMDA livre e funcional, de modo a permitir o ingresso de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à célula através dele. Os receptores mGlu-R também são ativados aumentando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula direta ou indiretamente uma série de enzimas proteinoquinasas: cálcio/calmodulina-dependentes (CaMKII, III e IV, proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina, do inglês *calcium/calmodulin-dependent protein kinase*), cálcio-dependentes (PKC, proteína cinase C, do inglês *protein kinase C*), dependentes do GMPc (PKG, proteína cinase G, do inglês *protein kinase G*), dependentes do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*; PKA, proteína cinase A, do inglês *protein kinase A*) e as ativáveis extracelularmente (ERKs, quinases reguladas por sinal extracelular, do inglês *extracellular signal-regulated kinases*). Essas enzimas regulam a transferência de íons fosfato desde o trifosfato de adenosina (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) a sítios específicos em diversas proteínas; seu papel depende do tipo de enzima e sua localização. Um processo-chave é a fosforilação de fatores de transcrição de DNA, presentes no núcleo das células, o principal deles é a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB, do inglês *cAMP responsive-element binding protein*). A ativação do CREB, promove a formação de RNAs mensageiros (mRNAs) que culminam a síntese de proteínas nos ribossomos; algumas dessas proteínas são

transportadas ao terminal sináptico das células, alterando sua superfície e, portanto, aumentando ou diminuindo sua função (Abel & Lattal, 2001; Izquierdo, 2018).



**Fig. 5. Sequência de passos moleculares envolvidos no processo de consolidação da MLD.** O neurotransmissor glutamato é liberado na fenda sináptica (1), podendo ligar-se à diferentes receptores glutamatérgicos (AMPA, NMDA, mGlu). Sua ligação permite a entrada de  $\text{Na}^+$  através de receptores AMPA (2), ocasionando uma despolarização na membrana do neurônio (3). A partir da despolarização, há a expulsão do  $\text{Mg}^{2+}$  que estava ligado ao receptor NMDA (4), permitindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por este canal (5); os receptores mGlu também são ativados, aumentando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (6). Esta condição estimula uma série de proteínas cinases (7), que culminam à fosforilação de fatores de transcrição no núcleo (8), induzindo a síntese de novas proteínas (9). Fonte: elaborado pela autora.

Todos esses processos moleculares só ocorrem porque as células nervosas possuem a capacidade de mudar suas respostas à determinados estímulos em função da experiência, este fenômeno é conhecido como neuroplasticidade (McClung & Nestler, 2008). Enquanto a LTP é uma manifestação eletrofisiológica da plasticidade neuronal, a aquisição de um aprendizado e a formação de uma

memória é a manifestação comportamental dessas modificações (Izquierdo, 2018). De um ponto de vista estrutural e fisiológico, essas modificações poderão aumentar o número de sinapses entre um neurônio e outro, pela ramificação de axônios ou dendritos; ou aumentar a eficiência da sinapse, aumentando o número de receptores pós-sinápticos, ou o tamanho da superfície da terminação pré-sináptica ou da área dendrítica (Frick et al., 2004; Hecht et al., 1975).

#### **2.4 Persistência da memória e o envolvimento do sistema dopaminérgico**

Embora os processos de consolidação das MLD estejam bem descritos na literatura, os mecanismos celulares e moleculares que promovem a persistência das memórias ainda não estão totalmente esclarecidos (Medina et al., 2008). A persistência da MLD está relacionada com a sua durabilidade em relação ao tempo, podendo persistir por dias, meses ou anos. Os fatores que permitem algumas memórias durarem mais tempo que outras são variados, entretanto, é consenso na literatura que eventos com alto grau emocional tendem a formar memórias mais persistentes (Izquierdo, 2018). Tendo em vista que muitas informações não formam memórias estáveis e duradouras, é crescente o interesse em entender os mecanismos envolvidos na persistência da memória e buscar estratégias que possam estabelecer este processo.

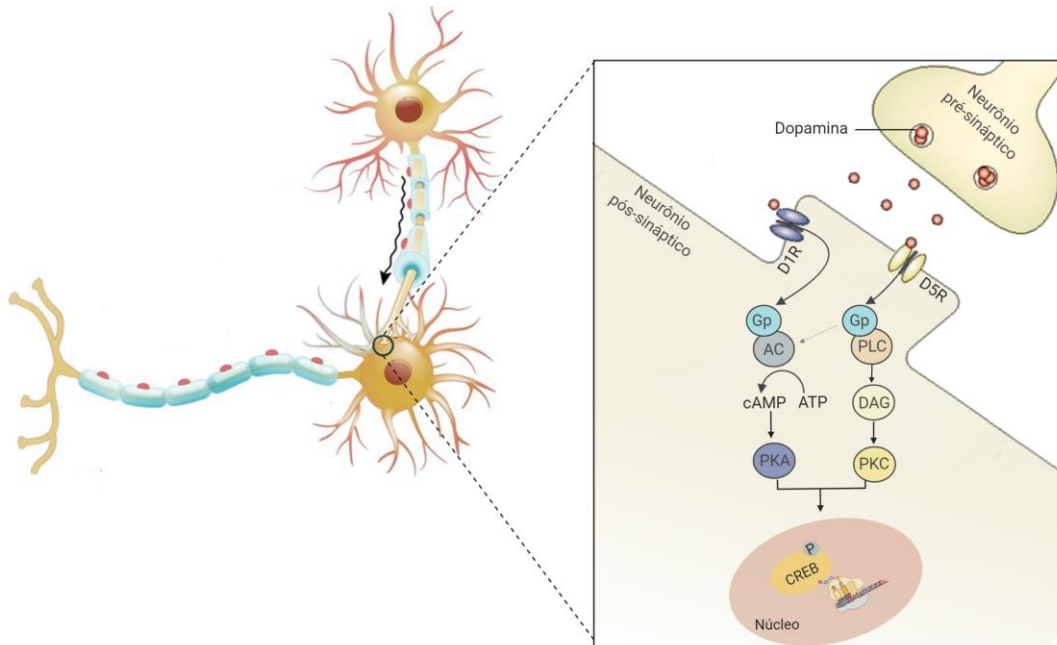
Como visto, a consolidação da MLD depende de síntese proteica hipocampal, que ocorre entre as primeiras horas após a aquisição. Além deste processo, uma memória persistente parece requer uma fase tardia de síntese de proteínas no hipocampo, que ocorre 12 horas após a aquisição (Bekinschtein et al., 2007). É provável que a persistência da MLD ocorra pela manutenção do traço de memória em períodos recorrentes, através de eventos moleculares semelhantes à consolidação (Bekinschtein et al., 2010; Eckel-Mahan et al., 2008). Intervenções no período de consolidação, tanto em sua fase inicial como tardia, demonstram ser eficazes para melhorar a persistência da memória (Katche et al., 2016). Além disso, experiências na janela da aquisição (Vargas et al., 2017, 2020) ou após a evocação de uma memória já consolidada (Wang, 2018) também podem modular a persistência de um aprendizado.

A síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) na região CA1 parece ser essencial para a persistência da memória, já que MLD persistentes estão associadas à níveis elevados desta proteína no hipocampo 12 horas após a aquisição (Bekinschtein et al., 2008). Sabendo que o armazenamento da memória depende da modificação estrutural de conexões sinápticas e crescimento neuronal (McGaugh, 2000), o BDNF aumenta o número de espinhas dendríticas de neurônios piramidais em CA1 (Tyler & Pozzo-Miller, 2001), evidenciando seu papel sobre a neuroplasticidade.

O sistema dopaminérgico também é requerido no processo de persistência, mais especificamente, os receptores da família D1, que envolve os receptores D1 e D5 (Rossato et al., 2009). A ativação da VTA, cujos axônios dopaminérgicos inervam a região CA1 do hipocampo e estimulam receptores da família D1, promove o aumento da expressão de BDNF e, conseqüentemente, a persistência da memória (Rossato et al., 2009). Outras regiões como o SN, NAc e LC projetam eferências dopaminérgicas ao hipocampo e tem demonstrado papel importante nos processos de memória (Moncada, 2017; Setlow, 1997).

Além da família D1, os receptores dopaminérgicos também podem ser do tipo D2, no qual atuam os receptores D2, D3 e D4. No entanto, a família D1 ganha maior destaque, pois tem demonstrado papel fundamental tanto na formação como na persistência de vários tipos de memórias (Furini et al., 2014; Menezes et al., 2015; Moncada et al., 2011; Vargas et al., 2020; Williams & Undieh, 2009); enquanto a família D2 não parece ser essencial nestes processos (Feyissa et al., 2019; Hagena & Manahan-Vaughan, 2016). Os receptores da família D1 são altamente expressos no hipocampo, incluindo o GD, CA1 e CA3 (Wei et al., 2018). Embora ambos os subtipos de receptores metabotrópicos, D1 e D5, sejam ativados pela dopamina, estes se engajam em diferentes cascatas de sinalização (Figura 6). Os receptores D1 usam adenilato ciclase (AC) como segundo mensageiro, permitindo a produção de cAMP e ativação da PKA. Já os receptores D5 ativam predominantemente o sistema fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*), produzindo o segundo mensageiro diacilglicerol (DAG, do inglês *diacylglycerol*) que modula a atividade da PKC. Ambos receptores são acoplado à proteína G-p (Undieh, 2010). Independente da via, qualquer um dos receptores inevitavelmente levará a processos de fosforilação que culminam à expressão proteica (Hansen & Manahan-Vaughan,

2012). Entretanto, poderão ter ações distintas em determinados processos mnemônicos (Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020).



**Fig. 6. Cascata de sinalização desencadeada pela estimulação dos receptores dopaminérgicos D1 e D5.** A estimulação dos receptores D1 regula a atividade da PKA, através da produção de AC e aumento de cAMP. A estimulação dos receptores D5 regula prioritariamente a atividade da PKC, através da produção de PLC e DAG. Ambas enzimas são importantes para o processo de consolidação, pois atuam na fosforilação de fatores de transcrição como o CREB, induzindo síntese de novas proteínas. Gp = proteína G-p; AC = adenilato ciclase; cAMP = monofosfato de adenosina; PKA = proteína cinase A; PLC = fosfolipase C; DAG = diacilglicerol; PKC = proteína cinase C; CREB = proteína de ligação responsiva ao AMPc. Fonte: elaborado pela autora.

Em nosso grupo de pesquisa, nós evidenciamos o envolvimento dos receptores D1/D5 na persistência da memória de reconhecimento por pelo menos três semanas a mais (Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020). No entanto, estudando as diferentes vias de cada receptor, confirmamos um maior envolvimento da via dos receptores D1 na consolidação de diferentes tipos de memória, dentre elas a memória de reconhecimento de objetos (Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020). Em contrapartida, pouco se sabe sobre o requerimento destas diferentes vias de sinalização sobre a persistência da memória. Nesta dissertação nós estudamos as vias de atuação dopaminérgica de duas estratégias comportamentais que modulam a memória pela estimulação de dopamina no hipocampo. Nós

pesquisamos a requisição dos receptores D1 e D5 nas fases de consolidação e persistência da memória, após a aplicação destas estratégias.

## **2.5 Estratégias comportamentais que modulam a memória**

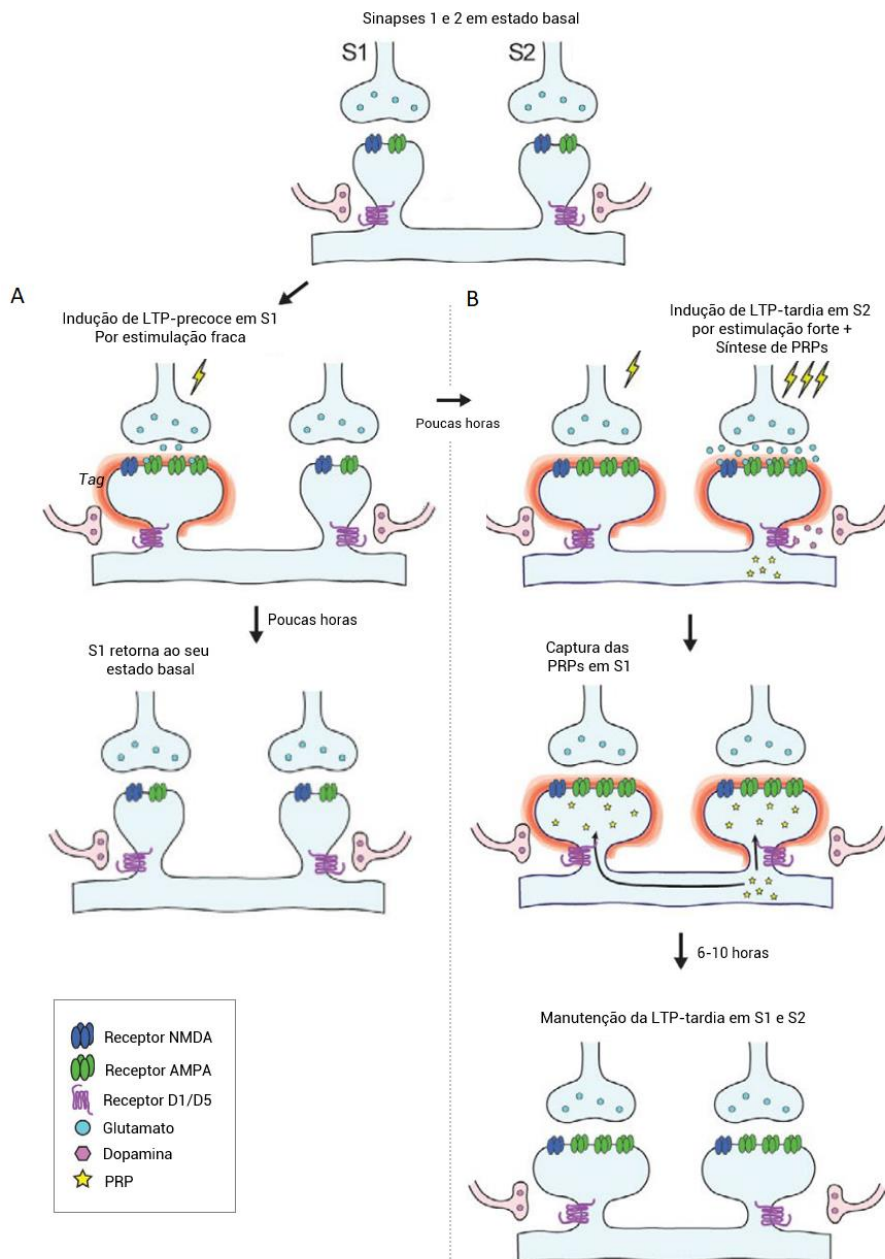
### **2.5.1 Exposição à novidade**

Uma novidade é uma nova experiência, no caso dos roedores pode ser, por exemplo, a exploração de um novo ambiente (Li et al., 2003; Moncada & Viola, 2007) ou um novo sabor (Ballarini et al., 2009). O hipocampo pode atuar como um detector de novidades, identificando novas informações em relação às já armazenadas no sistema nervoso (Vinogradova, 2001). Novos eventos costumam ter um alto grau de significância e, assim, ganhar status preferencial para codificação da memória e induzir cascatas moleculares subjacentes (Myskiw et al., 2014; Moncada et al., 2011; Moncada & Viola, 2007; Winograd & Viola, 2004).

Os mecanismos subjacentes ao fenômeno da novidade estão baseados na hipótese de “marcação e captura sináptica” (STC, do inglês *synaptic tagging and capture*), postulada por Frey e Morris (1997). Através da eletrofisiologia, foi observado que uma forte tetanização facilita a indução da LTP; mais precisamente, da sua fase tardia, fase-chave para indução dos processos de formação da memória. Em fatias de hipocampo de roedores, os pesquisadores estimularam dois conjuntos independentes de entradas sinápticas de uma mesma população de neurônios, e observaram que uma potenciação transitória (LTP-precoce) resultante de uma estimulação fraca poderia resultar em uma potenciação persistente (LTP-tardia), isto ocorreu quando um estímulo forte foi aplicado a uma outra via dentro de uma janela de tempo específica, antes ou depois.

À nível molecular (Figura 7), quando uma via sináptica é estimulada, dois eventos dissociáveis ocorrem: a LTP-precoce e a marcação da sinapse por um *tag* (uma espécie de etiqueta ou marcação), que a deixa lábil e suscetível à modificações (Frey & Morris, 1997). Se o estímulo for forte, haverá síntese de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs, do inglês *protein related plasticity*) que serão capturadas pelas sinapses marcadas e, como resposta, haverá a formação de uma LTP-tardia. Mas, se o estímulo não for forte o suficiente, pode haver a *tag* sem a síntese de proteínas, de forma que a sinapse previamente marcada retornará ao

seu estado basal, não potenciado e não marcado (Frey & Morris, 1997). A hipótese de STC propõe que quando um estímulo fraco é aplicado em uma janela de tempo próxima à um estímulo forte, haverá a captura das PRPs pelas duas vias, favorecendo a formação da LTP-tardia, este fenômeno é também conhecido como “cooperação” (Okuda et al., 2020). A síntese de PRPs, por sua vez, ocorre como resultado da ativação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 (Li et al., 2003; Moncada et al., 2011; Shivarama Shetty et al., 2016).



**Fig. 7. Mecanismo molecular da hipótese STC.** (A) Uma estimulação fraca em S1 ativa somente a via glutamatérgica, que permite a marcação da sinapse por um *tag* (em vermelho), induzindo uma

LTP-precoce; em poucas horas essa sinapse retorna ao seu estado basal. (B) Se em uma janela de tempo próxima à marcação da S1 (poucas horas antes ou após) uma outra via do mesmo neurônio, S2, receber um estímulo forte, haverá, além da ativação glutamatérgica e marcação, a indução de uma LTP-tardia e produção de PRPs; as PRPs são sintetizados como resultado da ativação paralela dos receptores de dopaminérgicos D1/D5. Através de um mecanismo de cooperação as PRPs poderão ser capturadas pela *tag* tanto da S2 quanto da S1. A captura das PRPs promove a manutenção da LTP-tardia nas duas vias, e promove o aumento do número de receptores AMPA, bem como do volume das espinhas dendríticas marcadas. PRPs = proteínas relacionadas à plasticidade. Fonte: adaptado e traduzido de Okuda et al., 2020.

A novidade é um estímulo forte que promove a síntese de PRPs e, portanto, é capaz de induzir a LTP-tardia (Li et al., 2003; Straube et al., 2003). Este efeito foi observado logo após a exposição a um novo ambiente e estava ausente em animais expostos a um ambiente familiar. A partir disto, Moncada e Viola (2007) postularam a hipótese de “marcação comportamental” (BT, do inglês *behavioral tagging*). A hipótese postula que a exploração de uma novidade fornece PRPs para estabilizar e fortalecer o traço de uma memória adquirida em um outro aprendizado (Moncada & Viola, 2007). Os pesquisadores evidenciaram que um aprendizado fraco, que normalmente resultaria em uma MCD, pode formar uma MLD quando um novo evento comportamental que induz a síntese de PRPs ocorre em uma janela de tempo próxima à aquisição (Moncada et al., 2011; Moncada & Viola, 2007).

A síntese de PRPs depende ativação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 no hipocampo (Menezes et al., 2015; Moncada et al., 2011), portanto, a ativação deste sistema é fundamental. Além disso, sabe-se que a novidade estimula a liberação de dopamina no hipocampo (Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015) e, que a VTA e o LC são regiões importantes para a síntese deste neurotransmissor e projeção até as áreas hipocampais (Moncada, 2017). Apesar de estar bem descrito na literatura a importância dos receptores D1/D5 no efeito da novidade, não está bem evidenciado a atividade individual destes receptores sobre o efeito da novidade, uma vez que a maioria dos estudos utilizam drogas agonistas ou antagonistas não seletivas (Chen et al., 2020; Moncada & Viola, 2007; Nomoto et al., 2016). Evidências demonstram que o efeito da novidade possa depender apenas dos receptores D1 e não D5 (Menezes et al., 2015). Adicionalmente, pouco se sabe sobre o efeito da novidade na modulação da persistência da memória (Tomaiuolo et al., 2015).



### 2.5.2 Exercício físico agudo

Os efeitos do exercício físico sobre a memória são bem documentados na literatura. Em particular, a maioria das pesquisas concentra-se em estudar os efeitos e mecanismos da prática da atividade física regular à longo prazo (semanas a meses de exercício). Em modelos animais, já foram comprovadas mudanças neuroanatômicas, neuroquímicas e neuromoleculares após algumas semanas de exercício físico. Dentre elas, destacam-se o aumento da neurogênese hipocampal (Diederich et al., 2017), de BDNF e dos níveis de diferentes neurotransmissores (Pietrelli et al., 2018).

O exercício físico agudo, caracterizado pela prática de uma ou poucas sessões de exercício, tem sido estudado em menor escala quando comparado com o exercício crônico. Entretanto, esta prática tem demonstrado ser um importante neuromodulador da memória, tanto em estudos com humanos (Cantrelle et al., 2020; Christiansen et al., 2019; Jentsch & Wolf, 2020), quanto em animais de laboratório (Daré et al., 2020; Sosa et al., 2019; Vargas et al., 2017, 2020). É importante destacar que os efeitos do exercício físico agudo não devem substituir os efeitos da prática regular de atividade física, que é caracterizada por seus efeitos a longo prazo e por mediar uma série de alterações neurais que promovem a neuroplasticidade (Diederich et al., 2017; Pietrelli et al., 2018).

As pesquisas que estudam os efeitos do exercício físico agudo sobre a cognição utilizam dos seus efeitos imediatos no sistema nervoso para modular os processos relacionados à formação memória (Bouchet et al., 2017; Roig et al., 2012; van Dongen et al., 2016; Weinberg et al., 2014). Em nosso grupo de pesquisa, nós testamos o efeito de uma única sessão de exercício físico realizada após a aquisição da memória de reconhecimento de objetos, e observamos que os animais que praticaram 30 minutos de atividade apresentaram persistência da memória por mais 21 dias em comparação ao grupo controle (Vargas et al., 2017; 2020). Dentre os mecanismos envolvidos neste processo, observamos um aumento de noradrenalina e dopamina do hipocampo, que corroboraram com os processos subjacentes à consolidação da memória. Ademais, observamos uma dependência da ativação hipocampal de receptores  $\beta$ -adrenérgicos e dopaminérgicos D1/D5.

Outros processos moleculares também parecem estar envolvidos no efeito do exercício físico agudo. Uma única sessão de aproximadamente 45 minutos de

exercício em esteira rolante parece ser suficiente para aumentar a expressão de BDNFmRNA no hipocampo de roedores (Venezia et al., 2017). Uma outra modalidade de exercício agudo, o exercício de resistência, também demonstrou ter efeitos positivos sobre a memória (Daré et al., 2020; Fernandes et al., 2016), sendo capaz de aumentar a expressão de proteínas sinápticas no hipocampo (Fernandes et al., 2016). De fato, são poucos os estudos que investigam os mecanismos neurobiológicos induzidos pelo exercício agudo. Loprinzi et al. (2018) trazem uma série de hipóteses pelo qual esta modalidade de exercício pode atuar para modular a memória. Uma hipótese interessante levantada pelos autores, é que o exercício agudo possa também atuar de acordo com a hipótese de STC, através da produção de PRPs.

O uso do exercício agudo como modulador da memória possui inúmeras vantagens, sua prática é fácil e acessível. Além disso, não acarreta efeitos colaterais, quando comparado à tratamentos farmacológicos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos do exercício agudo em modelos animais com déficits cognitivos e, nosso protocolo de uma única sessão em esteira por 30 minutos demonstrou ser eficaz para a melhora da memória (Daré et al., 2020; Sosa et al., 2019). Sendo assim, protocolos de exercício agudo demonstram ter uma ampla aplicabilidade sob a cognição, entretanto, é importante que seus mecanismos neuroquímicos sejam melhor elucidados.

### 3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que nossas ações e modo de nos comunicarmos dependem de memórias previamente formadas (Izquierdo, 2018), o estudo da neurobiologia da memória é essencial. É sabido que as memórias de caráter emocional possuem forte tendência de persistir por mais tempo (Izquierdo, 2018; Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015). Em contrapartida, é comum que memórias que não envolvam fatores emocionais, como a memória de reconhecimento, durem apenas um ou poucos dias (Neves et al., 2020; Vargas et al., 2017, 2020). Assim, consideramos importante a proposição de estratégias que possam promover a persistência destas memórias. Ademais, conhecer os mecanismos bioquímicos envolvidos neste processo é um avanço importante para a ciência, já que pode auxiliar estudos futuros que venham ter uma aplicabilidade clínica para a melhora da memória de pessoas saudáveis e/ou com demências.

Dentre os processos adjacentes ao aprendizado que podem ser utilizados para a melhora da memória, nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem se concentrado em estudar a estimulação dopaminérgica (Daré et al., 2020; Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020), uma vez que o sistema dopaminérgico é fundamental para os processos de consolidação e persistência da memória (Furini et al., 2014; Izquierdo, 2018; Moncada et al., 2011; Vargas et al., 2020). Nesta dissertação nós propomos melhor investigar os mecanismos dopaminérgicos envolvidos em duas estratégias comportamentais que estimulam a liberação de dopamina no hipocampo: a exposição à novidade e o exercício físico agudo.

A exposição à uma novidade antes ou após o aprendizado permite que memórias inicialmente fracas, que formariam apenas MCD, formem MLD (Moncada & Viola, 2007). Além do mais, a liberação de dopamina no hipocampo é fundamental neste processo (Menezes et al., 2015; Moncada, 2017; Moncada et al., 2011). Esta é uma estratégia simples e eficaz para melhora da memória, entretanto pouco se sabe sobre seus efeitos na persistência da MLD ao longo dos dias e quais são os mecanismos dopaminérgicos que podem estar envolvidos na sua ação (Moncada et al., 2011; Tomaiuolo et al., 2015). O exercício físico agudo também vem demonstrando ser uma estratégia eficaz para a modulação da memória. Em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa demonstrou que uma única sessão de exercício

físico aeróbico pode atuar como um importante modulador da memória e influenciar na sua persistência (Daré et al., 2020; Sosa et al., 2019; Vargas et al., 2017, 2020). Além do mais, observamos que este processo está intimamente relacionado com a liberação de dopamina na região CA1 do hipocampo e interação com os receptores dopaminérgicos D1/D5 (Vargas et al., 2020), mas até o momento não se sabe ao certo por qual via dopaminérgica o exercício físico agudo atua.

Através deste estudo pretendemos ampliar o conhecimento da neurobiologia da memória que envolve os mecanismos dopaminérgicos de persistência das MLD. Para isso, buscamos elucidar os efeitos de duas estratégias não invasivas e de fácil aplicabilidade, a novidade e o exercício agudo, na modulação da memória. Acreditamos que os nossos achados poderão ser úteis para pesquisas futuras que envolvam a prática clínica, através do uso das estratégias comportamentais aqui citadas. Ainda, consideramos que a identificação das vias dopaminérgicas envolvidas na modulação da persistência da memória poderá ser útil para o desenvolvimento de terapias farmacológicas cognitivas mais seletivas.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Investigar o envolvimento dos receptores dopaminérgicos D1 e D5 no efeito modulatório de diferentes estímulos (exposição à novidade; sessão única de exercício físico) sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos.

### **4.2 Objetivos específicos**

- i. Verificar se a estimulação farmacológica dos receptores D1/D5 na janela temporal da consolidação da memória em ratos Wistar facilita a persistência memória de reconhecimento de objetos;
- ii. Verificar se a exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico na janela temporal da consolidação da memória em ratos Wistar facilita a persistência memória de reconhecimento de objetos;
- iii. Investigar os efeitos da inibição hipocampal farmacológica dos receptores D1/D5 após a exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico sobre a consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos Wistar;
- iv. Investigar os efeitos da estimulação e inibição hipocampal farmacológica de PKA (via de atuação dos receptores D1) após o bloqueio dos receptores D1/D5 e exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico sobre a consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos Wistar;
- v. Investigar os efeitos da inibição hipocampal farmacológica de PKA (via de atuação dos receptores D1) após a exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico sobre a consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos Wistar;
- vi. Investigar os efeitos da estimulação e inibição hipocampal farmacológica de PKC (via de atuação dos receptores D5) após o bloqueio dos receptores D1/D5 e exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico sobre a

consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos Wistar;

- vii. Investigar os efeitos da inibição hipocampal farmacológica de PKC (via de atuação dos receptores D5) após a exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico sobre a consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos Wistar.

## PARTE II

Submetido à revista *Neurobiology of Learning and Memory*

**NOVELTY PROMOTES MEMORY PERSISTENCE BY D1 DOPAMINE RECEPTOR  
ACTIVATION AND PKA SIGNALING IN RAT'S HIPPOCAMPUS**

Karine Ramires Lima<sup>1</sup>, Ana Carolina de Souza da Rosa<sup>1</sup>, Steffanie Severo Picua<sup>1</sup>, Shara Souza e Silva<sup>1</sup>, Náthaly Marks Soares<sup>1</sup>, Pâmela Billig Mello-Carpes<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Physiology Research Group, Stress, Memory and Behavior Lab, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

\* Corresponding author

Stress, Memory and Behavior Lab, Federal University of Pampa

BR 472 km 592 - Po box 118 - ZIP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

E-mail: [pamelacarpes@unipampa.edu.br](mailto:pamelacarpes@unipampa.edu.br)

**Abstract**

Strategies for improving memory are increasingly studied, and exposure to a novel experience can be an efficient neuromodulator. Novelty act by behavioral tagging processes and depend on D1/D5 dopamine receptor activation. Here, we evaluated the novelty effect on Wistar rats' memory persistence and investigated D1 and D5 dopamine receptors' contribution and their signaling pathways in the CA1 area of the dorsal hippocampus. Animals with infusion cannulae inserted into the CA1 were trained on the object recognition (OR) task, exploring two different objects. After training, some received intrahippocampal infusions of vehicle or D1/D5 agonist; others explored a novel environment for 5 min and were infused with various drugs targeting D1/D5 receptors and their signaling pathways. Here, we demonstrated that pharmacological stimulation of D1/D5 receptors or novelty exposure improves OR memory persistence for 14 days. Furthermore, novelty effect depends on D1/D5 receptor activation. For signaling pathway evaluation, we blocked or stimulated PKA and PKC – proteins activated mainly by D1 and D5, respectively. Only PKA inhibition prevented the effect of novelty on persistence. Besides, after blocked of D1/D5, PKA stimulation but not PKC stimulation could promote



memory persistence. We concluded that novelty promotes memory persistence by a mechanism dependent on the activation of hippocampal D1 receptors on PKA pathway.

**Keywords:** behavioral tagging; neuromodulation; object recognition; dopaminergic system; D1/D5 receptors.

## 1 Introduction

After consolidation, the fate of a memory is uncertain; it may last for years or only a few hours or days (Katche et al., 2013). Identifying the mechanisms that lead to memory persistence is necessary, and these mechanisms have been increasingly discussed (Bekinschtein et al., 2010; Medina et al., 2008). Information can be stored as short-term memory (STM) or long-term memory (LTM) (Ballarini et al., 2013). Everyday experiences with little emotional impact are usually not stored as persistent LTM (Katche et al., 2013). However, when a trivial event and novel event (a novelty) occur close in time, the trivial event, which is only capable of forming a STM, can result in LTM formation by a process called behavioral tagging (BT) (Moncada & Viola, 2007). Moreover, BT can be involved in the persistence of LTM storage (Tomaiuolo et al., 2015), although its mechanisms need to be better clarified.

The BT hypothesis applies to learning models and was proposed based on the molecular model “synaptic tagging and capture” (STC) hypothesis (Moncada & Viola, 2007). The STC hypothesis postulates that weak stimulation establishes a “tag” in specific synapses that can be potentiated through the capture of plasticity-related proteins (PRPs) generated by strong stimulation within a certain temporal window (Frey & Morris, 1997). In this context, the formation of lasting memories requires at least two distinct processes: (1) the setting of a learning tag and (2) the synthesis of PRPs by a significant experience, which once captured at tagged sites allows for memory consolidation (Moncada et al., 2015). Considering the BT and STC hypotheses, the learning tag set by weak training could use the PRPs induced by novelty, thereby leading to LTM formation (Moncada et al., 2015). BT has been studied in several hippocampus-dependent tasks, such as fear conditioning (Chen et al., 2020; Menezes et al., 2015; Moncada, 2017), spatial object recognition (SOR) (Moncada, 2017), novel object recognition (OR) (Nomoto et al., 2016) and appetitive tasks (Gros & Wang, 2018). Most novel experiences include the exploration of a novel context; therefore, such exploration is a key element required to achieve

hippocampus-dependent behavioral tagging in rodents since the animals present a preference for exploring new environments (Chen, 2020; Moncada, 2017; Nomoto, 2016).

Novel experiences induce dopamine release in the hippocampus (Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015), mostly by neurons that project from the ventral tegmental area (VTA) (Lisman & Grace, 2005) and the locus coeruleus (LC) (Takeuchi et al., 2016). This event is critical to triggering the synthesis of PRPs (Moncada et al., 2011). Dopamine acts on D1 (D1/D5) or D2 (D2/D3/D4) family dopamine receptors, and behavioral studies have confirmed that activation of D1 family receptors is essential for memory encoding (Hagena & Manahan-Vaughan, 2016; Pezze et al., 2015) and LTM formation (Moncada & Viola, 2007; O'Carroll et al., 2006; Rossato et al., 2009). D2 family receptors do not seem to be critical in memory processes (Feyissa et al., 2019; Hagena & Manahan-Vaughan, 2016; Wang et al., 2020).

In the CA1 hippocampus area, D1/D5 activation is essential for memory encoding (Bekinschtein et al., 2010; Roggenhofer et al., 2013). Although both receptors activate signaling cascades that converge on a final common pathway, which involves phosphorylation processes and leads to CREB protein activation, the process is not the same for the two receptors (Undieh, 2010). While D1 subtype receptors indirectly modulate cAMP-dependent protein kinase (PKA) by adenylyl cyclase (AC) activation, D5 subtype receptors seem to regulate protein kinase C (PKC) activity through positive coupling to the phosphatidylinositol-3-kinase system (Undieh, 2010). In this sense, distinguishing between D1 and D5 receptors is pharmacologically possible by modulating these two pathways (Furini et al., 2014; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020). Most studies that have evaluated the role of dopamine in the novelty effect have used nonselective D1/D5 agonists or antagonists (Chen et al., 2020; Moncada et al., 2011; Nomoto et al., 2016). When evaluated individually, D1 receptors have been shown to be more relevant than D5 receptors in modulatory effects on different memories (Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020).

Whether the effect of novelty on OR memory modulation depends on both receptors (D1 and D5) or only one of them has not been clarified. Furthermore, little is known about the effects of novelty on LTM persistence. We consider that the identification of mechanisms for improving memory persistence is important both for healthy people and for people with cognitive deficits. In this study, we investigated whether exposure to novelty modulates OR LTM persistence and whether this effect is dependent on D1 and D5 dopamine receptors. We demonstrate that exposure to a novel context immediately after OR learning allows memory persistence in rats for up to 14 days; moreover, we

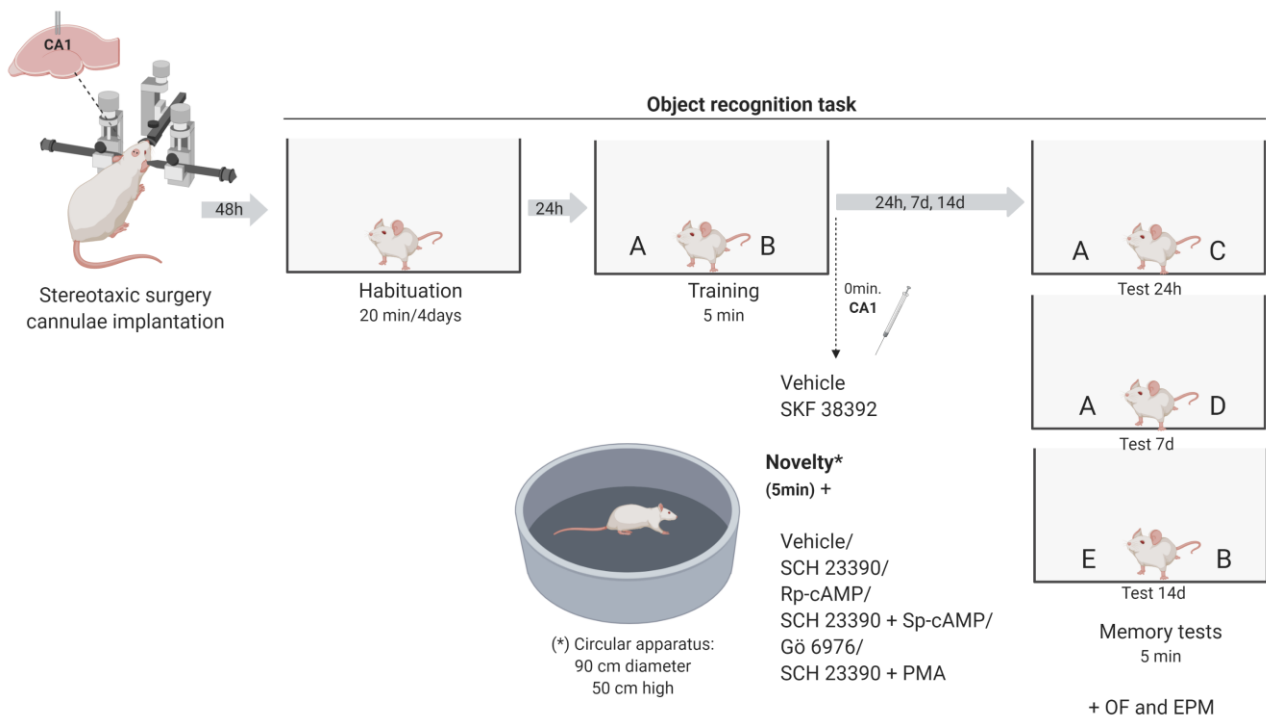
reveal that this effect depends on the activation of hippocampal D1 and the PKA pathway but not D5 dopamine receptors or the PKC pathway.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Animals and groups**

Male Wistar rats (3 months old; 300–350 g body weight) were purchased from the University of Santa Maria Central Vivarium (RS/Brazil). The animals were housed four per cage and kept under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 10\%$  humidity), and food and water were provided ad libitum. All experiments were conducted in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care of the National Institutes of Health and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the local institution (Protocol 033/2019). One week before the beginning of the experiments, the animals were habituated to the experimentation room and handled by the researcher to reduce stress.

The animals were randomly divided into eight groups ( $n = 8\text{--}10/\text{group}$ ), including a (i) control group (received intrahippocampal infusion of vehicle) and (ii) SKF 38393 group (received intrahippocampal infusion of SKF 38393, a D1/D5 agonist). The other following groups were exposed to a novel environment (novelty) for 5 min immediately after the OR training session and then received an intrahippocampal infusion of vehicle or drug(s): (iii) the novelty (vehicle) group; (iv) novelty + SCH 23390 (D1/D5 antagonist) group; (v) novelty + Rp-cAMP (PKA inhibitor; PKA is the second messenger from D1 receptors) group; (vi) novelty + SCH 23390 + Sp-cAMP (D1/D5 antagonist + PKA stimulator) group; (vii) novelty + Gö 6976 (PKC inhibitor; PKC is the second messenger from D5 receptors) group; and (viii) novelty + SCH23390 + PMA (D1/D5 antagonist + PKC stimulator) group. All animals were tested in the OR task 24 h, 7 and 14 days after training to assess memory consolidation and persistence. Fig. 1 summarizes the experiments conducted.



**Fig. 1. Experimental design.** Behavioral experiments were conducted after stereotaxic surgery recovery. All animals were habituated, trained in OR task and were exposed or not to novelty (for 5 min), followed by CA1 intra-hippocampal infusion of vehicle or drug(s), according to the experimental group. On the training session, the animals explored two novel and different objects for 5 min. To evaluate memory consolidation, the OR test session was performed 24 h after training. To evaluate memory persistence, OR test sessions were performed 7 and 14 days after training. In test sessions, the animals were exposed to a familiar object, previously explored, and a novel object for 5 min. Each letter represents a different object. After each OR test session, control behavioral tests were conducted: open field (OF) and elevated plus maze (EPM).

## 2.2 Surgery

All animals underwent stereotaxic surgery for bilateral guide cannula implantation under deep anesthesia (i.p., 75 mg/kg ketamine plus 10 mg/kg xylazine). The guide cannulas were made in the laboratory (9.0 mm) using hypodermic needles (25 x 0.7 mm). The cannulae were 27-gauge stainless steel tubes and were inserted into the CA1 region of the dorsal hippocampus (AP, -4.2 mm; LL,  $\pm$  3.0 mm; and VD, -2.0 mm) according to the coordinates provided by the anatomical atlas of Paxinos and Watson (Paxinos & Watson, 2013). The cannulae were fixed with dental cement. The animals were allowed to recover from surgery for 2 days before undergoing any other procedure.

## 2.3 Drugs and infusion procedure

The drugs used for infusion were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil), and were dissolved in 2% (vol/vol) DMSO in saline (vehicle) and stored at -20°C. Before use, aliquots were diluted to working concentrations with 0.9% saline. The drug concentrations were as follows: SKF 38393, 12.5 µg/µL; SCH 23390, 1 µg/µL; Gö 6976, 1.7 ng/µL; Rp-cAMP, 0.5 µg/µL; PMA, 0.5 µg/µL; and Sp-cAMP, 0.5 µg/µL. The concentrations and volumes were based on previous studies showing the effect of each compound on learning and behavioral performance (Furini et al., 2014; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020).

The infusion procedures were based on previous studies by our research group (Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020). For the infusion, a Hamilton syringe was connected to fine bore polythene tubing (38 gauge) with an infusion cannula (30 gauge) at the end. Drugs were bilaterally infused into the dorsal CA1 region of the hippocampus immediately after OR training for groups i and ii or novelty exposure for groups iii – viii. At the time of drug infusion, the infusion cannulas were fitted into the guide cannulae, which were inserted 1.0 mm deeper to reach the CA1 region of the hippocampus. Infusions (1 µL/side) into the CA1 region of the dorsal hippocampus were performed for a period of 60 s (Insight Ltda., Sao Paulo, Brazil) accompanied by a Hamilton syringe, and the cannulae were left in place for an additional 60 s to minimize backflow.

Cannula placement was verified postmortem as described previously (Vargas et al., 2017; Neves et al., 2020). In summary, 2–4 h after the last behavioral test, the same volume of 4% methylene blue solution as that of the drugs used in the experiments was infused into the CA1 region, and the area that the dye reached 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug(s) previously administered to each animal. Only data from animals with correct cannula placement (i.e., within 1 mm of the intended site) were analyzed.

## 2.4 Novelty exposure protocol

The novelty exposure protocol involved placing a rat in a novel environment, where it was left to explore freely for 5 min (Moncada et al., 2011; Moncada & Viola, 2007). The novel environment used in this study was a circular apparatus (90 cm in diameter and 50

cm high). The animals were exposed immediately after the OR training session, and later, the rat was submitted to the drug(s) or vehicle infusion.

## **2.5 Behavioral experiments**

### **2.5.1 Object recognition task**

The OR task was performed as previously described and was based on the animal's natural tendency to explore novel objects in a known environmental context (Ennaceur & Delacour, 1998). Before training, the animals were habituated to the environment (a 50 × 50 × 50 cm wooden box) by freely exploring it for 20 min per day for 4 days. Then, on the 5th day, the training session was performed, and the animals were placed again in the box with two different unknown objects and allowed to freely explore for 5 min. The LTM consolidation test session was performed 24 h after the training session. The LTM persistence tests were performed 7 and 14 days after the training session. In each test session, a novel and a familiar object were placed in the environment, and the animals were allowed to explore for 5 min.

The objects were made of metal or plastic, and it was previously confirmed (in pilot studies) that the animals had no preference for any of them. Each testing session was performed using a novel combination of a familiar and a novel object according to the time of the first familiar object presentation (i.e., 24 h, 7, or 14 days before the test). Exploration was defined as the animals touching the object with the front paws or sniffing it with the nose. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. The box and objects were cleaned with 70% alcohol thoroughly between trials to ensure the absence of olfactory cues.

### **2.5.2 Control behavioral task**

To evaluate whether drug administration or the other procedures altered the animals' general behavior, we obtained control parameters after each memory test session. Exploratory and locomotor activities were measured by performing the open field (OF) task (Hall, 1934; Hall & Ballachey, 1932). The rats were placed in the left quadrant of a box (50 × 50 × 39 cm) made of wood painted white with a front glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide the box into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures of locomotor and exploratory activities, respectively, were assessed over 5

min. The rats were subjected to the elevated plus-maze (EPM) (Pellow et al., 1985) for anxiety evaluation. We recorded the number of entries and time spent in the open and closed arms for 5 min. Anxious rats showed a greater tendency to enter and remain in closed arms than nonanxious rats.

## **2.6 Statistical analysis**

The exploration time for each object in the OR task was converted to a percentage of the total exploration time. The data were analyzed for normality using a parametric (one-sample t-test) statistical test to compare the percentage of total time spent exploring each object with a theoretical mean (50%).

Additionally, the discrimination index (DI) at 24 h, and on days 7 and 14 was determined by the calculating difference in time spent exploring the new (T novel) and familiar (T familiar) objects:  $DI = [(T \text{ novel} - T \text{ familiar}) / (T \text{ novel} + T \text{ familiar}) \times 100 (\%)]$ . The DI of each group was compared by mixed variable ANOVA (with test day as the within-subject factor and group as the between-subject factor) followed by Dunnett's multiple comparison test. Additionally, a Friedman repeated measures test was used to analyze the DI of each group between test days.

The total time spent exploring each object and the OF and EPM results for each session were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$ .

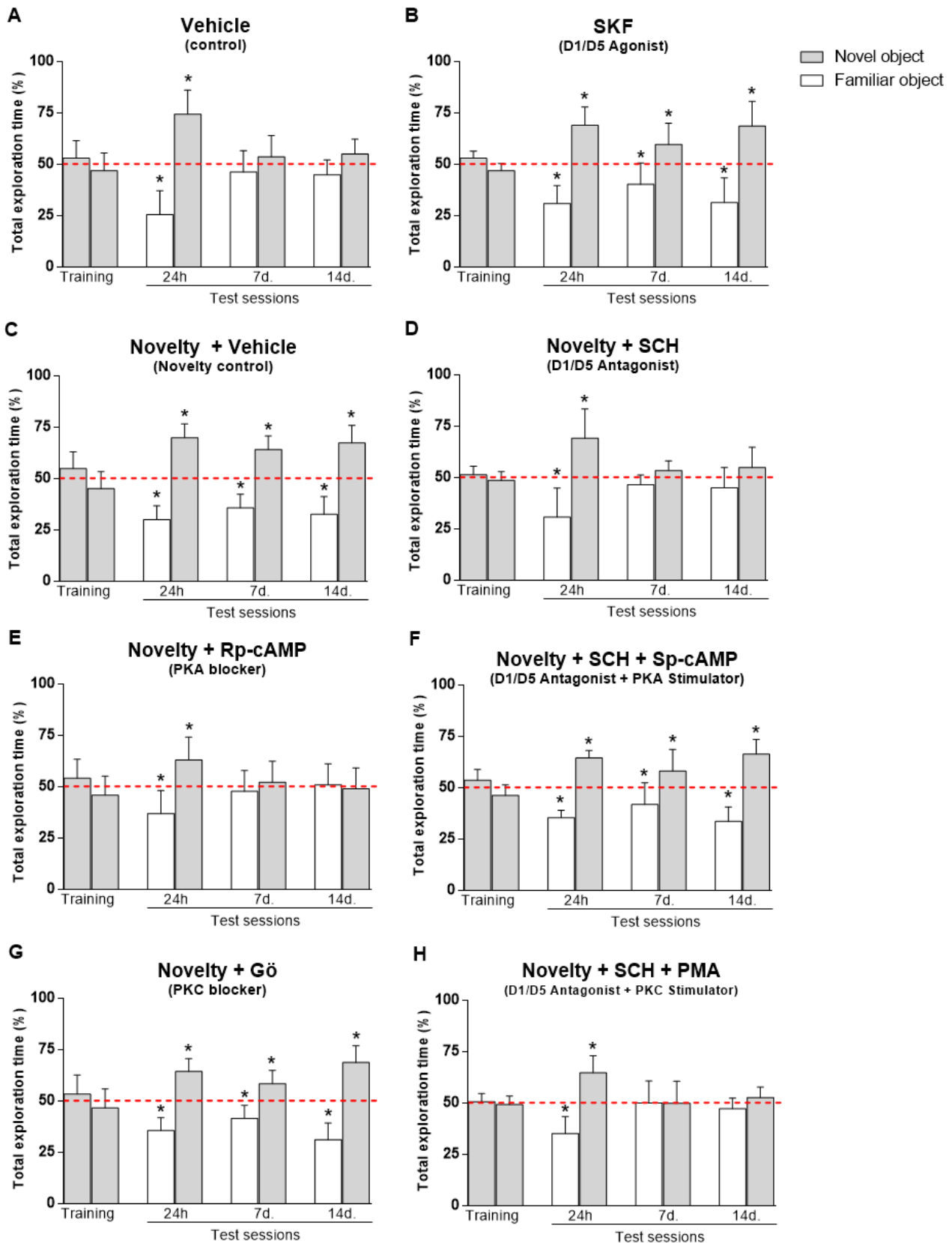
## **3 Results**

### **3.1. Object recognition task**

We verified the effect of exposure to novelty after learning on the consolidation and persistence of OR memory. In addition, we investigated whether the D1 and D5 receptors are required for the novelty effect. Rats were trained on an OR task, and immediately after, some of them received a bilateral intra-CA1 infusion of vehicle or SKF 38393, a D1/D5 agonist; others were exposed for 5 min to a novel environment (novelty) and subsequently received vehicle or drug(s) to assess the contribution of D1-family dopaminergic receptors to the novelty effect. Recognition memory was evaluated in test sessions carried out at 24 h and 7, and 14 days later.

On the training day (learning session), all animals from different groups explored each novel object for a similar percentage of the total exploration time, i.e., approximately 50%, which was expected because both objects were novel (Fig. 2A–H;  $t_{(8)} = 1.055$ ;  $P = 0.3223$ , control;  $t_{(6)} = 2.319$ ;  $P = 0.0596$ , SKF 38393;  $t_{(9)} = 1.866$ ;  $P = 0.0949$ , novelty;  $t_{(9)} = 1.016$ ;  $P = 0.3361$ , novelty + SCH 23390;  $t_{(9)} = 1.416$ ;  $P = 0.1904$ , novelty + Rp-cAMP;  $t_{(8)} = 2.198$ ;  $P = 0.0591$ , novelty + SCH 23390 + Sp-cAMP;  $t_{(9)} = 1.147$ ;  $P = 0.2809$ , novelty + Gö 6976;  $t_{(8)} = 0.5009$ ;  $P = 0.6299$ , novelty + SCH 23390 + PMA). In addition, LTM consolidation 24 h after the learning session was observed in all groups, and animals spent significantly more than 50% of the total exploration time exploring the novel object (Fig. 2A–H;  $t_{(8)} = 6.290$ ;  $P = 0.0002$ , control;  $t_{(8)} = 6.499$ ;  $P = 0.0002$ , SKF 38393;  $t_{(9)} = 9.337$ ;  $P = < 0.0001$ , novelty;  $t_{(9)} = 4.303$ ;  $P = 0.0020$ , novelty + SCH 23390;  $t_{(9)} = 3.696$ ;  $P = 0.0050$ , novelty + Rp-cAMP;  $t_{(8)} = 12.11$ ;  $P = < 0.0001$ , novelty + SCH 23390 + Sp-cAMP;  $t_{(9)} = 7.292$ ;  $P = < 0.0001$ , novelty + Gö 6976;  $t_{(8)} = 5.401$ ;  $P = 0.0006$ , novelty + SCH 23390 + PMA).





**Fig. 2. Effects of novelty exposure and pharmacological dopamine modulations in the CA1 region of the hippocampus on OR task.** Rats were implanted with infusion cannulae in the CA1 hippocampus region. On the training day, they were exposed to two different objects for 5 min and, immediately after, some of them received vehicle (A) or SKF 38393 (B); animals from novelty groups (C-H) were exposed to a novel environment for 5 min and after this received vehicle or drug(s) infusion. On test days (24 hours, 7 and 14

days later) the animals were exposed to a familiar and a novel object for free exploration for 5 min. Data (mean  $\pm$  SD) are presented as the percentage of total exploration time; \* $P \leq 0.05$  in one-sample Student's *t*-test, with theoretical mean = 50%.  $n = 8\text{--}10/\text{group}$ .

Control group rats were unable to recognize the novel object on days 7 and 14 (Fig. 2A;  $t_{(7)} = 1.005$ ;  $P = 0.3485$  in 7 d test;  $t_{(8)} = 2.079$ ;  $P = 0.0712$  in 14 d test). These results indicate physiological forgetfulness. On the other hand, stimulation of D1/D5 dopaminergic receptors in the CA1 region of the hippocampus using SKF 38393 after the training session was able to improve memory persistence for at least 14 days (Fig. 2B;  $t_{(8)} = 2.816$ ;  $P = 0.0226$  on day 7;  $t_{(8)} = 4.623$ ;  $P = 0.0017$  on day 14). Furthermore, exposure to a novel environment after learning was able to improve memory persistence for up to 14 days (Fig. 2C;  $t_{(9)} = 6.847$ ;  $P = < 0.0001$  on day 7;  $t_{(9)} = 6.371$ ;  $P = 0.0001$  on day 14).

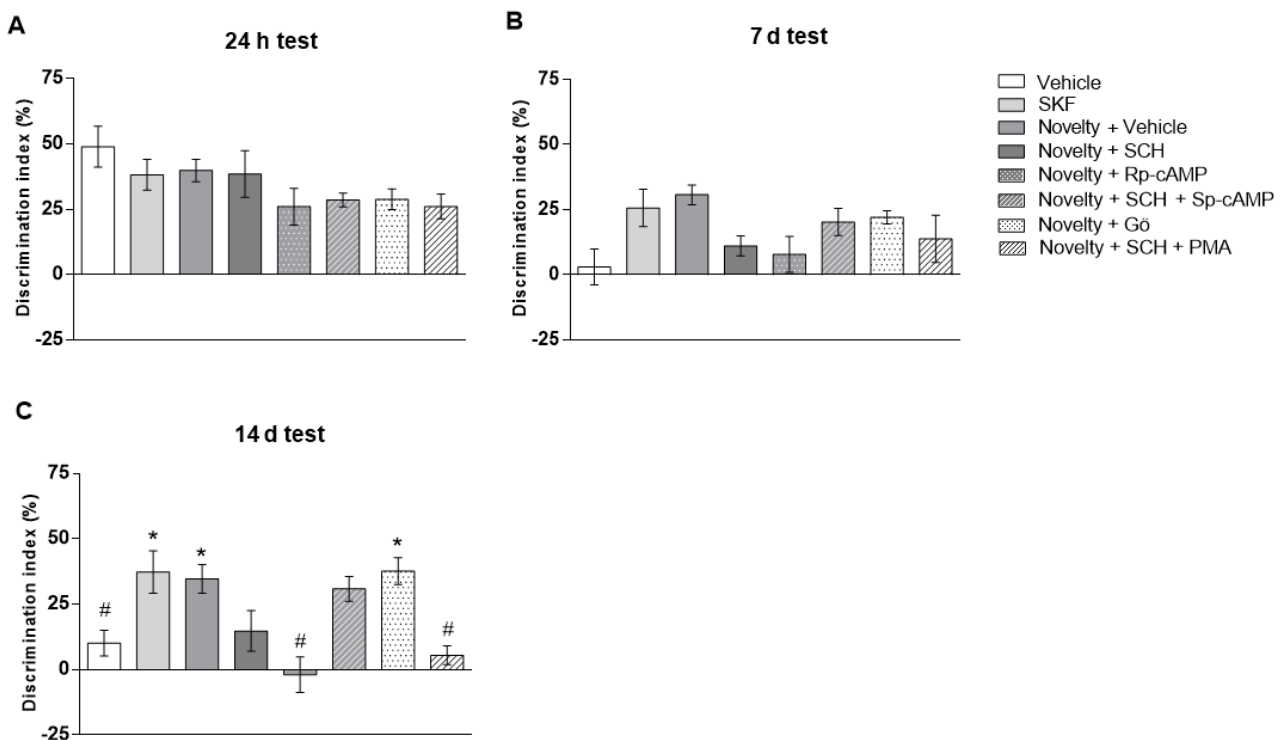
To evaluate whether the modulation of OR memory persistence by novelty depends on hippocampal D1/D5 receptors, the rats were trained on the OR task, exposed to the novelty, and then immediately received bilateral intrahippocampal infusion of SCH 23390, a D1 family (D1/D5) receptor antagonist. The rats were able to remember the familiar object at 24 h but were not able to remember the familiar object in the memory persistence tests. The animals spent approximately the same time exploring each object on days 7 and 14 (Fig. 2D;  $t_{(7)} = 2.049$ ;  $P = 0.0796$  on day 7;  $t_{(7)} = 1.436$ ;  $P = 0.1942$  on day 14). Thus, the effect of novelty on OR memory persistence depends on D1 family dopamine receptors.

Next, we investigated whether D1, D5 or both receptors are involved in the effect of novelty on OR memory. To this end, we studied the involvement of PKA and PKC in the novelty effect since PKA mediates the effects D1 receptors and PKC mediates the effects of D5 receptors. After the OR training session and novelty exposure, some animals received a PKA inhibitor (by Rp-cAMP). We observed that Rp-cAMP blocked the effect of novelty on OR persistence, with animals spending approximately 50% of the total exploration time exploring the familiar and novel object after day 7 (Fig. 2E;  $t_{(8)} = 0.6662$ ;  $P = 0.2148$  on day 7;  $t_{(8)} = 0.2943$ ;  $P = 0.7761$  on day 14). To confirm the role of PKA and D1 receptors, we used SCH 23390 and a PKA stimulator, Sp-cAMP. Stimulation of PKA reversed the previously observed effects of SCH 23390. The animals explored the novel object for more than 50% of the total exploration time for up to 14 days (Fig. 2F;  $t_{(9)} = 2.312$ ;  $P = 0.0495$  on day 7 test;  $t_{(8)} = 6.885$ ;  $P = 0.0001$  on day 14).

We performed a similar protocol to study the involvement of PKC. After exposure to novelty, the animals received Gö 6976, a PKC inhibitor. Inhibition of PKC did not impair

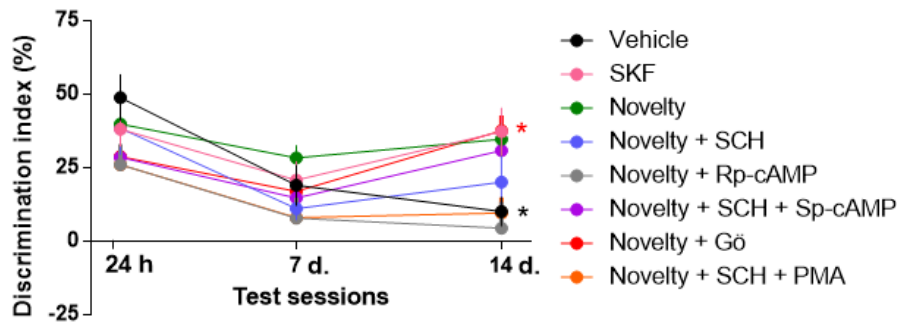
OR memory persistence, and the animals remembered the novel object for up to 14 days (Fig. 2G;  $t_{(8)} = 4.144$ ;  $P = 0.0025$  on day 7;  $t_{(9)} = 7.351$ ;  $P = < 0.0001$  on day 14). Similarly, the activation of PKC by PMA was not able to reverse the effect of D1/D5 receptor blockade by SCH 23390 after novelty exposure; the animals were unable to distinguish the novel object from the familiar object from day 7 after training (Fig. 2H;  $t_{(6)} = 0.0135$ ;  $P = 0.9897$  on day 7;  $t_{(7)} = 1.513$ ;  $P = 0.2031$  on day 14).

Additionally, we evaluated the OR DI with the test day as the within-subject factor and the group as the between-subject factor. Effects of group ( $F_{(3, 272)} = 34.49$ ;  $P < 0.0001$ ) and test day ( $F_{(7, 272)} = 4.861$ ;  $P < 0.0001$ ) but no interaction effect ( $F_{(21, 272)} = 1.286$ ;  $P = 0.1830$ ) were found. A difference between the control group and novelty group was found on day 14; the SKF 38393, novelty and novelty + Gö 6976 groups presented a higher DI than the control group (Fig. 3C;  $P = 0.0220$ ;  $P = 0.0397$ ;  $P = 0.0154$ , respectively). On this day, the novelty + Rp-cAMP and novelty + SCH 23390 + PMA groups showed lower DI than the novelty group (Fig. 3C;  $P = 0.0045$ ;  $P = 0.0348$ , respectively).



**Fig. 3. Effect of novelty exposure and pharmacological dopamine modulations in the CA1 region of the hippocampus on OR discrimination index.** Discrimination index for the novel object in the 24 h (A), 7 (B), and 14 (C) days tests was calculated. Data (mean  $\pm$  SD) are presented as the percentage of the discrimination index. Differences between the groups ( $P < 0.0001$ ) and between the test days ( $P < 0.0001$ ), without interaction ( $P = 0.1830$ ), were found in the mixed variable ANOVA. \* $P \leq 0.05$  vs. Control group and # $P \leq 0.05$  vs. Novelty group in Dunnett's multiple comparison post hoc test.  $n = 8 - 10$ /group.

Differences in the OR DI between days were found in the control group (Fig. 4;  $F_{(3,9)} = 10.89$ ;  $P = 0.0029$ ). There were post hoc differences between 24 h and 7 days ( $P = 0.0286$ ) and between 24 h and 14 days ( $P = 0.0066$ ). Similar outcomes were found for the novelty + Gö 6976 group (Fig. 4;  $F_{(3,10)} = 6.200$ ;  $P = 0.0456$ ), there were post hoc differences between 7 and 14 days ( $P = 0.0418$ ). DI did not differ between the days for the other groups (Fig. 4;  $P > 0.05$ ).



**Fig. 4. Effect of novelty exposure and pharmacological dopamine modulations in the CA1 region of the hippocampus on OR discrimination index along testing days.** Discrimination index for the novel object along all test days was calculated. Each line represents a group. Data (mean  $\pm$  SD) are presented as the percentage of the discrimination index. \* $P < 0.05$  in Friedman repeated measure test.  $n = 8-10$ /group.

### 3.2. Control behavioral parameter evaluation

No differences between the groups in exploratory and locomotor activities or anxiety were observed on any testing day (Table 1).

**Table 1.** OR total exploration time, exploratory and locomotor activities and anxiety. Data (mean  $\pm$  SD) are expressed in the total exploration time in seconds on object recognition (OR) task, the number of crossings and rearings on open field (OF), and the total time spent in seconds in open arms of an elevated plus maze (EPM). There were no differences between the groups (one-way ANOVA). n = 8–10/group.

	Control	SKF 38393	Novelty +					One-way ANOVA	
			Vehicle	SCH 23390	Rp-cAMP	SCH 23390 + Sp-cAMP	Gö 6976		SCH 23390 + PMA
<b>OR exploration time (s)</b>									
Training	69.67 $\pm$ 19.89	67.00 $\pm$ 16.24	70.60 $\pm$ 27.48	65.30 $\pm$ 22.61	72.90 $\pm$ 17.89	85.44 $\pm$ 24.34	81.40 $\pm$ 27.52	65.56 $\pm$ 16.13	0.3969
24h	61.67 $\pm$ 19.58	68.56 $\pm$ 35.14	60.80 $\pm$ 39.93	54.40 $\pm$ 27.09	58.10 $\pm$ 26.63	63.11 $\pm$ 18.35	68.50 $\pm$ 35.66	56.11 $\pm$ 32.77	0.9579
7d.	63.89 $\pm$ 24.61	58.89 $\pm$ 9.14	60.00 $\pm$ 29.67	63.70 $\pm$ 27.85	59.60 $\pm$ 21.66	65.11 $\pm$ 17.79	65.90 $\pm$ 19.95	77.44 $\pm$ 17.04	0.7017
14d.	56.56 $\pm$ 22.33	58.11 $\pm$ 20.03	65.80 $\pm$ 29.84	65.00 $\pm$ 26.98	55.00 $\pm$ 19.30	55.33 $\pm$ 20.30	55.90 $\pm$ 16.72	65.56 $\pm$ 33.15	0.9029
<b>OF</b>									
<b>Crossings (n)</b>									
24h	74.44 $\pm$ 32.14	77.33 $\pm$ 24.06	68.70 $\pm$ 24.56	71.10 $\pm$ 26.07	85.00 $\pm$ 45.77	70.00 $\pm$ 33.39	88.30 $\pm$ 20.18	45.38 $\pm$ 14.61	0.1168
7d.	79.67 $\pm$ 22.96	94.00 $\pm$ 21.03	68.00 $\pm$ 27.44	79.00 $\pm$ 9.90	92.80 $\pm$ 13.63	86.11 $\pm$ 26.59	97.30 $\pm$ 28.25	69.22 $\pm$ 33.93	0.0750
14d.	79.00 $\pm$ 30.94	67.33 $\pm$ 25.24	68.00 $\pm$ 37.77	60.30 $\pm$ 27.93	91.60 $\pm$ 26.12	78.22 $\pm$ 20.48	86.40 $\pm$ 17.06	99.78 $\pm$ 26.55	0.0668
<b>Rearings (n)</b>									
24h	23.22 $\pm$ 12.37	23.89 $\pm$ 8.19	22.90 $\pm$ 7.89	21.00 $\pm$ 10.06	22.90 $\pm$ 14.75	19.78 $\pm$ 11.96	27.30 $\pm$ 7.36	11.44 $\pm$ 7.25	0.0889
7d.	28.78 $\pm$ 14.94	33.78 $\pm$ 9.38	26.30 $\pm$ 10.66	25.70 $\pm$ 12.37	30.40 $\pm$ 8.26	27.33 $\pm$ 10.04	29.10 $\pm$ 6.98	25.56 $\pm$ 14.26	0.7640
14d.	31.44 $\pm$ 15.00	22.33 $\pm$ 8.12	26.00 $\pm$ 16.58	23.30 $\pm$ 14.00	35.60 $\pm$ 13.57	27.44 $\pm$ 7.78	32.70 $\pm$ 10.37	33.33 $\pm$ 9.93	0.1772
<b>EPM</b>									
<b>Entries in open arms (n)</b>									
24h	6.22 $\pm$ 3.15	7.33 $\pm$ 2.06	8.30 $\pm$ 2.71	6.90 $\pm$ 2.92	8.00 $\pm$ 2.16	7.22 $\pm$ 3.73	8.30 $\pm$ 2.91	6.00 $\pm$ 2.18	0.4619
7d.	7.33 $\pm$ 2.40	9.00 $\pm$ 2.82	6.80 $\pm$ 2.20	8.60 $\pm$ 2.72	9.43 $\pm$ 1.81	9.56 $\pm$ 1.42	9.60 $\pm$ 1.65	9.56 $\pm$ 1.81	0.5560
14d.	6.89 $\pm$ 2.15	6.67 $\pm$ 2.06	8.11 $\pm$ 1.76	6.56 $\pm$ 1.74	8.62 $\pm$ 1.30	7.67 $\pm$ 2.24	8.10 $\pm$ 2.73	9.00 $\pm$ 2.34	0.0547
<b>Time in open arms (s)</b>									
24h	185.7 $\pm$ 41.74	187.9 $\pm$ 36.60	187.1 $\pm$ 34.20	193.8 $\pm$ 26.32	205.7 $\pm$ 25.04	185.1 $\pm$ 41.67	202.2 $\pm$ 22.02	162.1 $\pm$ 42.13	0.3271
7d.	156.6 $\pm$ 49.90	153.2 $\pm$ 50.61	122.8 $\pm$ 47.58	153.8 $\pm$ 47.89	171.1 $\pm$ 24.31	184.2 $\pm$ 25.42	172.4 $\pm$ 25.31	171.4 $\pm$ 25.29	0.0503
14d.	138.6 $\pm$ 65.75	139.7 $\pm$ 44.70	162.6 $\pm$ 50.94	132.4 $\pm$ 54.63	182.4 $\pm$ 36.43	137.4 $\pm$ 38.40	147.9 $\pm$ 55.47	168.4 $\pm$ 54.41	0.2036

## 4 Discussion

Numerous studies have documented the involvement of BT in LTM formation (Ballarini et al., 2009; Chen et al., 2020; Moncada, 2017; Moncada et al., 2011) however, memory persistence was not investigated. In this study, we highlight that exposure to a novel environment after learning in the OR task positively modulates memory. Importantly, we demonstrate that this process promotes persistent LTM and occurs by D1 receptor activation and PKA signaling

Our main data show that animals exposed to novelty or dopaminergic agonist were able to identify the new object for 14 days after learning. Memory consolidation and persistence in the OR task is indicated by exploration of a novel object for more than 50% of the total exploration time in test sessions (Furini et al., 2014; Neves et al., 2020; Nomoto & Inokuchi, 2018; Vargas et al., 2017). Although the protocol used here is sufficient to allow the animals to remember a previously explored object 24 h later, after this time, a natural forgetfulness process occurs (Furini et al., 2014; Nomoto et al., 2016; Vargas et al., 2020). Therefore, our study reveals that novelty improves memory persistence in the OR task and confirms the role of dopamine in memory persistence because on day 14, there were differences in the DI between the groups, with the novelty and SKF groups presenting a higher DI than the other groups.

The STC hypothesis proposes that novelty acts on a weak stimulus that initially activates only glutamatergic input, which sets the synaptic tag in the potentiated spine and induces transitory early long-term potentiation (e-LTP) (Li et al., 2003). Spatial novelty facilitates the induction of persistent LTP in CA1, which is known as late LTP (l-LTP) (Li et al., 2003). Accordingly, novelty acts as a strong stimulus that promotes persistent increases in glutamatergic transmission and induces the synthesis of PRPs, which may be captured by previously marked synapses, thus stabilizing synaptic changes (Moncada & Viola, 2007; Nomoto et al., 2016).

Here, we suggest that the OR learning trace is improved by a strong stimulus of novelty according to the STC hypothesis. Evidence shows that this phenomenon only occurs between two independent pathways converging on the same population of neurons in the same brain region (Ballarini et al., 2009; Nomoto et al., 2016).

Considering that both spatial novel exploration and the OR task are hippocampus-dependent, they are suitable for evaluating the BT hypothesis (Nomoto et al., 2016). Encoding in the OR task and exploring a novel context separately activate common neuronal populations in CA1; therefore, a subpopulation of neurons activated during OR training could be more excitable and easily reactivated during novelty exploration (Nomoto et al., 2016). This idea supports the induction of PRPs by novelty could be recruited to synapses involved in the OR memory trace, which then helps the stabilization of this mnemonic trace (Moncada et al., 2007; Nomoto et al., 2016).

A time window of 30-60 min between the novelty and memory encoding is commonly used (Ballarini et al., 2009; Menezes et al., 2015; Moncada & Viola, 2007). Here, we hypothesize that novelty could improve memory persistence immediately after OR learning. This hypothesis is based on the effects of dopaminergic stimulation in the same time window. In previous studies performed by our research group, we demonstrated that infusion of dopamine (Vargas et al., 2020) or SKF 38393 (Neves et al., 2020), a D1/D5 agonist, into the CA1 region of the dorsal hippocampus after training promotes OR memory persistence for 14 to 21 days. Nevertheless, brief exposure to a novel environment increases dopamine levels in the hippocampus (Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015). This evidence suggests that novelty would have similar effects as pharmacological dopaminergic stimulation.

In fact, we observed that the time used between memory encoding and novelty exposition was enough to modulate memory. Moreover, we demonstrate that the novelty effect depends only on the activation of D1 and PKA signaling since PKA inhibition impaired the effect of novelty on memory persistence and PKA stimulation promoted the effect of novelty even in the presence of D1/D5 antagonist infusion. On the other hand, the inhibition of D5 receptors' second messenger (PKC) (or its stimulation after D1/D5 antagonist infusion) did not have the same effects. According to previous findings, the pharmacological stimulation of D1/D5 hippocampal receptors by SKF 38393 promotes memory persistence (Neves et al., 2020). It has already been observed that only D1 dopamine receptors, but not D5 receptors, are important for e-LTP and memory modulation (Granado et al., 2008; Menezes et al., 2015). Recently, we presented evidence that supports this finding in a study evaluating the requisition of D1/D5 receptors and PKA and PKC pathways in the absence of novelty in the OR task (Neves et al., 2020). D1/D5 blockade with SCH23390 after learning

impaired memory consolidation in the animals 24 h later. After blocking D1/D5, PKA stimulation (but not PKC stimulation) promoted memory consolidation and persistence for up to 14 days. In comparison, we observed that the novelty associated with D1/D5 inhibition did not cause impairment at 24 h since all animals were able to consolidate memory. On the other hand, in the presence of SCH23390, novelty does not have any effects on memory persistence.

In summary, we demonstrated that exposure to novelty immediately after learning improves OR memory persistence. This finding is important since novelty is a nonpharmacological tool that can be useful in clinical practice. As novelty can help improve the memory of experimental animals (Moncada et al., 2015; Wang, 2018) and healthy people (Ballarini et al., 2013; Ramirez Butavand et al., 2020), its effects on individuals with cognitive deficits should be evaluated in future studies. The main finding of our study, which is being reported for the first time, is that the effect of novelty on OR memory persistence depends only on D1 dopamine receptors and PKA signaling. Our findings provide insights into the neurochemical mechanisms involved in the novelty effect. In addition, it paves the way for novel studies of pharmacological therapies that act on specific signaling pathways to improve memory.

### **Authors contributions**

Conceived and designed the experiments: K.R.L., P.B.M.C.; Performed the experiments: K.R.L., A.C.S.R., S.S.P., S.S.S., N.M.S.; Contributed to data analysis and interpretation writing and reviewing of the manuscript: K.R.L., P.B.M.C.; Approved the final manuscript version: K.R.L., A.C.S.R., S.S.P., S.S.S., N.M.S., P.B.M.C.

### **Acknowledgments**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by research grants from the Federal University of Rio Grande do Sul, Federal University of Pampa, Brazilian National Council of Research of (CNPq/Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa



do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/RS/Brazil). K.R.L. is supported by CAPES/Brazil. P.B.M.C. is supported by CNPq/ Brazil, and Unipampa/Brazil.

## References

- Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M. C., Alen, N., & Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14599–14604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907078106>
- Ballarini, Fabricio, Martínez, M. C., Díaz Perez, M., Moncada, D., & Viola, H. (2013). Memory in Elementary School Children Is Improved by an Unrelated Novel Experience. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066875>
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2010). Persistence of long-term memory storage: New insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotoxicity Research*, 18(3–4), 377–385. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9155-5>
- Chen, N., Tsai, T. C., & Hsu, K. Sen. (2020). Exposure to Novelty Promotes Long-Term Contextual Fear Memory Formation in Juvenile Mice: Evidence for a Behavioral Tagging. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02005-1>
- Ennaceur, & Delacour. (1998). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 31, 47–59.
- Feyissa, D. D., Sialana, F. J., Keimpema, E., Kalaba, P., Paunkov, A., Engidawork, E., Höger, H., Lubec, G., & Korz, V. (2019). Dopamine type 1- and 2-like signaling in the modulation of spatial reference learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 362(October 2018), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.028>
- Frey, U., & Morris, R. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. In *Nature* (Vol. 385, pp. 533–536). <https://www.nature.com/articles/385533a0.pdf>
- Furini, C. R. G., Myskiw, J. C., Schmidt, B. E., Marcondes, L. A., & Izquierdo, I. (2014). D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behavioural Brain Research*, 271, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.027>
- Granado, N., Ortiz, O., Suárez, L. M., Martín, E. D., Ceña, V., Solís, J. M., & Moratalla, R. (2008). D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-induced arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cerebral Cortex*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm026>

- Greiner, E. M., & Petrovich, G. D. (2020). The effects of novelty on food consumption in male and female rats. *Physiology and Behavior*, 223(February), 112970. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112970>
- Gros, A., & Wang, S. H. (2018). Behavioral tagging and capture: long-term memory decline in middle-aged rats. *Neurobiology of Aging*, 67, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.023>
- Hagena, H., & Manahan-Vaughan, D. (2016). Dopamine D1/D5, But not D2/D3, receptor dependency of synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses that is enabled by patterned afferent stimulation, or spatial learning. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00031>
- Hall, C. (1934). Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. *J Comp Psychol*, 27, 89–108.
- Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. University of California, Publications in Psychology, 6, 1–12.
- Katche, C., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2013). Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106(July), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.018>
- Li, S., Cullen, W. K., Anwyl, R., & Rowan, M. J. (2003). Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nature Neuroscience*, 6(5), 526–531. <https://doi.org/10.1038/nn1049>
- Lima, K. R., Vargas, L. da S. de, Ramborger, B., Roehrs, R., Sevenster, D., Izquierdo, I., D'Hooge, R., & Mello-Carpes, P. B. (2019). Noradrenergic and dopaminergic involvement in novelty modulation of aversive memory generalization of adult rats. *Behavioural Brain Research*, 371(March), 111991. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111991>
- Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, 46(5), 703–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.002>
- Medina, J. H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research*, 192(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.006>
- Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., De Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2015). Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13), E1652–E1658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502295112>

- Moncada, D. (2017). Evidence of VTA and LC control of protein synthesis required for the behavioral tagging process. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.003>
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12931–12936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104495108>
- Moncada, D., Ballarini, F., & Viola, H. (2015). Behavioral Tagging: A Translation of the Synaptic Tagging and Capture Hypothesis. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/650780>
- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: Evidence for a behavioral tagging. *Journal of Neuroscience*, 27(28), 7476–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007>
- Neves, B. H. S., Barbosa, G. P. D. R., Rosa, A. C. de S., Picua, S. S., Gomes, G. M., Sosa, P. M., & Mello-Carpes, P. B. (2020). On the role of the dopaminergic system in the memory deficits induced by maternal deprivation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173(July). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107272>
- Nomoto, M., & Inokuchi, K. (2018). Behavioral, cellular, and synaptic tagging frameworks. *Neurobiology of Learning and Memory*, 153(March), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.03.010>
- Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Yokose, J., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A. M., Kato, F., & Inokuchi, K. (2016). Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioural tagging. *Nature Communications*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms12319>
- O'Carroll, C. M., Martin, S. J., Sandin, J., Frenguelli, B., & Morris, R. G. M. (2006). Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learning and Memory*, 13(6), 760–769. <https://doi.org/10.1101/lm.321006>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 7th Editio, 1–472.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci.*, 147–167.
- Pezze, M. A., Marshall, H. J., Fone, K. C. F., & Cassaday, H. J. (2015). Dopamine D1 receptor stimulation modulates the formation and retrieval of novel object recognition memory: Role of the prelimbic cortex. *European Neuropsychopharmacology*, 25(11), 2145–2156. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.07.018>

- Ramirez Butavand, D., Hirsch, I., Tomaiuolo, M., Moncada, D., Viola, H., & Ballarini, F. (2020). Novelty Improves the Formation and Persistence of Memory in a Naturalistic School Scenario. *Frontiers in Psychology*, 11(January). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00048>
- Roggenhofer, E., Fidzinski, P., Shor, O., & Behr, J. (2013). Reduced Threshold for Induction of LTP by Activation of Dopamine D1/D5 Receptors at Hippocampal CA1-Subiculum Synapses. *PLoS ONE*, 8(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062520>
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, 325(5943), 1017–1020. <https://doi.org/10.1126/science.1172545>
- Santollo, J., Myers, K. E., Rainer, I. L., & Edwards, A. A. (2019). Gonadal hormones in female rats protect against dehydration-induced memory impairments in the novel object recognition paradigm. *Hormones and Behavior*, 114(July), 104547. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.06.011>
- Sutcliffe, J. S., Marshall, K. M., & Neill, J. C. (2007). Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research*, 177(1), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.029>
- Takeuchi, T., Duzskiewicz, A. J., Sonneborn, A., Spooner, P. A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C. C., Fernández, G., Deisseroth, K., Greene, R. W., & Morris, R. G. M. (2016). Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature*, 537(7620), 357–362. <https://doi.org/10.1038/nature19325>
- Tomaiuolo, M., Katche, C., Viola, H., & Medina, J. H. (2015). Evidence of Maintenance Tagging in the Hippocampus for the Persistence of Long-Lasting Memory Storage. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/603672>
- Undieh, A. S. (2010). Pharmacology of signaling induced by dopamine D1-like receptor activation. *Pharmacology & Therapeutics*, 128(1), 37–60. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.05.003>
- Vargas, L. da S. de, Lima, K. R., Ramborger, B. P., Roehrs, R., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2020). Catecholaminergic hippocampal activation is necessary for object recognition memory persistence induced by one-single physical exercise session. *Behavioural Brain Research*, 379(July 2019), 112356. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112356>
- Vargas, L. da S. de, Neves, B. H. S. das, Roehrs, R., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. (2017). One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 329(March), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.050>

- Wang, S. H. (2018). Novelty enhances memory persistence and remediates propranolol-induced deficit via reconsolidation. *Neuropharmacology*, 141, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.015>
- Wang, S., Liu, S., Wang, Q., Sun, Y., Yao, L., Li, D., & Meng, W. (2020). Dopamine Modulates Excitatory Synaptic Transmission by Activating Presynaptic D1-like Dopamine Receptors in the RA Projection Neurons of Zebra Finches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00126>

## MANUSCRITO CIENTÍFICO II

Submetido à revista *Brain Research*

### ONE SINGLE PHYSICAL EXERCISE SESSION IMPROVES MEMORY PERSISTENCE BY HIPPOCAMPAL ACTIVATION OF D1 DOPAMINE RECEPTORS AND PKA SIGNALING IN RATS

Karine Ramires Lima<sup>1</sup>, Ana Carolina de Souza da Rosa<sup>1</sup>, Steffanie Severo Picua<sup>1</sup>, Shara Souza e Silva<sup>1</sup>, Náthaly Marks Soares<sup>1</sup>, Pâmela Billig Mello-Carpes<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Physiology Research Group, Stress, Memory and Behavior Lab, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, RS, Brazil

\* Corresponding author

Stress, Memory and Behavior Lab, Federal University of Pampa

BR 472 km 592 - Po box 118 - ZIP 97500-970, Uruguaiiana, RS, Brazil

E-mail: [pamelacarpes@unipampa.edu.br](mailto:pamelacarpes@unipampa.edu.br)

#### Highlights

- One single physical exercise session modulates object recognition learning.
- D1-like dopaminergic receptors might be involved in exercise's effects on memory.
- PKA signaling, but not PKC, might be required for the exercise's effects on memory.

#### Abstract

Previously, we demonstrated that one single physical exercise session could positively modulate recognition memory persistence by D1/D5 activation. Here, we aim to investigate whether the effect of physical exercise on memory occurs due to the activation of both receptors, D1 and D5, or only one of them. Adult male Wistar

rats were habituated on a treadmill one week before experiments. After learning session in the object recognition task, some animals received intrahippocampal infusions of the vehicle or a D1/D5 agonist (SKF 38393, 12.5 µg/µL/side), whereas others performed a single session of physical exercise on a treadmill (30 min at an intensity of 60-70% of indirect VO<sub>2</sub> max.). Immediately after physical exercise, some animals received intrahippocampal infusions of vehicle or D1/D5 antagonist (SCH 23390, 1 µg/µL/side). Signaling pathways of D1 and D5 receptors in the hippocampus were evaluated by pharmacological activation or inactivation of protein kinases A (PKA) and C (PKC), respectively. According to previous findings, D1/D5 agonist and a single physical exercise session after learning promoted memory persistence, and D1/D5 block impaired physical exercise effect. Importantly, here we demonstrated for the first time that PKA inhibition, but not PKC, impairs the effect of acute physical exercise on memory persistence. Besides, PKA stimulation can promote its effects on memory. Therefore, we provide evidence that corroborates the idea that D1-like dopaminergic receptors, by activation of the PKA pathway, are involved in the effects of acute physical exercise on memory.

**Keywords:** acute physical exercise; single bout exercise; dopaminergic system; long-term memory; treadmill running.

## 1 Introduction

Memories can last for hours (short-term memory, STM) or days, weeks, and even a lifetime (long-term memory, LTM) (Katche et al., 2013). Protein synthesis and regulation of several biochemical pathways are required to transform information previously acquired into an LTM trace stable and precise (Bekinschtein et al., 2010, 2008, 2007; Katche et al., 2013). Most studies measured the LTM 24 hours after learning to evaluate different tools and mechanisms that can improve memory consolidation; however, LTM persistence over time is not fully understood (Bekinschtein et al., 2007; Katche et al., 2013).

The positive influence of physical exercise on memory is a topic of continuous interest. Research using animal models has investigated mainly the effects of long-term physical exercise practice (i.e., regular physical exercise; performed during weeks to months) on hippocampal-dependent memories (Diederich et al., 2017;

Mello et al., 2009; Pietrelli et al., 2018). In general, physical exercise benefits memory through several mechanisms: enhancing neuronal excitability, acting on neurotransmitters upregulation, increasing neuronal excitability, enhancing dendritic spine growth, regulating brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression, among others (Loprinzi et al., 2017). The interest in investigating the effects of acute physical exercise (i.e., few sessions or a single bout physical exercise) on memory is growing in the literature (Basso and Suzuki, 2017). Acute exercise effects were investigated in humans (Cantrelle et al., 2020; Delancey et al., 2019; van Dongen et al., 2016) and rodents (Vargas et al., 2020, 2017). The evidence suggests that a single physical exercise session is sufficient to promote some cognitive improvement. However, the brain mechanisms by which a single physical exercise session acts are not well understood.

Physical exercise can increase dopamine and its metabolites in several brain regions, including the hippocampus, prefrontal cortex, striatum, midbrain, and pons-medulla (Meeusen et al., 2001; Meeusen and De Meirleir, 1995; Vargas et al., 2020). Accordingly, the increase of dopamine levels in the brain is related to memory persistence (O'Carroll et al., 2006; Rossato et al., 2009). We previously demonstrated that a single physical exercise session improves memory persistence by catecholaminergic mechanisms in object recognition (OR) task in a rodent model (Vargas et al., 2020, 2017). Initially, we reveal that this effect depends on hippocampal noradrenergic mechanisms (Vargas et al., 2017). In a more recent study, we showed the first evidence on the involvement of D1/D5 receptors in the effect of acute physical exercise on memory (Vargas et al., 2020).

Although acute physical exercise requires the activation of D1/D5 dopamine receptors for memory improvement (Vargas et al., 2020), it is unclear whether its effects occur by activating both D1 and D5 or only one of them. Considering that there are no selective agonist or antagonist drugs for D1 and D5 receptors, the pharmacological manipulation of their signaling pathways can provide further evidence on the involvement of the dopaminergic system in memory modulation (Furini et al., 2014; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020). While D1 uses adenylyl cyclase as a second messenger and modulates protein kinase A (PKA) activity, D5 uses phosphatidylinositol-3-kinase system and predominantly modulates protein kinase C (PKC) (Undieh, 2010). Therefore, here we investigate the individual role of

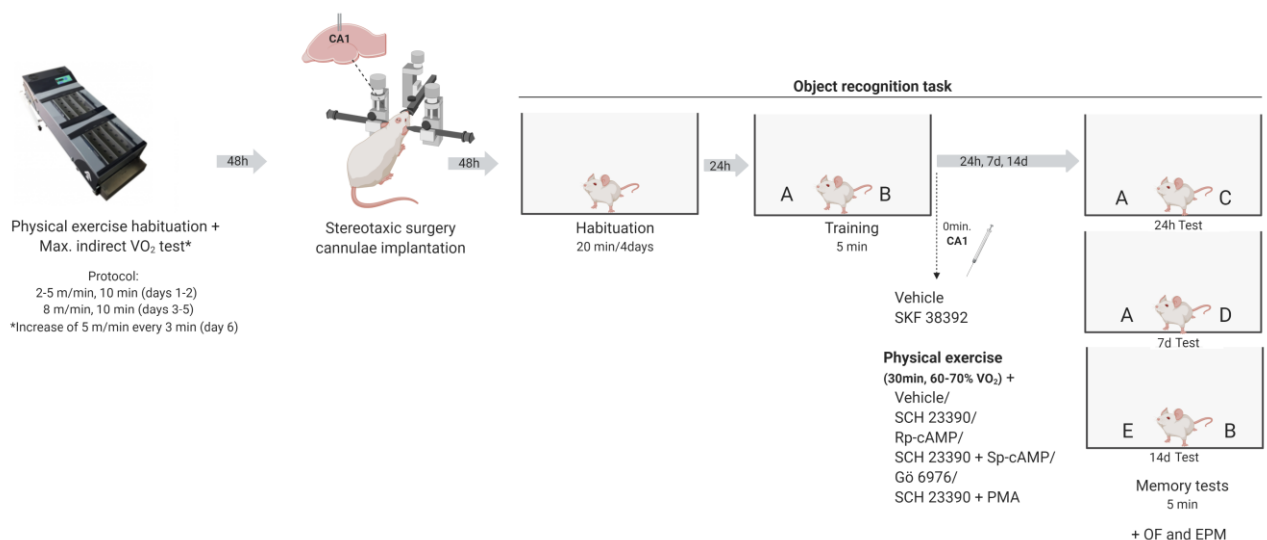


D1 and D5 dopamine receptors by their signaling pathways, PKA and PKC, in the modulatory effect of a single physical exercise session on recognition memory.

## 2 Results

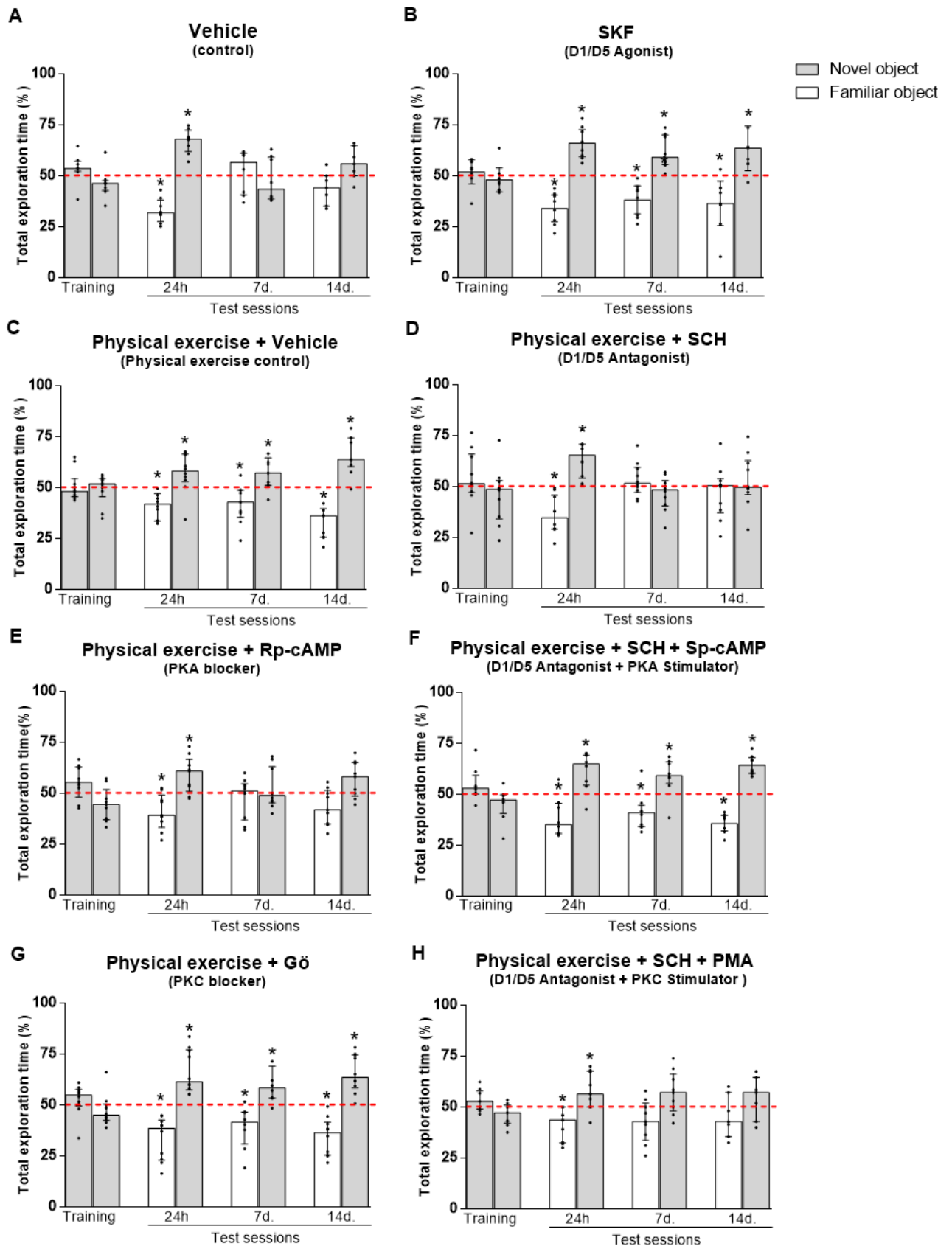
### 2.1 Effects of one single physical exercise session on recognition memory and D1 family dopamine receptors involvement

Here we evaluated the effects of one single physical exercise session performed after learning on recognition memory and the involvement of the D1 family dopamine receptors on these effects (a summary of the performed experiments is present in the Figure 1).



**Fig. 1 Experimental design.** First, animals in the physical exercise groups were submitted to treadmill habituation and indirect measurement of maximum indirect VO<sub>2</sub>. Behavioral experiments were conducted after stereotaxic surgery recovery. All animals were habituated and trained in OR task and submitted or not to one-single physical exercise session (for 30 min, at an intensity of 60-70% maximal indirect oxygen uptake - VO<sub>2</sub>), followed by CA1 intrahippocampal infusion of vehicle or drug(s), according to the experimental group. In the training session, the animals explored two novel objects for 5 min. In OR test sessions, the animals were exposed to a familiar object and a novel object for 5 min. The tests were performed 24 h, 7, and 14 days after training to evaluate memory consolidation and persistence. Each letter represents a different object. Open field (OF) and elevated plus maze (EPM) were conducted as control behavioral tests. The exact number of animals per group is: 8 to vehicle, SKF 38393, PE (physical exercise) + vehicle, and PE + SCH 23390 + PMA; 9 to PE + Rp-cAMP, and PE + Gö 6976; and 10 to PE + SCH 23390, and PE + PE + SCH 23390 + Sp-cAMP.

Animals were first submitted to the training session (i.e., learning session) being free to explore two novel and different objects for 5 min. As expected, in this session animals spent a similar time, about 50% of the total exploration time, for each object (Fig. 2A-H;  $W = \pm 22.00$ ,  $P = 0.1484$ , control;  $W = \pm 18.00$ ,  $P = 0.2500$ , SKF 38393;  $W = \pm 7.000$ ,  $P = 0.7344$ , physical exercise;  $W = \pm 19.00$ ,  $P = 0.3750$ , physical exercise + SCH 23390;  $W = \pm 25.00$ ,  $P = 0.1641$ , physical exercise + Rp-cAMP;  $W = \pm 18.00$ ,  $P = 0.1563$ , physical exercise + SCH 23390 + Sp-cAMP;  $W = \pm 23.00$ ,  $P = 0.2031$ , physical exercise + Gö 6976;  $W = \pm 20.00$ ,  $P = 0.1094$ , physical exercise + SCH 23390 + PMA).



**Fig. 2** Effects of one single physical exercise session and hippocampal dopaminergic modulations on recognition memory consolidation and persistence. Rats were implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the hippocampus. On the object recognition (OR) training day,

they were exposed to two different objects for 5 min and, immediately after, some of them received vehicle (A) or SKF 38393 (B). The animals of physical exercise groups (C-H) were exposed to a single physical exercise session for 30 min at an intensity of 60-70% of indirect  $\text{VO}_2$  max. After exercise, animals received vehicle or drug(s) infusion. On OR test days (24 h, 7, and 14 days later), the animals were exposed to a familiar and a novel object for free exploration for 5 min. Data (median with interquartile range) are presented as the percentage of total exploration time; \*  $P < 0.05$  in Wilcoxon test, with theoretical mean = 50%.  $n = 8-10/\text{group}$ .

On the 24 h LTM test, we consider memory consolidation when animals spent more than 50% of the total exploration time exploring the novel object. All groups consolidated the OR memory; they explored the novel object more than 50% of total exploration time (Fig. 2A–H;  $W = \pm 36.00$ ,  $P = 0.0078$ , control;  $W = \pm 36.00$ ,  $P = 0.0078$ , SKF 38393;  $W = \pm 41.00$ ,  $P = 0.0371$ , physical exercise;  $W = \pm 55.00$ ,  $P = 0.0020$ , physical exercise + SCH 23390;  $W = \pm 39.00$ ,  $P = 0.0195$ , physical exercise + Rp-cAMP;  $W = \pm 30.00$ ,  $P = 0.0391$ , physical exercise + SCH 23390 + Sp-cAMP;  $W = \pm 55.00$ ,  $P = 0.0020$ , physical exercise + Gö 6976;  $W = \pm 22.00$ ,  $P = 0.0781$ , physical exercise + SCH 23390 + PMA).

Memory persistence was evaluated in 7 and 14 days after the training session. Memory persistence was not observed in the control group: 7 days after training the animals were unable to recognize the familiar object (Fig 2A;  $W = \pm 10.00$ ,  $P = 0.5469$  in 7 d test;  $W = \pm 17.00$ ,  $P = 0.0938$  in 14 d test). Dopaminergic stimulation using a D1/D5 agonist, SKF 38393, promoted the persistence of OR memory for up to day 14 after the training, with animals spending more than 50% of the total exploration time for a novel object (Fig. 2B;  $W = \pm 36.00$ ,  $P = 0.0078$  in 7 d test;  $W = \pm 34.00$ ,  $P = 0.0156$  in 14 d test). A single physical exercise session after OR learning promoted OR memory persistence; the animals from the physical exercise group remember the familiar object and spent more than 50% of the total exploration time exploring the novel object for up to 14 days after the training (Fig. 2C;  $W = \pm 37.00$ ,  $P = 0.0273$  in 7 days test;  $W = \pm 53.00$ ,  $P = 0.0039$  in 14 days test).

To investigate whether the effects of physical exercise on memory persistence depend on the D1 family dopaminergic receptors, immediately after the physical exercise, we infused a D1/D5 receptor antagonist (SCH 23390) into the CA1 region of the animal's hippocampus. The non-selective blocking of D1/D5 receptors avoided the effects of physical exercise on memory persistence. The animals explored

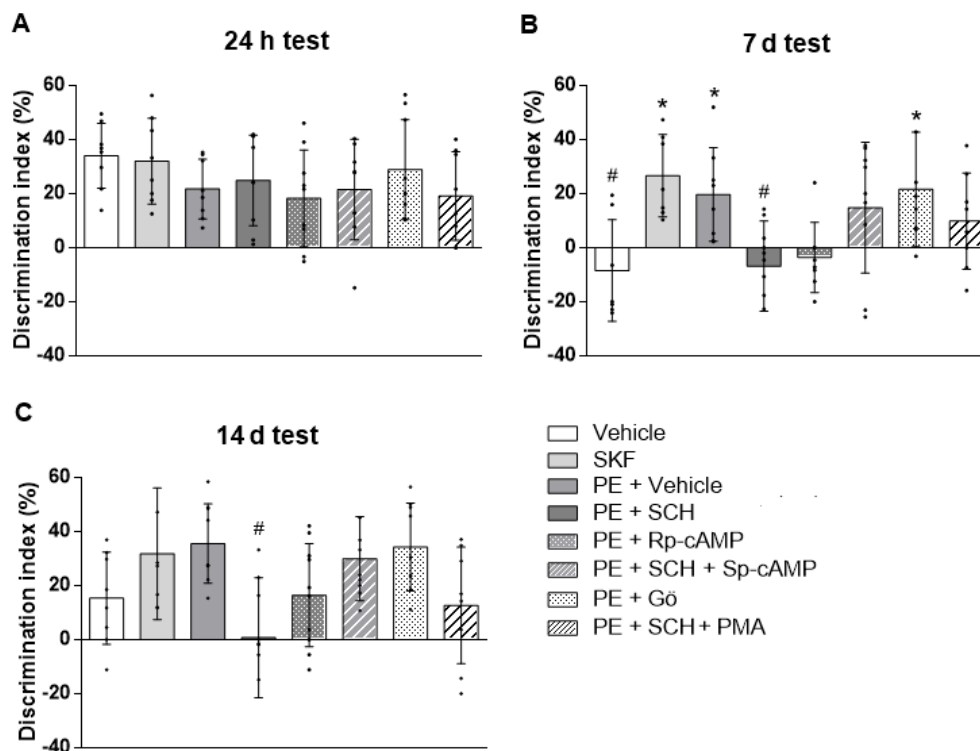
similarly both objects (familiar and novel) from the 7th test day (Fig. 2D;  $W = \pm 19.00$ ,  $P = 0.3008$ , in 7 days test;  $W = \pm 9.000$ ,  $P = 0.6523$  in 14 days test).

Next, we investigated whether D1, D5, or both receptors are involved in the effects of acute physical exercise on memory. We investigated the involvement of PKA and PKC, activated by D1 and D5, respectively. To evaluate the PKA involvement, immediately after the physical exercise, rats received a PKA inhibitor (Rp-cAMP) by intra-hippocampal infusion. PKA block impaired the effect of physical exercise on memory persistence, and the animals explored about 50% of the total exploration time each object from the 7th test day (Fig. 2E;  $W = \pm 6.000$ ,  $P = 0.7422$  in 7 days test;  $W = \pm 26.00$ ,  $P = 0.0781$  in 14 days test). We also blocked both D1/D5 receptors (SCH 23390) and injected a PKA stimulator (Sp-cAMP). PKA stimulation reversed the effects of D1/D5 block, and the animals showed memory persistence for up to 14 days (Fig. 2F;  $W = \pm 26.00$ ,  $P = 0.0781$  in 7 days test;  $W = \pm 36.00$ ,  $P = 0.0078$  in 14 days test). These results indicate that dopaminergic activation and PKA signaling are necessary for modulatory effects of physical exercise on memory persistence.

On the other hand, we investigated whether hippocampal D5 dopamine receptors are necessary for the physical exercise effects on OR memory persistence by PKC signaling modulation. After the physical exercise session, animals were submitted to a PKC inhibitor's intrahippocampal infusion (Gö 6976). The inhibition of the PKC pathway did not impair the effects of physical exercise, which promoted OR memory persistence for 14 days after the training session (Fig. 2G;  $W = \pm 34.00$ ,  $P = 0.0156$  in 7 days test;  $W = \pm 55.00$ ,  $P = 0.0020$  in 14 days test). PKC stimulation (PMA) after the D1/D5 block (SCH 23390) impaired the effects of physical exercise on memory persistence. The animals did not present memory persistence from the 7th test day (Fig. 2H;  $W = \pm 24.00$ ,  $P = 0.1094$  in 7 days test;  $W = \pm 13.00$ ,  $P = 0.3281$ , in 14 days test). These results indicate that the dopaminergic activation of PKC signaling might not be essential for the effects of acute physical exercise on memory modulation.

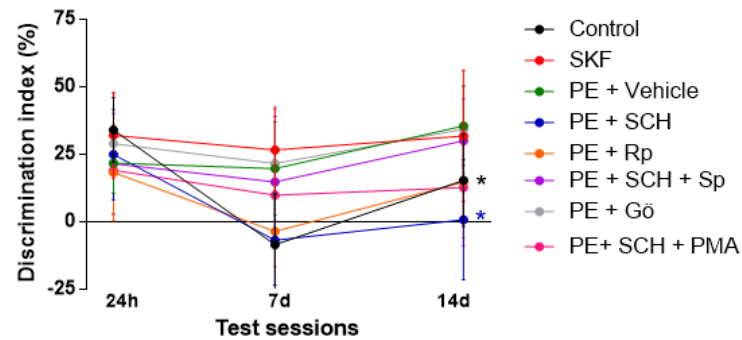
According to the 24 h discrimination index (DI) for a novel object, no difference were found between groups (Fig. 3A;  $F_{(7, 59)} = 1.118$ ,  $P = 0.3643$ ). On day 7, there were differences between the groups (Fig. 3B;  $F_{(7, 57)} = 0.4445$ ,  $P = 0.0005$ ). The SKF 38393, physical exercise and physical exercise + Gö 6976 groups showed a higher

DI than control group (Fig. 3B;  $P = 0.0046$ ,  $P = 0.0259$ ,  $P = 0.0152$ , respectively). The physical exercise + SCH 23390 group presented a lower DI than physical exercise group (Fig. 3B;  $P = 0.0209$ ). On day 14 we also observed differences between the groups (Fig. 3C;  $F_{(7, 61)} = 3.860$ ,  $P = 0.0015$ ). The physical exercise + SCH 23390 group showed a lower DI than physical exercise group (Fig. 3C;  $P = 0.0015$ ).



**Fig. 3 Comparison between the groups' discrimination index (DI) for the novel object.** DI for the novel object in the 24 h (A), 7 (B), and 14 (C) test days was calculated, and comparisons between groups were performed. Data (mean  $\pm$  SD) are presented as the percentage of the DI. Differences between the groups were found in 7 ( $P = 0.0005$ ) and 14 ( $P = 0.0015$ ) test day. \*  $P < 0.05$  vs. control group and #  $P < 0.05$  vs. physical exercise group in Dunnett's multiple comparison post-hoc test performed after ANOVA.  $n = 8-10$ /group.

DI decreased along the different days of testing in the control group (Fig. 4;  $F_{(2,11)} = 14.24$ ;  $P = 0.0010$ , 24 h vs. day 7 test:  $P = 0.0066$ , 24 h vs. day 14:  $P = 0.0220$ , and days 7 vs. 14:  $P = 0.0376$ ). Similar outcomes were found for the physical exercise + SCH 23390 group ( $F_{(2,17)} = 6.75$ ;  $P = 0.0066$ , 24 h vs. day 7 test:  $P = 0.0140$ ). These differences reveal a memory trace decline. DI did not differ between the days for the other groups (Fig. 4;  $P > 0.05$ ).



**Fig. 4 Evaluation of the discrimination index (DI) for the novel object of each group along testing days.** DI for the novel object was calculated, and comparisons between all test days were performed for each group. Each line represents a group. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of the DI. \*  $P < 0.05$  in RM one-way ANOVA test.  $n = 8-10$ /group.

## 2.2 Effects of the procedures on control behavioral parameters

There were no significant differences between groups regarding total object exploration time on all days of the OR task. Moreover, no procedure performed, such as physical exercise or drug infusions, affected the behavioral parameters. The data are available in Table 1.

**Table 1** None of the procedures performed in this study affected OR total exploration time, exploratory and locomotor activities, and anxiety. Data (mean  $\pm$  SD) are expressed as the total exploration time in seconds on OR task, the number of crossings and rearings in an open field (OF), and the total time spent in the open arms of the elevated plus-maze (EPM). There were no differences between the groups (one-way ANOVA). n = 8-10/group.

	Control	SKF 38393	Physical exercise +					Gö 6976	SCH 23390 + PMA	P-value
			Vehicle	SCH 23390	Rp-cAMP	SCH 23390 + Sp-cAMP				
<b>OR total exploration time (s)</b>										
<i>Training</i>	71.75 $\pm$ 31.92	65.00 $\pm$ 23.92	65.10 $\pm$ 19.64	70.60 $\pm$ 22.16	69.10 $\pm$ 26.97	92.89 $\pm$ 14.37	71.30 $\pm$ 16.40	68.10 $\pm$ 18.68	0.1919	
<i>24h test</i>	80.38 $\pm$ 33.41	61.63 $\pm$ 17.33	70.00 $\pm$ 24.01	77.20 $\pm$ 19.27	65.80 $\pm$ 25.88	71.78 $\pm$ 27.54	82.40 $\pm$ 25.54	65.67 $\pm$ 27.68	0.5990	
<i>7d test</i>	58.25 $\pm$ 19.92	53.00 $\pm$ 21.38	42.50 $\pm$ 15.09	51.60 $\pm$ 16.81	55.90 $\pm$ 17.30	48.78 $\pm$ 25.39	57.90 $\pm$ 25.73	59.33 $\pm$ 22.02	0.6486	
<i>14d test</i>	48.50 $\pm$ 15.85	50.88 $\pm$ 24.95	54.20 $\pm$ 16.50	51.20 $\pm$ 10.40	47.70 $\pm$ 19.59	66.89 $\pm$ 26.93	56.60 $\pm$ 12.83	54.89 $\pm$ 23.50	0.5098	
<b>OF</b>										
<b>Crossings (n)</b>										
<i>24h test</i>	91.25 $\pm$ 39.58	81.13 $\pm$ 20.00	81.80 $\pm$ 34.16	77.60 $\pm$ 24.67	91.60 $\pm$ 20.39	73.11 $\pm$ 35.6	91.70 $\pm$ 19.49	97.67 $\pm$ 25.07	0.5578	
<i>7d test</i>	100.1 $\pm$ 33.81	82.38 $\pm$ 23.56	75.22 $\pm$ 24.06	86.20 $\pm$ 18.56	89.60 $\pm$ 15.90	97.11 $\pm$ 28.91	94.10 $\pm$ 24.99	93.00 $\pm$ 30.60	0.5031	
<i>14d test</i>	93.63 $\pm$ 22.98	81.00 $\pm$ 13.16	70.20 $\pm$ 20.55	82.60 $\pm$ 20.10	82.50 $\pm$ 23.81	89.33 $\pm$ 18.05	86.20 $\pm$ 18.34	85.33 $\pm$ 22.94	0.3995	
<b>Rearings (n)</b>										
<i>24h test</i>	26.63 $\pm$ 4.41	27.00 $\pm$ 6.16	25.20 $\pm$ 9.53	22.20 $\pm$ 9.62	29.50 $\pm$ 7.01	21.89 $\pm$ 13.23	26.40 $\pm$ 5.89	27.11 $\pm$ 8.34	0.5295	
<i>7d test</i>	23.00 $\pm$ 9.47	22.00 $\pm$ 10.53	23.30 $\pm$ 8.15	27.60 $\pm$ 4.90	28.10 $\pm$ 9.36	26.44 $\pm$ 7.83	29.00 $\pm$ 6.53	34.22 $\pm$ 16.06	0.1595	
<i>14d test</i>	24.38 $\pm$ 9.01	25.63 $\pm$ 10.21	19.80 $\pm$ 8.71	23.80 $\pm$ 5.96	25.70 $\pm$ 6.63	26.67 $\pm$ 4.74	28.00 $\pm$ 3.89	25.56 $\pm$ 10.10	0.2058	
<b>EPM</b>										
<b>Entries in open arms (n)</b>										
<i>24h test</i>	9.125 $\pm$ 2.36	8.125 $\pm$ 2.70	6.900 $\pm$ 2.60	7.100 $\pm$ 3.45	7.600 $\pm$ 2.55	8.556 $\pm$ 2.45	7.800 $\pm$ 2.25	6.778 $\pm$ 2.44	0.5359	
<i>7d test</i>	8.875 $\pm$ 3.482	8.250 $\pm$ 2.60	7.900 $\pm$ 2.38	9.400 $\pm$ 2.76	7.700 $\pm$ 1.57	10.67 $\pm$ 1.80	8.600 $\pm$ 2.46	8.333 $\pm$ 1.94	0.1255	
<i>14d test</i>	9.125 $\pm$ 2.95	7.500 $\pm$ 2.88	7.500 $\pm$ 2.67	7.700 $\pm$ 2.00	8.400 $\pm$ 3.17	9.333 $\pm$ 1.41	8.300 $\pm$ 1.77	9.111 $\pm$ 2.76	0.5756	
<b>Time in open arms (s)</b>										
<i>24h test</i>	190.1 $\pm$ 45.05	191.8 $\pm$ 39.39	151.2 $\pm$ 57.21	161.0 $\pm$ 64.82	200.1 $\pm$ 43.78	199.6 $\pm$ 34.10	205.2 $\pm$ 46.61	177.8 $\pm$ 45.92	0.1495	
<i>7d test</i>	158.3 $\pm$ 60.66	190.6 $\pm$ 39.18	180.8 $\pm$ 45.52	204.8 $\pm$ 30.80	159.1 $\pm$ 63.39	199.6 $\pm$ 44.50	164.4 $\pm$ 53.09	170.0 $\pm$ 44.14	0.2847	
<i>14d test</i>	180.4 $\pm$ 47.85	140.3 $\pm$ 54.76	146.0 $\pm$ 51.38	157.3 $\pm$ 59.17	153.8 $\pm$ 56.03	191.2 $\pm$ 22.92	164.9 $\pm$ 58.52	151.4 $\pm$ 54.49	0.4577	



### 3 Discussion

In a previous study, we demonstrated that one single physical exercise session promotes the persistence of OR memory in rats by D1/D5 receptors hippocampal activation (Vargas et al., 2020). Here, we investigate the role of D1 and D5 receptors on the acute effects of physical exercise on memory and the main signaling pathways involved. Using pharmacological manipulations in the hippocampus, we stimulated or inhibited specific D1 and D5 signaling pathways, which involve PKA and PKC, respectively. We confirm the requisition of D1/D5 receptors for the effects of acute physical exercise on memory persistence and bring new evidence suggesting that PKA activation by stimulation of D1 receptors is behind these effects.

Our experiment considered the OR task, a usual model for investigating memory processes (Ennaceur, 2010), to characterize memory performance in a dichotomous way (pass/fail). We compared the percentage of the total objects' exploration time in the OR task with a theoretical mean of 50%, which is the expected time exploring each object when familiar objects are tested (Furini et al., 2014; Vargas et al., 2020). A longer time exploring a new instead of a familiar object reflects memory consolidation (and memory persistence). As a complement, we compared DI between groups for each test day to identify procedures that may have more prominent effects on memory.

To identify the involvement of D1 family receptors' in acute effects of physical exercise on memory, we manipulated D1 and D5 receptors' signaling pathways using pharmacological tools. The block of the D1 receptors pathway, which involves the PKA inhibitor, hindered the effects of physical exercise on memory, avoiding memory persistence. We blocked D1/D5 receptors and stimulated PKA after the physical exercise session to confirm these receptors' role. We observed that the activation of this pathway, in which the D1 receptors act, was sufficient to allow the modulatory effects of physical exercise on memory. The PKC block after physical exercise, on the other hand, did not impair the effects of physical exercise on memory. Moreover, PKC activation after D1/D5 receptors block was insufficient to promote recognition memory persistence by physical exercise. D1/D5 stimulation (SKF), the physical exercise session, and the PKA stimulation after D1/D5 block (SCH + Sp-cAMP) had more pronounced effects on memory modulation. It is assumed because the control

group showed lower DI in the 7-day test, representing physiological memory decline. The block of D1/D5 receptors (SCH) was the pharmacological manipulation with more harmful effects on physical exercise modulation of memory; the group submitted to physical exercise receiving SCH showed lower DI than the physical exercise group in both memory persistence tests.

In animals not submitted to physical exercise, we recently demonstrated that the non-selective D1/D5 block impairs the consolidation and persistence of OR memory (Neves et al., 2020). Furthermore, PKA signaling, but not PKC, might be required for memory consolidation and persistence. Here, when the pharmacological manipulations were conducted after the physical exercise, memory consolidation impairment was avoided, with animals presenting results similar to the control ones. However, we did not observe physical exercise's effects on memory persistence when we blocked D1/D5 receptors and inhibited PKA. Then, dopaminergic receptors and PKA activation might be necessary for the effects of physical exercise on memory persistence.

Considering the OR task protocol used in our study, the animal can form LTM and spend more time exploring the novel object in the test performed 24 h after training. After this time, a physiological forgetting is expected (Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020, 2017). Notably, acute physical exercise can modulate OR learning and LTM consolidation, improving its persistence over time. Furthermore, we observed that this modulation occurs mainly by activating D1 dopamine receptors and PKA signaling. The PKC pathway, preferably activated by D5, does not appear to be essential. Consistent with our data, other studies pointed that the D1 receptors appear to be more critical for memory than D5 (Granado et al., 2008; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020).

We highlight the importance of prior habituation to the treadmill to avoid the effects of stress or novelty. In previous studies, we demonstrated that the treadmill's habituation could not improve memory persistence per se (Vargas et al., 2020, 2017). These findings confirm that the LTM modulation occurs by acute physical exercise and not by habituation, stress, or novelty exposition effects. Other researchers have found similar results in experimental animals submitted to different configurations of physical exercise. Acute aerobic physical exercise using the running wheel also

improves LTM (Bouchet et al., 2017), and resistance physical exercise after learning revealed positive effects on cognition (Daré et al., 2020; Fernandes et al., 2016).

Studies with animal models and human subjects have suggested possible brain regions involved in the acute effects of physical exercise on cognitive function and highlight the dopaminergic activation (Basso and Suzuki, 2017; Loprinzi et al., 2018; Vargas et al., 2020). In a previous study, we found that 30 min of acute physical exercise on a treadmill promotes increased dopamine in the hippocampus (Vargas et al., 2020). So, like other authors, we can assume that acute physical exercise may increase the release of dopamine into the CA1 region via inputs from locus coeruleus (LC), ventral tegmental area (VTA), and substantia nigra (SN) (Loprinzi et al., 2018). Here we investigated the D1 family dopamine receptors' involvement in memory persistence modulation. Despite dopamine also acting on D2 family receptors, these receptors seem to be less critical for hippocampus-dependent memories (de Lima et al., 2011; Feyissa et al., 2019; Hagena and Manahan-Vaughan, 2016; Williams and Undieh, 2009).

It is well described in the literature that D1 family stimulation improves neuronal plasticity process, facilitating long-term potentiation (LTP), which results in persistent enhancement of synaptic transmission, essential for LTM consolidation (Edelmann and Lessmann, 2018; O'Carroll and Morris, 2004). Furthermore, the acute stimulation of D1 family receptors increases the expression of proteins required to establish lasting neuronal plasticity, such as BDNF (Williams and Undieh, 2009). Dopaminergic activation in the CA1 is also essential to the tagging and capture process, a phenomenon that explains the stabilization of lasting memories by two parallel and complementary processes: tag formation induced by learning; and the synthesis of plasticity-related proteins (PRPs) that once captured at tagged sites can allow LTM consolidation (Moncada et al., 2011; Moncada and Viola, 2007). Taken together, these are some potential dopaminergic mechanisms by which acute physical exercise may improve memory function (Loprinzi et al., 2018).

Acute physical exercise can have important clinical applications since it is a non-invasive and easily applicable therapeutic alternative. This strategy improves memory in animals with cognitive memory deficits (Daré et al., 2020; Sosa et al., 2019). Here, we provide evidence that activation of D1 receptors and PKA is necessary for acute physical exercise improving-memory effects. Future studies to

evaluate the hippocampal expression of the D1 and D5 receptors, the levels of proteins such as BDNF, and *enzymes* related to *dopamine* synthesis may help clarify the mechanisms of acute physical exercise memory modulation.

## **4 Conclusion**

We demonstrate that the positive effects of one single physical exercise session on recognition memory persistence depend on specific dopaminergic mechanisms. It provides evidence of the contribution of D1-like dopaminergic receptors by activating the PKA pathway to promote memory persistence.

## **5 Materials and Methods**

### **5.1 Animals and groups**

Adult male Wistar rats (3 months old; 300-350g body weight) were purchased from the University of Santa Maria Central Vivarium (RS/Brazil). The animals were housed four per cage and kept under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a temperature of  $23 \pm 2$  °C and  $50 \pm 10\%$  humidity), and food and water ad libitum. All experiments were conducted following the Principles of Laboratory Animal Care of the National Institutes of Health and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Protocol 033/2019). The experiments started after one week of rats' habituation in the laboratory where the experiments would take place. All animals were handled two days before starting the experiments to reduce stress.

The animals were randomly divided into eight groups ( $n = 8-10/\text{group}$ ). All animals were submitted to stereotaxic surgery for bilateral implantation of cannulas in the CA1 region of the dorsal hippocampus. To evaluate the memory, we used the OR task. Immediately after the OR training session, the control group (i) received an intrahippocampal infusion of the vehicle, and SKF 38393 group (ii) received an intrahippocampal infusion of SKF 38393 (agonist D1/D5). The physical exercise groups were previously habituated on a treadmill, and immediately after OR training, they were submitted to one single physical exercise session in the treadmill (60-70% of

VO<sub>2</sub> maximum) for 30 min and received an intrahippocampal infusion of vehicle or drug(s) according to experimental groups: (iii) physical exercise + vehicle; (iv) physical exercise + SCH 23390 (D1/D5 receptor antagonist); (v) physical exercise + Rp-cAMP (PKA inhibitor; PKA is the second messenger from D1 receptors); (vi) physical exercise + SCH 23390 + Sp-cAMP (D1/D5 receptor antagonist + PKA stimulator); (vii) physical exercise + Gö 6976 (PKC inhibitor; PKC is the second messenger from D5 receptors); (viii) physical exercise + SCH 23390 + PMA (D1/D5 receptor antagonist + PKC stimulator). All animals were tested in the OR task 24 h, 7, and 14 days after training.

## 5.2 Surgery

All animals underwent stereotaxic surgery for bilateral guide cannula implantation under deep anesthesia (i.p., 75 mg/kg ketamine plus 10 mg/kg xylazine). The guide cannulas were made in the laboratory (9.0 mm) using hypodermic needles (25 x 0.7 mm). The 27-gauge stainless steel tubes cannulae were stereotaxically inserted into the CA1 region of the dorsal hippocampus (AP, -4.2 mm; LL, ±3.0 mm; and VD, -2.0 mm), according to the coordinates provided by the anatomical atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 2013). Dental cement was used to fix the cannulae. The animals were allowed to recover from surgery for 48 h before undergoing any other procedure.

## 5.3 Drugs and infusion procedures

The drugs used for infusion were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil) and were dissolved in 2% (vol/vol) DMSO in saline (vehicle) and stored at -20°C. Before use, aliquots were diluted to working concentrations with 0.9% saline. The drug and concentrations use were as follows: SKF 38393, 12.5 µg/µL; SCH 23390, 1 µg/µL; Gö 6976, 1.7 ng/µL; Rp-cAMP, 0.5 µg/µL; PMA, 0.5 µg/µL; Sp-cAMP, 0.5 µg/µL. The concentrations and volumes were based on previous studies showing each compound's effect on learning and behavioral performance (Furini et al., 2014; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020).

The infusion procedures were carried out into the dorsal CA1 region of the hippocampus on both sides immediately after OR training in groups i and ii or one-single physical exercise session in groups iii-viii. We used a Hamilton syringe connected to fine bore tubing (38 gauge), with an infusion cannula (30 gauge) at the end. At the time of drug infusion, the infusion cannulas were fitted into the guide cannulae, inserted 1.0 mm deeper to reach the CA1 region of the hippocampus. Infusions (1  $\mu$ L/side) were performed for a period of 60 s, and the infusion cannula was left in place for an additional 60 s to minimize backflow.

Cannula placement was verified postmortem as described previously (Vargas et al., 2017; Neves et al., 2020). In summary, 2-4 h after the last behavioral test, the same volume of 4% methylene blue solution was infused into the CA1 region, and the area that the dye reached 30 min after that was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug(s) previously administered to each animal. Only data from animals with correct cannula placement (i.e., within 1 mm of the intended site) were analyzed.

#### **5.4 Physical exercise protocol**

A motorized treadmill built for rodents was used (Insight Ltda, São Paulo, Brazil). One week before starting the behavioral experiments, a period of habituation on a treadmill was carried out, consisting of two stages. (1) Familiarization: to avoid novelty and/or stress effects. In the first two days, animals were submitted to habituation for 10 min at velocity 2 to 5 m/min; and for more three days, the velocity was 8 m/min during 10 min. (2) Maximal indirect  $VO_2$  test: it was performed a day after the familiarization stage ends and aimed to determine the individual exercise intensity. It consisted of starting at a low velocity and increasing by 5 m/min every 3 min until the rat could not keep running. The work volume (m/min) was considered as an indirect measure of maximum indirect  $VO_2$ .

Animals performed one single physical exercise session lasting 30 min immediately after OR training at an intensity of 60-70% maximal indirect oxygen uptake ( $VO_2$ ). The treadmill exercise session protocol used in this study has already been used in previous studies by our research group (Daré et al., 2020; Sosa et al., 2019; Vargas et al., 2020, 2017).

## **5.5 Behavioral experiments**

### **5.5.1 Object recognition task**

The OR task was performed in a wooden box (50 × 50 × 50 cm). This task is based on the animal's natural tendency to explore novel objects in a known environmental context and was adapted from Ennaceur & Delacour (1998). Initially, habituation in the apparatus was performed, consisting of free exploration of the environment (box) for 20 min, for 4 consecutive days. On the 5th day, the training session was performed, the animals were placed again in the box, with two different unknown objects for free exploration for 5 min. The LTM consolidation test was performed 24 h after the training session. Repeated measurements were conducted 7 and 14 days after the same animals' training session to evaluate the memory persistence. In each test session, a novel and a familiar object were placed in the environment, and the animals were allowed to explore for 5 min. Exploration was defined as the animals touching the object with the front paws or sniffing it with the nose. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. After testing each animal, objects and apparatus were cleaned with 70% alcohol to avoid olfactory preferences. Object's exploration time was evaluated using a manual stopwatch.

The objects were made of metal or plastic, and it was previously confirmed (in pilot studies) that the animals had no preference for any of them. Each testing session was performed using a novel combination of a familiar and a novel object according to the time of the first familiar object presentation (i.e., 24 h, 7, or 14 days before the test). We named the objects with different letters (A, B, C, D, and E), and they were, respectively, a magic cube, plastic cup, circular can, Legos' pieces, and metallic cylinder.

### **5.5.2 Control behavioral tasks**

After each memory test session, we monitored control parameters to evaluate whether drug administration or the other procedures altered the animals' general behavior. To assess the exploratory and locomotor activities, we used the open field

(OF) task (Hall, 1934; Hall and Ballachey, 1932). The rats were placed in the left quadrant of a 50 x 50 x 39 cm, made of wood painted white, with a front glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures of locomotor and exploratory activities, respectively, were assessed manually over 5 min. The elevated plus-maze (EPM) (Pellow et al., 1985) was used to evaluate anxiety state. For this test, the animals were placed in the center of the apparatus during the 5 min, and infrared sensors recorded the number of entries and the time spent in the open arms.

## **5.6 Statistical analysis**

The exploration time for each object in the OR task was converted to a percentage of the total exploration time. To evaluate each group's memory consolidation and persistence, we analyzed the data using the Wilcoxon test, comparing the percentage of total time spent exploring each object with a theoretical mean (50%); data are expressed as median with interquartile range. To perform comparisons between groups in each test session, we calculate the DI for the novel object at 24 h, and on days 7 and 14:  $DI = [(T \text{ novel} - T \text{ familiar}) / (T \text{ novel} + T \text{ familiar}) \times 100 (\%)]$  (Daré et al., 2020; Vargas et al., 2020, 2017). We compared the DI between groups in each test day by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Additionally, a repeated measure (RM) ANOVA, followed by Holm-Sidak's post hoc test, was used to analyze each group's DI along all test days. The total time spent exploring each object, and the OF and EPM results for each session were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  in all analyses.

## **Authors contributions**

Conceived and designed the experiments: KRL, PBMC; Performed the experiments: KRL, ACSR, SSP, SSS, NMS; Contributed to data analysis and interpretation writing and reviewing of the manuscript: KRL, PBMC; Approved the final manuscript version: KRL, ACSR, SSP, SSS, NMS, PBMC.



## Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by research grants from the Federal University of Pampa, Brazilian National Council of Research of (CNPq/Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/RS/Brazil). K.R.L. is supported by CAPES/Brazil. P.B.M.C. is supported by CNPq/ Brazil and Unipampa/Brazil.

## References

- Basso, J.C., Suzuki, W.A., 2017. The Effects of Acute Exercise on Mood, Cognition, Neurophysiology, and Neurochemical Pathways: A Review. *Brain Plast.* 2, 127–152. <https://doi.org/10.3233/bpl-160040>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2007. Article Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron* 53, 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J.I., Goldin, A., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2711–2716. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711863105>
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2010. Persistence of long-term memory storage: New insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotox. Res.* 18, 377–385. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9155-5>
- Bouchet, C.A., Lloyd, B.A., Loetz, E.C., Farmer, C.E., Ostrovskyy, M., Haddad, N., Foright, R.M., Greenwood, B.N., 2017. Acute exercise enhances the consolidation of fear extinction memory and reduces conditioned fear relapse in a sex-dependent manner. *Learn. Mem.* 24, 358–368. <https://doi.org/10.1101/lm.045195.117>
- Cantrelle, J., Burnett, G., Loprinzi, P.D., 2020. Acute exercise on memory function: Open vs. Closed skilled exercise. *Heal. Promot. Perspect.* 10, 123–128. <https://doi.org/10.34172/hpp.2020.20>
- Daré, L.R., Garcia, A., Neves, B.H., Mello-Carpes, P.B., 2020. One physical exercise session promotes recognition learning in rats with cognitive deficits related to amyloid beta neurotoxicity. *Brain Res.* 1744, 146918. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146918>
- de Lima, M.N.M., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Siciliani Scalco, F., Roesler, R., Garcia, V.A., Schröder, N., 2011. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.12.007>

- Delancey, D., Frith, E., Sng, E., Loprinzi, P.D., 2019. Randomized Controlled Trial Examining the Long-Term Memory Effects of Acute Exercise During the Memory Consolidation Stage of Memory Formation. *J. Cogn. Enhanc.* 3, 245–250. <https://doi.org/10.1007/s41465-018-0106-z>
- Diederich, K., Bastl, A., Wersching, H., Teuber, A., Strecker, J.K., Schmidt, A., Minnerup, J., Schäbitz, W.R., 2017. Effects of different exercise strategies and intensities on memory performance and neurogenesis. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00047>
- Edelmann, E., Lessmann, V., 2018. Dopaminergic innervation and modulation of hippocampal networks Functions of dopamine in the hippocampus in memory and emotional regulation. *Cell Tissue Res.* 373, 711–727. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2800-7>
- Ennaceur, A., 2010. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res.* 215, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Ennaceur, Delacour, 1998. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x)
- Fernandes, J., Soares, J.C.K., do Amaral Baliego, L.G.Z., Arida, R.M., 2016. A single bout of resistance exercise improves memory consolidation and increases the expression of synaptic proteins in the hippocampus. *Hippocampus* 26, 1096–1103. <https://doi.org/10.1002/hipo.22590>
- Feyissa, D.D., Sialana, F.J., Keimpema, E., Kalaba, P., Paunkov, A., Engidawork, E., Höger, H., Lubec, G., Korz, V., 2019. Dopamine type 1- and 2-like signaling in the modulation of spatial reference learning and memory. *Behav. Brain Res.* 362, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.028>
- Furini, C.R.G., Myskiw, J.C., Schmidt, B.E., Marcondes, L.A., Izquierdo, I., 2014. D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behav. Brain Res.* 271, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.027>
- Granado, N., Ortiz, O., Suárez, L.M., Martín, E.D., Ceña, V., Solís, J.M., Moratalla, R., 2008. D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-induced arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cereb. Cortex* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm026>
- Hagena, H., Manahan-Vaughan, D., 2016. Dopamine D1/D5, But not D2/D3, receptor dependency of synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses that is enabled by patterned afferent stimulation, or spatial learning. *Front. Synaptic Neurosci.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00031>
- Hall, C., 1934. Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. *J Comp Psychol* 27, 89–108. <https://doi.org/10.1037/h0073676>
- Hall, C., Ballachey, E.L., 1932. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *Univ. California, Publ. Psychol.* 6, 1–12.
- Katche, C., Cammarota, M., Medina, J.H., 2013. Neurobiology of Learning and Memory Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.018>
- Loprinzi, P.D., Edwards, M.K., Frith, E., 2017. Potential avenues for exercise to activate episodic memory-related pathways: a narrative review. *Eur. J. Neurosci.* 46, 2067–2077. <https://doi.org/10.1111/ejn.13644>

- Loprinzi, P.D., Ponce, P., Frith, E., 2018. Hypothesized mechanisms through which acute exercise influences episodic memory. *Physiol. Int.* 105, 285–297. <https://doi.org/10.1556/2060.105.2018.4.28>
- Meeusen, R., De Meirleir, K., 1995. Exercise and Brain Neurotransmission. *Sport. Med.* 20, 160–188. <https://doi.org/10.2165/00007256-199520030-00004>
- Meeusen, R., Piacentini, M.F., De Meirleir, K., 2001. Brain microdialysis in exercise research. *Sport. Med.* 31, 965–983. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131140-00002>
- Mello, P.B., Benetti, F., Cammarota, M., Izquierdo, I., 2009. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.04.004>
- Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., De Carvalho Myskiw, J., Furini, C.R.G., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P.B., 2015. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1652–E1658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502295112>
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M.C., Frey, J.U., Viola, H., 2011. Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12931–12936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104495108>
- Moncada, D., Viola, H., 2007. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: Evidence for a behavioral tagging. *J. Neurosci.* 27, 7476–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007>
- Neves, B.H.S., Barbosa, G.P.D.R., Rosa, A.C. de S., Picua, S.S., Gomes, G.M., Sosa, P.M., Mello-Carpes, P.B., 2020. On the role of the dopaminergic system in the memory deficits induced by maternal deprivation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 173. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107272>
- O'Carroll, C.M., Martin, S.J., Sandin, J., Frenguelli, B., Morris, R.G.M., 2006. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem.* 13, 760–769. <https://doi.org/10.1101/lm.321006>
- O'Carroll, C.M., Morris, R.G.M., 2004. Heterosynaptic co-activation of glutamatergic and dopaminergic afferents is required to induce persistent long-term potentiation. *Neuropharmacology* 47, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.005>
- Paxinos, G., Watson, C., 2013. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Acad. Press 7th Editio, 1–472.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci.* 147–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Pietrelli, A., Matković, L., Vacotto, M., Lopez-Costa, J.J., Basso, N., Brusco, A., 2018. Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 155, 528–542. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.007>
- Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., Cammarota, M., 2009. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science (80- )*. 325, 1017–1020. <https://doi.org/10.1126/science.1172545>
- Sosa, P.M., Neves, B.S., Carrazoni, G.S., Gomes, G.M., Del Rosso, G., Ramborger, B.P., Rohers, R., Mello-Carpes, P.B., 2019. Maternal Deprivation Induces Memory Deficits That Are Reduced by One Aerobic Exercise Shot Performed

- after the Learning Session. *Neural Plast.* 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/3608502>
- Undieh, A.S., 2010. Pharmacology of signaling induced by dopamine D1-like receptor activation. *Pharmacol. Ther.* 128, 37–60. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.05.003>
- van Dongen, E. V., Kersten, I.H.P., Wagner, I.C., Morris, R.G.M., Fernández, G., 2016. Physical Exercise Performed Four Hours after Learning Improves Memory Retention and Increases Hippocampal Pattern Similarity during Retrieval. *Curr. Biol.* 26, 1722–1727. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.071>
- Vargas, L. da S. de, Lima, K.R., Ramborger, B.P., Roehrs, R., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P.B., 2020. Catecholaminergic hippocampal activation is necessary for object recognition memory persistence induced by one-single physical exercise session. *Behav. Brain Res.* 379, 112356. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112356>
- Vargas, L. da S. de, Neves, B.H.S. das, Roehrs, R., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P., 2017. One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. *Behav. Brain Res.* 329, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.050>
- Williams, S.N., Undieh, A.S., 2009. Dopamine D1-like receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroreport* 20, 606–610. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832a0a98>

## PARTE III

## DISCUSSÃO

Esta dissertação buscou investigar os efeitos de duas estratégias comportamentais sobre a persistência da memória e elucidar os mecanismos dopaminérgicos envolvidos. No primeiro estudo investigamos os efeitos da exposição à novidade sobre a memória de reconhecimento de objetos e a atuação dos receptores D1 e D5 e suas vias de sinalização, PKA e PKC. No segundo estudo, nós examinamos estes mesmos parâmetros, no entanto, utilizando o exercício físico agudo como estratégia para modulação da memória. Nós realizamos manipulações farmacológicas na região CA1 do hipocampo, a fim de verificar a requisição dos receptores D1 e D5; para isto, empregamos fármacos que inibem ou estimulam as vias de sinalização ativadas por estes receptores, sendo, respectivamente, PKA e PKC. Em resumo, nós demonstramos que uma breve exposição à um novo ambiente ou uma única sessão de exercício físico imediatamente após o aprendizado promove a persistência da memória de reconhecimento por até 14 dias. Nós evidenciamos que este efeito requer apenas a ativação de PKA, modulada essencialmente por D1; a via PKC, ativada pelos receptores D5 não demonstrou ser necessária.

Em ambos estudos nós observamos que uma sessão de treino na tarefa de reconhecimento de objetos é suficiente para promover a consolidação da memória, verificada em teste realizado 24 horas após o treino, mas não é suficiente para promover a sua persistência ao longo dos dias. Este é um resultado esperado, uma vez que esta tarefa não envolve fatores emocionais que facilitaríamos a persistência da memória. Nós também demonstramos que a infusão de um agonista dos receptores dopaminérgicos D1/D5, o SKF 38393, quando infundido em CA1 imediatamente após o aprendizado, promove a persistência da memória de reconhecimento por até 14 dias. Recentemente, um estudo do nosso grupo de pesquisa apresentou resultados similares ao nosso frente à estimulação destes receptores na mesma tarefa de memória (Neves et al., 2020). Portanto, fica claro a participação destes receptores para a melhora da persistência da memória, assim como já destacado em outros estudos (Rossato et al., 2009; Vargas et al., 2020).

A dopamina é, de fato, um dos neurotransmissores mais importantes para a modulação dos processos de aprendizagem e memória (Edelmann & Lessmann, 2018). Nos estudos apresentados nesta dissertação, observamos que a estimulação

farmacológica deste sistema no hipocampo imediatamente após o aprendizado é capaz de modular positivamente a persistência da memória. É bem destacado na literatura que o período entre a aquisição e a consolidação da memória é altamente lábil, sendo suscetível à modulações que podem favorecer ou não à formação de um traço de memória forte e duradouro (McGaugh, 2000). Por isso, mesmo que se saiba que modulações no período tardio de consolidação, que envolve processos específicos para a persistência da memória, sejam eficazes (Bekinschtein et al., 2007, 2008; Rossato et al., 2009), é possível identificar que outros períodos durante a formação da memória também podem influenciar diretamente na sua persistência (Neves et al., 2020; Vargas et al., 2020).

Tendo em vistas estes conhecimentos, e sabendo que estratégias comportamentais como a novidade e o exercício físico agudo aumentam os níveis de dopamina no hipocampo (Lima et al., 2019; Menezes et al., 2015; Vargas et al., 2020), nós investigamos se estas estratégias poderiam apresentar efeitos similares à ação farmacológica previamente observada e os mecanismos dopaminérgicos envolvidos. De acordo com esta hipótese, imediatamente após a aquisição, os animais foram submetidos à exploração de um novo ambiente por 5 minutos (estudo 1) ou uma única sessão de exercício físico em esteira por 30 minutos (estudo 2), conforme previamente protocolado (Vargas et al., 2017; Moncada & Viola, 2007). Ambas estratégias foram eficazes para modular positivamente a memória, e demonstraram ser tão efetivas quanto à estimulação farmacológica dopaminérgica. A fim de verificar o envolvimento dos receptores dopaminérgicos neste efeito, após a aplicação destas estratégias nós infundimos em CA1 um antagonista não seletivo de D1/D5, o SCH 23390, e confirmamos que o efeito observado na memória depende da atividade destes receptores.

Sabe-se que a exposição à novidade melhora a memória baseado no fenômeno BT (Moncada & Viola, 2007). O seu efeito é explicado através da hipótese STC (Frey & Morris, 1997), que indica que a novidade é um estímulo forte o suficiente para induzir a LTP-tardia no hipocampo (Li et al., 2003). Em conjunto, estas hipóteses indicam que um aprendizado fraco, que formaria apenas uma MCD, é capaz de formar uma MLD pela captura de PRPs geradas a partir do estímulo da novidade, quando aplicado à uma janela de tempo próxima à aquisição (minutos a algumas horas); essa captura de proteínas permite a formação de uma memória

mais estável, induzindo uma série de modificações plásticas que auxiliam na melhora da cognição (Okuda et al., 2020). Em adição à isto, a ativação dos receptores D1/D5 no hipocampo é fundamental para o efeito da novidade (Chen et al., 2020; Moncada et al., 2011), uma vez que é essencial para a síntese e mobilização das PRPs (Okuda et al., 2020).

O fenômeno da novidade é amplamente estudado de modo a facilitar a consolidação de aprendizados inicialmente fracos e induzir a formação de MLD (Moncada & Viola, 2007). Para isso, protocolos que envolvem o medo condicionado ao contexto ou memória aversiva são os mais utilizados, pois permitem facilmente a manipulação do aprendizado, através do uso de diferentes intensidades de estimulação elétrica, que permitem a formação de uma MCD ou MLD conforme a intensidade do estímulo (Chen et al., 2020; Menezes et al., 2015; Moncada et al., 2011; Moncada & Viola, 2007). Em um protocolo de reconhecimento de objetos que induz apenas a formação da MCD, a novidade, quando aplicada antes ou após a aquisição, induz a formação de uma MLD (Nomoto et al., 2016). O protocolo utilizado em nosso estudo é, por si só, suficiente para formar uma MLD após o aprendizado, portanto, nossa intenção foi investigar o efeito da novidade na melhora dessa memória. McGaugh (2000) destaca que a melhora na persistência da memória geralmente é resultado de mecanismos que melhoram a consolidação desta. Portanto, intervenções na janela temporal de consolidação podem interferir na persistência das MLD, revelando a melhora da memória. A partir dos nossos resultados, nós identificamos que a novidade não modula somente aprendizados fracos como comumente destacado na literatura, mas que também pode melhorar o traço de um aprendizado forte, permitindo sua persistência ao longo dos dias.

Diferente da novidade, os efeitos do exercício físico agudo sobre a persistência da memória de reconhecimento já tinham sido evidenciados previamente (Vargas et al., 2017, 2020; Daré et al., 2020). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem investigando os efeitos e mecanismos do exercício físico agudo sobre a cognição. O protocolo utilizado no segundo estudo desta dissertação foi proposto em um estudo prévio do nosso laboratório, no qual observamos que uma única sessão de 30 minutos de exercício de corrida em esteira rolante atua como um modulador positivo da persistência da memória de reconhecimento em ratos *Wistar* (Vargas et al., 2017). Adicionalmente, demonstramos que este efeito



requer a ativação receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Vargas et al., 2017) e dopaminérgicos D1/D5 na região do hipocampo (Vargas et al., 2020). Nosso grupo também demonstrou que, além de modular a memória de animais saudáveis, o exercício físico agudo é capaz de melhorar os déficits mnemônicos de animais submetidos à protocolos de infusão intrahipocampal do peptídeo  $\beta$ -amilóide (Daré et al., 2020) e privação materna (Sosa et al., 2019).

Sabendo do envolvimento dos receptores dopaminérgicos D1/D5 no efeito da novidade e do exercício físico agudo sobre a cognição, nós investigamos as principais vias de sinalização que envolvem estes receptores, a fim de compreender seu requerimento individual para a persistência da memória. Até o momento, não há fármacos que estimulem ou inibem especificamente os receptores D1 e D5, por isso, grande parte dos estudos que investigam o sistema dopaminérgico se restringem a observar o efeito conjunto destes receptores sobre a memória, utilizando agonistas ou antagonistas não seletivos (Moncada et al., 2011; Vargas et al., 2020; Zhang et al., 2018). Para diferenciar o papel destes receptores, uma possibilidade é a estimulação ou inibição dos seus segundos mensageiros, uma vez que os receptores D1 regulam a atividade de PKA, enquanto os receptores D5 regulam majoritariamente a atividade de PKC (Furini et al., 2014; Menezes et al., 2015; Neves et al., 2020).

Para avaliar a atividade das vias de sinalização dos receptores D1 e D5 no efeito da novidade e exercício agudo, após a aplicação destas estratégias, nós infundimos em CA1 um inibidor de PKA, o Rp-cAMP, e observamos que, em ambos estudos, o efeito da persistência promovido pelas estratégias comportamentais foi perdido, indicando que esta via é fundamental para que este fenômeno ocorra. Para confirmar este efeito, em outro grupo experimental, após cada estratégia, nós bloqueamos D1 e D5, com um antagonista não seletivo, o SCH 23390, e logo após, estimulamos PKA, com Sp-cAMP. A estimulação deste segundo mensageiro foi suficiente para manter o efeito modulatório positivo de ambas estratégias sobre a persistência da memória. Quando este protocolo farmacológico foi utilizado para investigar a atividade de PKC, esta proteína não se mostrou essencial. O bloqueio de PKC após a novidade ou exercício físico agudo não interferiu no efeito destas estratégias sobre a persistência da memória; bem como, a estimulação desta via após o bloqueio de D1 e D5 não foi suficiente para melhorar da memória.

Juntos, nossos dados fornecem evidências de que uma breve exposição à um novo ambiente ou uma única sessão de exercício físico, imediatamente após um aprendizado, é capaz de modular positivamente sua consolidação e promover a sua persistência. Aqui, nós observamos que este efeito depende de vias de sinalização específicas, que envolve os receptores dopaminérgicos da família D1, mais especificamente, a ativação dos receptores D1 e da PKA. Unindo nossos dados com as evidências da literatura, nós sugerimos que tanto a novidade como o exercício físico agudo estimulam regiões como VTA e LC (Moncada, 2017; Loprinzi et al., 2018), que, por sua vez, promovem o aumento dos níveis de dopamina no hipocampo (Menezes et al., 2015; Vargas et al., 2020). A interação deste neurotransmissor com receptores D1 aumenta a atividade de PKA, que induz uma série de modificações neuronais e síntese proteica, suficiente para melhorar o traço da memória de um aprendizado que ocorre em paralelo (Granado et al., 2008; Zhang et al., 2018).

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados nos dois estudos aqui apresentados, podemos concluir que:

- i. A estimulação farmacológica dos receptores D1/D5 na janela temporal da consolidação da memória em ratos *Wistar* promove a persistência memória de reconhecimento de objetos;
- ii. A exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico na janela temporal da consolidação da memória em ratos *Wistar* promove a persistência memória de reconhecimento de objetos;
- iii. O efeito da exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico na promoção da persistência da memória de reconhecimento de objetos depende da ativação dos receptores da família D1 (D1/D5);
- iv. A inibição hipocampal farmacológica de PKA (via de atuação dos receptores D1) após a exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico inibe o efeito destes estímulos sob a persistência da memória de reconhecimento de objetos;
- v. A estimulação hipocampal farmacológica de PKA (via de atuação dos receptores D1) após o bloqueio dos receptores D1/D5 e exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico é suficiente para manter os efeitos de ambos os estímulos sob a persistência da memória de reconhecimento de objetos;
- vi. A inibição hipocampal farmacológica de PKC (via de atuação dos receptores D5) após a exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico não prejudica o efeito destes estímulos sob a persistência da memória de reconhecimento de objetos;
- vii. A estimulação hipocampal farmacológica de PKC (via de atuação dos receptores D5) após o bloqueio dos receptores D1/D5 e exposição à novidade ou uma sessão de exercício físico não é suficiente para manter os efeitos de ambos os estímulos sob a persistência da memória de reconhecimento de objetos.

Em conjunto, nossos dados fornecem evidências de que a estimulação farmacológica e não farmacológica do sistema dopaminérgico modula positivamente a memória, promovendo sua persistência. Demonstramos que a exposição à um novo ambiente ou à uma sessão de exercício físico imediatamente após um aprendizado promove a persistência das MLD. Além disso, observamos que ambas estratégias dependem da ativação dos receptores dopaminérgicos da família D1 (D1/D5). Mais especificamente, evidenciamos que a promoção da persistência da memória por ambos os estímulos estudados depende da ativação de PKA, mas não de PKC.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados dessa dissertação confirmaram nossas hipóteses de que a novidade e o exercício físico agudo, quando aplicados imediatamente após o aprendizado, modulam positivamente a memória, aumentando a persistência do traço mnemônico. Assim como previamente indicado na literatura, a via dos receptores D1, por ativação de PKA é fundamental para a modulação da persistência memória; enquanto a ativação de PKC, através dos receptores D5, não é essencial. A partir destes achados, surgem novas possibilidades de estudo que são importantes para o melhor entendimento de como estas estratégias atuam no sistema nervoso para modulação da memória. Assim, minhas perspectivas futuras envolvem a continuidade de trabalhos de pesquisa em colaboração com o Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Unipampa, a fim de contribuir para que outras questões sejam investigadas, tais como:

- i. Avaliar os mecanismos bioquímicos envolvidos do efeito da novidade e do exercício físico agudo sobre o sistema dopaminérgico, através da avaliação hipocampal da atividade das enzimas que participam da cascata de biossíntese das catecolaminas, como tirosina hidroxilase, dopa descaboxilase, dopamina beta-hidroxilase;
- ii. Avaliar o requerimento da ativação de áreas cerebrais envolvidas na síntese e liberação de dopamina para o efeito da novidade e do exercício físico agudo sobre a persistência da memória, como o LC e a ATV.
- iii. Avaliar o efeito da novidade e do exercício físico agudo quando aplicados na fase de consolidação tardia, 12 horas após a aquisição, sobre a persistência da memória;
- iv. Avaliar os efeitos da novidade e da estimulação de PKA sobre a memória de animais com déficit de memória relacionado à infusão intrahipocampal do peptídeo  $\beta$ -amilóide;
- v. Avaliar os efeitos do exercício físico agudo e da estimulação de PKA na modulação de um aprendizado fraco.

## REFERÊNCIAS

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00194-X)
- Abel, T., Nguyen, P. V, Barad, M., Deuel, T. A. , Kandel, E. R., & Bourtchouladze, R. (1997). Genetic Demonstration of a Role for PKA in the Late Phase of LTP and in Hippocampus-Based Long-Term Memory. *Cell*, 88(5), 615–626. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81904-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81904-2)
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Baddeley, A. (2001). The concept of episodic memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1413), 1345–1350. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0957>
- Baddeley, A. (2003). Working memory: Looking back and looking forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(10), 829–839. <https://doi.org/10.1038/nrn1201>
- Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M. C., Alen, N., & Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14599–14604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907078106>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Article Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*, 53, 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2711–2716. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711863105>
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2010). Persistence of long-term memory storage: New insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotoxicity Research*, 18(3–4), 377–385. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9155-5>
- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bouchet, C. A., Lloyd, B. A., Loetz, E. C., Farmer, C. E., Ostrovskyy, M., Haddad, N., Foright, R. M., & Greenwood, B. N. (2017). Acute exercise enhances the

consolidation of fear extinction memory and reduces conditioned fear relapse in a sex-dependent manner. *Learning and Memory*, 24(8), 358–368. <https://doi.org/10.1101/lm.045195.117>

Cantrelle, J., Burnett, G., & Loprinzi, P. D. (2020). Acute exercise on memory function: Open vs. Closed skilled exercise. *Health Promotion Perspectives*, 10(2), 123–128. <https://doi.org/10.34172/hpp.2020.20>

Chen, N., Tsai, T. C., & Hsu, K. Sen. (2020). Exposure to Novelty Promotes Long-Term Contextual Fear Memory Formation in Juvenile Mice: Evidence for a Behavioral Tagging. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02005-1>

Christiansen, L., Thomas, R., Beck, M. M., Pingel, J., Andersen, J. D., Mang, C. S., Madsen, M. A. J., Roig, M., & Lundbye-Jensen, J. (2019). The Beneficial Effect of Acute Exercise on Motor Memory Consolidation is Modulated by Dopaminergic Gene Profile. *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), 578. <https://doi.org/10.3390/jcm8050578>

Collingridge, G. L., & Bliss, T. V. P. (1987). NMDA receptors - their role in long-term potentiation. *Trends in Neurosciences*, 10(7), 288–293. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90175-5)

Daré, L. R., Garcia, A., Neves, B. H., & Mello-Carpes, P. B. (2020). One physical exercise session promotes recognition learning in rats with cognitive deficits related to amyloid beta neurotoxicity. *Brain Research*, 1744(May), 146918. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146918>

Diederich, K., Bastl, A., Wersching, H., Teuber, A., Strecker, J. K., Schmidt, A., Minnerup, J., & Schäbitz, W. R. (2017). Effects of different exercise strategies and intensities on memory performance and neurogenesis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00047>

Eckel-Mahan, K. L., Phan, T., Han, S., Wang, H., Chan, G. C., Scheiner, Z. S., & Storm, D. R. (2008). Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nature Neuroscience*, 11(9), 1074–1082. <https://doi.org/10.1038/nn.2174>

Edelmann, E., & Lessmann, V. (2018). *Dopaminergic innervation and modulation of hippocampal networks Functions of dopamine in the hippocampus in memory and emotional regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2800-7>

Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>

Ennaceur, & Delacour. (1998). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 31, 47–59.

Fernandes, J., Soares, J. C. K., do Amaral Baliego, L. G. Z., & Arida, R. M. (2016). A single bout of resistance exercise improves memory consolidation and increases the expression of synaptic proteins in the hippocampus. *Hippocampus*, 26(8), 1096–1103. <https://doi.org/10.1002/hipo.22590>

- Feyissa, D. D., Sialana, F. J., Keimpema, E., Kalaba, P., Paunkov, A., Engidawork, E., Höger, H., Lubec, G., & Korz, V. (2019). Dopamine type 1- and 2-like signaling in the modulation of spatial reference learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 362(October 2018), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.028>
- Frey, U., & Morris, R. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. In *Nature* (Vol. 385, pp. 533–536). <https://www.nature.com/articles/385533a0.pdf>
- Frick, A., Magee, J., & Johnston, D. (2004). LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nature Neuroscience*, 7(2), 126–135. <https://doi.org/10.1038/nn1178>
- Furini, C. R. G., Myskiw, J. C., Schmidt, B. E., Marcondes, L. A., & Izquierdo, I. (2014). D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behavioural Brain Research*, 271, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.027>
- Furini, C.R.G., Nachtigall, E.G., Behling, J.A.K., Assis Brasil, E.S., Saenger, B.F., Narvaes, R.F., de Carvalho Myskiw, J., Izquierdo, I. (2020). Molecular Mechanisms in Hippocampus Involved on Object Recognition Memory Consolidation and Reconsolidation. *Neuroscience* 435, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.047>
- Granado, N., Ortiz, O., Suárez, L. M., Martín, E. D., Ceña, V., Solís, J. M., & Moratalla, R. (2008). D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-induced arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cerebral Cortex*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm026>
- Hagena, H., & Manahan-Vaughan, D. (2016). Dopamine D1/D5, But not D2/D3, receptor dependency of synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses that is enabled by patterned afferent stimulation, or spatial learning. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00031>
- Hansen, N., & Manahan-Vaughan, D. (2012). Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. *Cerebral Cortex*, 24(4), 845–858. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs362>
- Hecht, F., McCaw, B. K., Peakman, D., & Robinson, A. (1975). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 255(5505), 243–244. <https://doi.org/10.1038/nature02594.1>
- Howard, E. (2001). The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural Brain Research*, 127(1–2), 199–207. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432801003655>
- Izquierdo, I. (2018). Memória. In *Porto Alegre: Artmed: Vol. 3ed.*
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00036-4)



- Jentsch, V. L., & Wolf, O. T. (2020). Acute physical exercise promotes the consolidation of emotional material. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173(January), 107252. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107252>
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
- Katche, C., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2013). Neurobiology of Learning and Memory Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.018>
- Katche, C., Tomaiuolo, M., Dorman, G., Medina, J. H., & Viola, H. (2016). Novelty during a late postacquisition time window attenuates the persistence of fear memory. *Scientific Reports*, 6(October), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep35220>
- Lee, J. L. C., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science*, 304(5672), 839–843. <https://doi.org/10.1126/science.1095760>
- Li, S., Cullen, W. K., Anwyl, R., & Rowan, M. J. (2003). Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nature Neuroscience*, 6(5), 526–531. <https://doi.org/10.1038/nn1049>
- Lima, K. R., Vargas, L. da S. de, Ramborger, B., Roehrs, R., Sevenster, D., Izquierdo, I., D’Hooge, R., & Mello-Carpes, P. B. (2019). Noradrenergic and dopaminergic involvement in novelty modulation of aversive memory generalization of adult rats. *Behavioural Brain Research*, 371(March), 111991. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111991>
- Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, 46(5), 703–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.002>
- Loprinzi, P. D., Ponce, P., & Frith, E. (2018). Hypothesized mechanisms through which acute exercise influences episodic memory. *Physiology International*, 105(4), 285–297. <https://doi.org/10.1556/2060.105.2018.4.28>
- Manns, J. R., Hopkins, R. O., Reed, J. M., Kitchener, E. G., & Squire, L. R. (2003). Recognition memory and the human hippocampus. *Neuron*, 37(1), 171–180. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01147-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01147-9)
- McClung, C. A., & Nestler, E. J. (2008). Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 3–17. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301544>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory - A century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>

Medina, J. H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research*, *192*(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.006>

Mello-Carpes, P. B., da Silva de Vargas, L., Gayer, M. C., Roehrs, R., & Izquierdo, I. (2016). Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiology of Learning and Memory*, *127*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.11.014>

Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., De Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2015). Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(13), E1652–E1658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502295112>

Moncada, D. (2017). Evidence of VTA and LC control of protein synthesis required for the behavioral tagging process. *Neurobiology of Learning and Memory*, *138*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.003>

Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(31), 12931–12936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104495108>

Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: Evidence for a behavioral tagging. *Journal of Neuroscience*, *27*(28), 7476–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007>

Moncada, D. (2017). Evidence of VTA and LC control of protein synthesis required for the behavioral tagging process. *Neurobiology of Learning and Memory*, *138*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.003>

Myskiw, J., Furini, C. R. G., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2014). Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(12), 4572–4577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400423111>

Neves, B. H. S., Barbosa, G. P. D. R., Rosa, A. C. de S., Picua, S. S., Gomes, G. M., Sosa, P. M., & Mello-Carpes, P. B. (2020). On the role of the dopaminergic system in the memory deficits induced by maternal deprivation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *173*(July). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107272>

Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Yokose, J., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A. M., Kato, F., & Inokuchi, K. (2016). Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioural tagging. *Nature Communications*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms12319>

- Okuda, K., Højgaard, K., Privitera, L., Bayraktar, G., & Takeuchi, T. (2020). Initial memory consolidation and the synaptic tagging and capture hypothesis. In *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.14902>
- Pietrelli, A., Matković, L., Vacotto, M., Lopez-Costa, J. J., Basso, N., & Brusco, A. (2018). Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *155*(May), 528–542. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.007>
- Roig, M., Skriver, K., Lundbye-Jensen, J., Kiens, B., & Nielsen, J. B. (2012). A Single Bout of Exercise Improves Motor Memory. *PLoS ONE*, *7*(9), 28–32. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044594>
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, *325*(5943), 1017–1020. <https://doi.org/10.1126/science.1172545>
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning and Memory*, *14*(1), 36–46. <https://doi.org/10.1101/lm.422607>
- Schmidt, H. L., Garcia, A., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P. B., & Carpes, F. P. (2019). Strength training and running elicit different neuroprotective outcomes in a  $\beta$ -amyloid peptide-mediated Alzheimer's disease model. *Physiology and Behavior*, *206*(January), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.04.012>
- Setlow, B. (1997). The nucleus accumbens and learning and memory. *Journal of Neuroscience Research*, *49*(5), 515–521. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970901\)49:5<515::AID-JNR1>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970901)49:5<515::AID-JNR1>3.0.CO;2-E)
- Shivarama Shetty, M., Gopinadhan, S., & Sajikumar, S. (2016). Dopamine D1/D5 receptor signaling regulates synaptic cooperation and competition in hippocampal CA1 pyramidal neurons via sustained ERK1/2 activation. *Hippocampus*, *26*(2), 137–150. <https://doi.org/10.1002/hipo.22497>
- Sosa, P. M., Neves, B. S., Carrazoni, G. S., Gomes, G. M., Rosso, G. Del, Ramborger, B. P., Rohers, R., & Mello-carpes, P. B. (2019). *Maternal Deprivation Induces Memory Deficits That Are Reduced by One Aerobic Exercise Shot Performed after the Learning Session. Md.*
- Squire, L. R. (1984). Nondeclarative Memory: Multiple Brain Systems Supporting Learning. *Neuroscience*, *4*(3), 232–243. <http://www.mitpressjournals.org/doi/abs/10.1162/jocn.1992.4.3.232>
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 13515–13522. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13515>

Stern, C., & Hasselmo, M. (2008). Recognition Memory. *Encyclopedia of Neuroscience*, 3390–3393. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\\_4977](https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_4977)

Straube, T., Korz, V., Balschun, D., & Frey, J. U. (2003). Requirement of  $\beta$ -adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *Journal of Physiology*, 552(3), 953–960. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049452>

Taylor, K. I., Moss, H. E., & Tyler, L. K. (2007). The conceptual structure account: A cognitive model of semantic memory and its neural instantiation. *Neural Basis of Semantic Memory*, May 2014, 265–301. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511544965.012>

Tomaiuolo, M., Katche, C., Viola, H., & Medina, J. H. (2015). Evidence of Maintenance Tagging in the Hippocampus for the Persistence of Long-Lasting Memory Storage. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/603672>

Tyler, W. J., & Pozzo-Miller, L. D. (2001). BDNF Enhances Quantal Neurotransmitter Release and Increases the Number of Docked Vesicles at the Active Zones of Hippocampal Excitatory Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 21(12), 4249–4258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04249.2001>

Undieh, A. S. (2010). Pharmacology of signaling induced by dopamine D1-like receptor activation. *Pharmacology & Therapeutics*, 128(1), 37–60. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.05.003>

van Dongen, E. V., Kersten, I. H. P., Wagner, I. C., Morris, R. G. M., & Fernández, G. (2016). Physical Exercise Performed Four Hours after Learning Improves Memory Retention and Increases Hippocampal Pattern Similarity during Retrieval. *Current Biology*, 26(13), 1722–1727. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.071>

Vargas, L. da S. de, Lima, K. R., Ramborger, B. P., Roehrs, R., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2020). Catecholaminergic hippocampal activation is necessary for object recognition memory persistence induced by one-single physical exercise session. *Behavioural Brain Research*, 379(July 2019), 112356. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112356>

Vargas, L. da S. de, Neves, B. H. S. das, Roehrs, R., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. (2017). One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 329(March), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.050>

Venezia, A. C., Quinlan, E., & Roth, S. M. (2017). A single bout of exercise increases hippocampal Bdnf : influence of chronic exercise and noradrenaline. *Genes, Brain and Behavior*, 16(8), 800–811. <https://doi.org/10.1111/gbb.12394>

Vinogradova, O. S. (2001). Hippocampus as comparator: Role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus*, 11(5), 578–598. <https://doi.org/10.1002/hipo.1073>

- Wang, S. H. (2018). Novelty enhances memory persistence and remediates propranolol-induced deficit via reconsolidation. *Neuropharmacology*, *141*, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.015>
- Wei, X., Ma, T., Cheng, Y., Huang, C. C. Y., Wang, X., Lu, J., & Wang, J. (2018). Dopamine D1 or D2 receptor-expressing neurons in the central nervous system. *Addiction Biology*, *23*(2), 569–584. <https://doi.org/10.1111/adb.12512>
- Weinberg, L., Hasni, A., Shinohara, M., & Duarte, A. (2014). A single bout of resistance exercise can enhance episodic memory performance. *Acta Psychologica*, *153*, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2014.06.011>
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, *313*(5790), 1093–1097. <https://doi.org/10.1126/science.1128134>
- Williams, S. N., & Undieh, A. S. (2009). Dopamine D1-like receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor protein expression. *NeuroReport*, *20*(6), 606–610. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832a0a98>
- Winograd, M., & Viola, H. (2004). Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. *Hippocampus*, *14*(1), 117–123. <https://doi.org/10.1002/hipo.10153>
- Zhang, J., Ko, S. Y., Liao, Y., Kwon, Y., Jeon, S. J., Sohn, A., Cheong, J. H., Kim, D. H., & Ryu, J. H. (2018). Activation of the dopamine D1 receptor can extend long-term spatial memory persistence via PKA signaling in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *155*(November 2017), 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.016>

## ANEXOS

### ANEXO I – Certificado de aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA da UNIPAMPA



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 033/2019

Título: Mecanismos dopaminérgicos envolvidos na modulação da memória de reconhecimento pela novidade e pelo exercício físico

Data da aprovação: 22/08/2019

Período de vigência do projeto: 22.08.2021

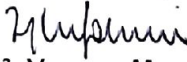
Pesquisadores(a): Pâmela Billig Mello Carpes

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 9 9661-2454

E-mail: [pamelacarpes@unipampa.edu.br](mailto:pamelacarpes@unipampa.edu.br)

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	200
Peso/Idade	300 g - 60 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério de Santa Maria

  
Prof.ª Dr.ª Vanusa Manfredini  
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA

## ANEXO II – Comprovante da submissão do manuscrito I à revista *Neurobiology of Learning and Memory*

NLM (ELS) <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
Ter, 20/10/2020 16:02

Para: pamelacarpes@unipampa.edu.br; panmello@hotmail.com

Cc: Você: anacdsdr2.aluno@unipampa.edu.br; steffaniepicua.aluno@unipampa.edu.br; sharasilva.aluno@unipampa.edu.br; nathalysoares.aluno@unipampa.edu.br

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Ms. No.: NLM-20-277

Title: Exposure to novelty after recognition learning promotes memory persistence in rats through hippocampal mechanisms that depend on D1-subtype dopamine receptors

Corresponding Author: Dr. Pamela Mello-Carpes

Authors: Karine R. Lima; Ana Carolina S. Rosa; Steffanie S. Picua; Shara S. Silva; Náthaly M. Soares;

Dear Dr. Mello-Carpes,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: NLM-20-277

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<https://ees.elsevier.com/ynlme/>

Your username is: pamelacarpes@unipampa.edu.br

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/YNLME/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/YNLME/automail_query.asp).

Thank you for submitting your work to *Neurobiology of Learning and Memory*.

Kind regards,

Bhavani Mutharasan

Journal Manager

*Neurobiology of Learning and Memory*

Email: nlm@elsevier.com

## ANEXO III – Comprovante da submissão do manuscrito II à revista *Brain Research*

De: eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> em nome de Brain Research <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Enviado: quarta-feira, 21 de outubro de 2020 16:28

Para: panmello@hotmail.com <panmello@hotmail.com>; panmello@gmail.com <panmello@gmail.com>

Assunto: Submission Confirmation

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. Mello-Carpes:

Your submission, One single physical exercise session promotes recognition memory persistence by activating dopaminergic D1 receptors in the hippocampus, article type Research paper, for *Brain Research* has been received by the Editorial Office and will be processed as soon as possible.

You may log onto EES as an Author to view your submission at any time by entering these login details:

<https://ees.elsevier.com/bres/>

Your username is: panmello@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/BRES/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/BRES/automail_query.asp)

EES can be reached at <https://ees.elsevier.com/bres/>. We would appreciate receiving any feedback you care to send us about this system, as our goal is to make the electronic submission process as expeditious and user-friendly as possible.

Kind regards,

The Brain Research Editorial Office