

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

ANDRESSA RADISKE

**Caracterização dos processos bioquímicos e farmacológicos da
reconsolidação da memória de extinção**

Porto Alegre

2011

ANDRESSA RADISKE

**Caracterização dos processos bioquímicos e farmacológicos da
reconsolidação da memória de extinção**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre
2011

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

R129c Radiske, Andressa

Caracterização dos processos bioquímicos e farmacológicos da reconsolidação da memória de extinção / Andressa Radiske. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

45 f.: il. tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. MEMÓRIA. 2. RECONSOLIDAÇÃO. 3. EXTINÇÃO. 4. REMEMORAÇÃO MENTAL. 5. APRENDIZAGEM DA ESQUIVA. 6. HIPOCAMPO. 7. MODELOS BIOLÓGICOS. 8. RATOS WISTAR. 9. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. I. Cammarota, Martín. II. Título.

C.D.D. 612.8
C.D.U. 612.821.2:599.323.4(043.3)
N.L.M. WL 104

*“Sendo óbvio que habitamos fisicamente um espaço, sentimentalmente
somos habitados por uma memória.”*

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo **Prof. Dr. Martín Cammarota** - por quem tenho muita admiração, carinho e orgulho - pois foi ao lado desse brilhante neurocientista que aprendi, na prática, o verdadeiro significado da palavra Ciência. Agradeço pelo empenho e dedicação na realização desse trabalho.

A **Profª. Drª. Janine Rossato**, grande amiga e exemplo de pesquisadora. Agradeço pela sua grande contribuição em todas as etapas na realização deste trabalho.

A **Profª. Drª. Lia Bevilaqua** obrigada pelos conselhos e ensinamentos diários.

Ao **Prof. Dr. Iván Izquierdo**, por proporcionar-me a oportunidade de fazer parte do Centro de Memória.

Aos colegas e amigos do Centro de Memória, obrigada a todos pelo companheirismo, apoio, amizade e pelos tantos momentos de diversão, que jamais serão esquecidos: **Ramón, Julia, Siomara, Natália, Cristiano, Weber, Juliana, Cristiane, Gerard e Jociane**. Vocês com certeza compõem o melhor grupo de trabalho. É muito bom dividir meus dias com vocês.

A PUCRS e o CNPq pelo financiamento da minha bolsa de estudos.

Muito Obrigada

Andressa Radiske

RESUMO

A expressão de uma memória já consolidada pode levar à ocorrência de dois processos opostos, que requerem a síntese *de novo* de proteínas nas mesmas áreas do cérebro: a extinção e a reconsolidação. A extinção debilita a expressão da memória original, enquanto que a reconsolidação permite a incorporação de nova informação a ela. O conhecimento acerca destes dois processos acumulou-se durante os últimos anos, porém a possível interação entre ambos ainda não foi avaliada. Neste trabalho demonstramos que a inibição da síntese protéica e expressão gênica hipocampal imediatamente após a reativação prejudicam a expressão da memória de extinção sem afetar a memória original aversiva. A partir desses dados, sugere-se que, assim como a reconsolidação, a memória de extinção após a reativação também requer a participação de síntese protéica e expressão gênica para sua manutenção na região CA1 do hipocampo.

Palavras-Chave: Reconsolidação, extinção, evocação, hipocampo

ABSTRACT

The nonreinforced expression of long-term memory may lead to two opposite protein synthesis-dependent processes: extinction and reconsolidation. Extinction weakens consolidated memories, whereas reconsolidation allows incorporation of additional information into them. Knowledge about these two processes has accumulated in recent years, but their possible interaction has not been evaluated yet. Here, we report that inhibition of protein synthesis and gene expression in the CA1 region of the dorsal hippocampus after retrieval of fear extinction impairs subsequent reactivation of the extinction memory trace without affecting its storage or that of the initial fear memory. Our results suggest that extinction memory is susceptible to a retrieval-induced process similar to reconsolidation in the hippocampus.

Key-words: Reconsolidation, extinction, retrieval, hippocampus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. A inibição da síntese protéica hipocampal logo após a reativação do traço impede a persistência da memória de extinção de medo condicionado.....	21
Figura 2. A inibição da síntese protéica hipocampal logo após a reativação do traço impede a persistência da memória de extinção do medo condicionado.....	22
Figura 3. A inibição da síntese protéica hipocampal 6 h após a reativação do traço não impede a persistência da memória de extinção do medo condicionado.....	23
Figura 4. A inibição da síntese protéica hipocampal logo após a reativação do traço impede a persistência da memória de extinção do medo condicionado.....	24
Figura 5. A inibição da síntese protéica hipocampal após a reativação realizada 7 dias após a última sessão de extinção impede a persistência da memória de extinção de medo condicionado.....	25
Figura 6. A inibição da síntese protéica hipocampal na ausência de um estímulo relevante não afeta a retenção da memória de extinção.....	26
Figura 7. A inibição da síntese protéica hipocampal na ausência de um estímulo relevante não afeta a retenção da memória de extinção.....	27
Figura 8. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua expressão.....	28
Figura 9. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção dentro de uma janela de tempo restrita após sua expressão.....	29
Figura 10. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua reativação.....	30
Figura 11. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua reativação.....	31
Figura 12. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua reativação.....	32
Figura 13. A expressão da proteína BDNF aumenta após a reativação.....	33

Figura 14. A expressão da proteína Tubulina não se altera após a reativação.....	34
Figura 15. A funcionalidade de BDNF é necessária para a manutenção da memória de extinção imediatamente após sua reativação.....	35
Figura 16. A funcionalidade de BDNF é necessária para a manutenção da memória de extinção imediatamente, mas não 6h após sua reativação.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Infusões de VEH, ANI, EME, CHX, AMANI, A-BDNF na região CA1 do hipocampo dorsal não apresentam efeito sobre as atividades locomotoras e exploratória ou sobre o estado de ansiedade.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMA - α -Amanitina

ANI – anisomicina

BDNF - *brain- derived neurotrophic factor*

cm – centímetros

CHX - cicloheximida

EC – estímulo condicionado

e col. – e colaboradores

EI - esquiiva inibitória

EME - emetina

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

Fig – figura

g – gramas

h – horas

i.p. – intraperitoneal

Kg - quilogramas

mA – mili-ampéres

mg - miligramas

min - minutos

mm - Milímetros

seg - segundos

Tr – treino

T1 – teste 1

T2 – teste 2

Veh – veículo

μ g - microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Animais Experimentais.....	15
3.2. Cirurgia Estereotáxica.....	15
3.3. Manipulação.....	15
3.4. Protocolos Experimentais	16
3.5. Tratamentos Farmacológicos.....	18
3.6. Experimentos bioquímicos	19
3.7. Immunoblot	19
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
9. ANEXO 1:.....	46

1. INTRODUÇÃO

As memórias são o produto do processo que denominamos aprendizado. Elas armazenam representações psíquicas de circunstâncias passadas que podem ser expressas posteriormente. Sendo assim, a evocação das memórias é fundamental para a sobrevivência, já que esse processo é o que nos permite utilizar, consciente ou inconscientemente, a informação adquirida para responder e adaptar-nos aos desafios que o ambiente nos apresenta ao longo da vida. Porém, há evidências indicando que as memórias após serem evocadas tornam-se instáveis e, para persistirem, devem passar por um processo de re-estabilização dependente da síntese proteica denominado reconsolidação (Przybylski & Sara, 1997). Esse processo não é simplesmente a repetição da consolidação inicial, mas sim um mecanismo independente com um objetivo biológico específico: atualizar uma informação previamente armazenada com relação às modificações ambientais ou internas do indivíduo e assim determinar sua persistência (Cammarota et al., 2003). No entanto, quando a evocação do traço ocorre de maneira repetida na ausência do estímulo incondicionado que levou a sua formação, a memória em questão pode sofrer um processo denominado extinção (Pavlov, 1927) que se caracteriza pela diminuição da amplitude e/ou da frequência de emissão da resposta aprendida, o qual também requer síntese de proteínas em áreas específicas do cérebro (Rossato, 2006).

Os processos de reconsolidação e extinção estão relacionados funcionalmente, pois ambos baseiam-se na aquisição de informação sobre o que acontece no momento da expressão, informação que, por sua vez, está associada ao aprendizado original. Contudo, eles apresentam mecanismos distintos: a extinção envolve um novo aprendizado que debilita o acesso à memória inicial (Quirk & Mueller, 2008; Pape & Pare, 2010) enquanto que a reconsolidação permite sua modificação através da adição de uma nova informação presente no momento da reativação (Hupbach et al., 2007; Lee, 2008; Nader & Hardt, 2009; Forcato et al., 2010). Apesar de que, o conhecimento acerca das propriedades bioquímicas e comportamentais da

extinção e reconsolidação tem se aprofundado nos últimos anos, a existência de uma possível interação entre ambos os processos ainda é controversa

Assim, tem sido reportado que a ocorrência de extinção é um dos fatores que limitam, ou de fato impedem a reconsolidação de memórias (Debiec et al., 2002; Sangha et al., 2003; Pedreira & Maldonado, 2003; Suzuki et al., 2004). Entretanto, outros trabalhos mais recentes indicam que a reconsolidação de respostas aversivas não é afetada pela extinção da memória inicial (Duvarci et al., 2006), sugerindo que a extinção e reconsolidação são processos independentes. Entretanto, a possível existência de reconsolidação para a memória de extinção nunca foi avaliada.

Devido à relevância clínica que o bloqueio da reconsolidação e o fortalecimento da extinção podem ter (Monfils et al., 2009; Schiller et al., 2010), decidimos analisar o efeito da administração intra hipocampal de inibidores de síntese protéica e da expressão gênica após a reativação da memória de extinção. Os resultados apóiam a hipótese de que esses tratamentos não apagam a memória de extinção, mas afetam um mecanismo necessário para a formação de sua representação no momento da evocação, semelhante à reconsolidação no hipocampo, que torna a memória suscetível ao processo de reativação. Esse mecanismo é independente das idades da memória original e da memória de extinção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é, portanto, caracterizar farmacológica e bioquimicamente a participação do hipocampo na reconsolidação da memória de extinção.

2.2. Objetivos Específicos

1. Estudar a natureza da amnésia induzida pela inibição da síntese protéica hipocampal após a expressão da memória de extinção com o intuito de determinar se a mesma é conseqüente ao bloqueio persistente da evocação ou a supressão do traço mnemônico.

2. Estudar a influência da idade da memória aversiva original e da memória de extinção na reconsolidação desta última.

3. Investigar a participação de proteínas envolvidas na manutenção da memória de extinção após a reativação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando em média 320 g. Os animais foram mantidos em caixas moradias contendo 5 animais cada, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23°C), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h, com água e comida *ad libitum*; que foram adquiridos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos no biotério do Centro de Memória no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Foram tomadas precauções com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

3.2. Cirurgia Estereotáxica

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0 mm acima do hipocampo, seguindo as coordenadas (AP -4,2 mm, LL \pm 3,0 mm, DV -2,0 mm) do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com Xilazina (“Coopazine”; Coopers), administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Uma vez recuperados da anestesia, os animais eram recolocados em suas caixas-moradia, sem ter ocorrido troca entre os mesmos em cada caixa ao longo de todo o experimento.

3.3. Manipulação

Quatro dias após a cirurgia, os animais foram submetidos a duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da caixa-moradia e manuseados durante 5 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

3.4. Protocolos Experimentais

3.4.1. Esquiva inibitória

A esquiva inibitória baseia-se no aprendizado associativo estabelecido por Pavlov. Trata-se de um paradigma de condicionamento ao medo muito utilizado, no qual o estímulo condicionado é a parte segura da caixa, a plataforma, o estímulo incondicionado é um choque nas patas do animal quando o mesmo desce da plataforma e a resposta condicionada é permanecer na área segura, resultando no aumento da latência de descida da plataforma após a exposição ao estímulo incondicionado (Cammarota et al., 2004; Bevilaqua et al., 2003).

O aparato utilizado na tarefa de esquiva inibitória consiste em uma caixa nas dimensões 50 x 25 x 25 cm (L x A x C), com uma plataforma do lado esquerdo, medindo 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm de comprimento, e barras metálicas que constituem o assoalho da caixa e podem conduzir corrente elétrica. Durante a sessão de treino os animais (Ratos Wistar machos de 3 meses de idade) foram colocado na plataforma, quando o animal desceu da plataforma para explorar o restante da caixa de treino e, no momento em que colocou suas quatro patas sobre a grade, ele recebeu um choque elétrico (0,4 mA por 2 s). Assim, em apenas uma sessão, os animais aprenderam a não descer da plataforma para evitar o choque. Para extinguir a memória de esquiva, os animais foram submetidos a uma sessão diária de evocação não-reforçada durante 5 dias consecutivos (Cammarota et al., 2003). Para isto os animais foram colocados na plataforma da caixa de treino, quando eles descenderam da mesma não receberam o choque e foi permitido explorar a caixa de treino durante 30 segundos. Durante a sessão de reativação, realizada no 6º dia, os animais foram colocados na plataforma da caixa de treino e ao descer eles foram retirados imediatamente da mesma, após este processo eles foram submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos em diversos tempos. O procedimento utilizado na sessão de teste era idêntico ao empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para as sessões de treino e teste foram adotados tempos máximos de descida, sendo 30 segundos para a sessão de treino e 300

segundos para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua caixa moradia, aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 30 segundos foram eliminados do estudo. Os testes foram realizados 24h ou 160h após a reativação da memória.

No momento da infusão da droga, uma agulha de infusão 30-gauge era colocada dentro da cânula implantada. As infusões (0,5µL/lado) se davam ao longo de 60 segundos e a agulha de infusão ficava no lugar por mais 60 segundos para evitar refluxo. A localização exata do implante das cânulas foi verificada post mortem através de análise histológica.

3.4.2. Campo Aberto

A fim de verificar se a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais não estavam alterados devido aos tratamentos farmacológicos, utilizou-se a tarefa denominada de campo aberto. O aparelho utilizado nesta tarefa consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente, sendo o assoalho da caixa dividido em 12 quadrantes iguais. Vinte e quatro horas após a infusão do fármaco na BLA, o animal era colocado na arena do campo aberto e deixado ali para explorar a caixa livremente por 5 minutos. Foram registrados o número de linhas cruzadas e o número de elevações (em inglês rearings), e tomados como indicadores de locomoção e atividade exploratória respectivamente (Bonini et al., 2006).

3.4.3. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado constitui um modelo animal utilizado em estudos para a compreensão de processos neurobiológicos associados à ansiedade (Da Silva et al., 2006). O aparato consiste em dois braços abertos, medindo 50 x 10 cm, dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes laterais desprovidas de teto, medindo 50 x 10 x 40 cm. O labirinto fica elevado a uma altura de 1 metro do chão.

No intuito de verificar possíveis alterações causadas pela infusão dos fármacos no estado de ansiedade dos animais, 24 horas após a administração farmacológica os mesmos eram colocados no centro do labirinto em cruz elevado e ficavam livres para explorá-lo. Durante uma sessão de 5 minutos, foi registrado o número total de entradas nos quatro braços, bem como o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (Bevilaqua et al., 2003; Kerr et al., 2005).

3.4.4. Análise Histológica

A verificação do posicionamento anatômico das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada post mortem. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam a infusão de 1 µl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das mesmas cânulas utilizadas para aplicação das drogas. Quinze minutos depois da infusão, os animais foram sacrificados por decapitação, seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias. Posteriormente, procedeu-se a análise histológica. Somente animais com a localização correta das cânulas foram considerados na análise estatística dos dados.

3.5. Tratamentos Farmacológicos

Os Fármacos utilizados neste estudo foram AMA (α -Amanitina) Inibidor da polimerase II e III do RNA eucarioto; Anti-BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) Inibidor da funcionalidade da proteína BDNF; ANI (Anisomicina) Inibe a síntese protéica por impedir a atividade da enzima peptidil transferase; EME (Emetina) Induz a apoptose; CHX (cicloheximida) inibe a tradução em eucariotos resultando na morte celular.

Os fármacos foram preparados imediatamente antes do uso, a fim de evitar degradação, os mesmos foram dissolvidos em DMSO ou solução salina 0,9% e armazenados protegidos da luz, a -20°C até o momento do uso.

Instantes antes da administração, uma alíquota era degelada e diluída até a concentração de trabalho com 0,1% de DMSO em salina (pH 7.2).

As doses utilizadas foram determinadas baseadas em experimentos pilotos e estudos prévios mostrando o efeito de cada composto sobre o aprendizado ou desempenho comportamental.

Para a realização do tratamento farmacológico utilizou-se uma micro-seringa Hamilton, acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Foram infundidos bilateralmente 0,5 µl/lado dos fármacos ou seu veículo (0,1% DMSO em solução salina 0,9%) a uma velocidade de 0,5 µl/min com o auxílio de uma bomba de infusão (KDScientific). Ao término, a agulha de infusão era deixada no local por 60 segundos adicionais para evitar refluxo.

3.6. Experimentos bioquímicos

Nos experimentos bioquímicos foram utilizados 3 grupos controles: 1) Controle Absoluto total: animais que não receberam nenhum estímulo experimental e que foram utilizados como referência em todos os experimentos bioquímicos; 2) Controle (TR): animais que foram treinados na tarefa de EI porém, não foram submetidos ao protocolo de extinção e reativação; 3) Controle (EXT): animais que foram treinados na tarefa de EI e submetidos ao protocolo de extinção, porém não foram submetidos à reativação da memória realizada 24h após a última sessão de extinção; 4) animais treinados e sacrificados em diferentes tempos após a reativação.

3.7. Immunoblot

A separação eletroforética de proteínas foi realizada através de técnicas convencionais. A detecção imunológica das proteínas eletrotransferidas a membranas de PVDF foi realizada utilizando anticorpos secundários acoplados a peroxidase e um sistema quimioluminescente.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados obtidos na tarefa de esquiva inibitória foram utilizados testes de estatística paramétrica, sendo eles: ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. Para a análise dos dados das tarefas de campo aberto e do labirinto em cruz elevado foi utilizado teste t de Student. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A análise estatística foi realizada utilizando o software Prism Graph-Pad 5.1.

5. RESULTADOS

A fim de analisar o efeito da durabilidade da memória de extinção, animais foram treinados na tarefa da esQUIVA INIBITÓRIA DE SESSÃO ÚNICA (EI) conforme descrito na metodologia e, foram submetidos ao protocolo de extinção (ver metodologia). Conforme podemos observar na Figura 1, se o procedimento de extinção é repetido diariamente durante cinco dias, a resposta de descer da plataforma, ou seja, a latência de descida diminui gradativamente, resposta esta que perdura por até 14 dias, demonstrando que a memória de extinção obtida de acordo com nosso protocolo não sofre recuperação espontânea.

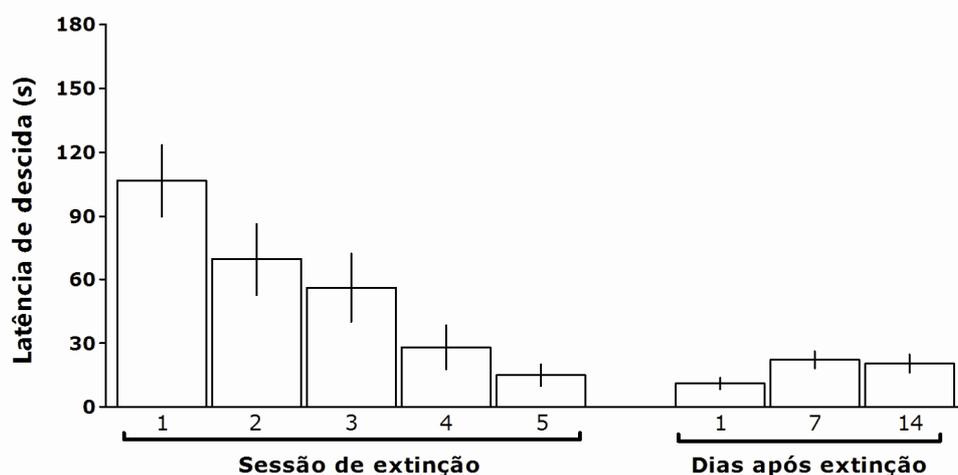


Figura 1. A memória de extinção do medo condicionado não sofre recuperação espontânea. Ratos Wistars foram treinados na tarefa de EI com um choque de 0,4mA durante 2 segundos, 24 h após os treino eles foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. A retenção da memória foi avaliada em um teste realizado 1, 7 ou 14 dias depois da última sessão de extinção. (n = 12/10 por grupo). Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida.

Ao ser verificado que a memória aversiva após ser submetida à extinção não sofre recuperação espontânea, foi investigado se a inibição de síntese protéica hipocampal após a reativação (sessão extra de extinção) da memória de extinção afeta a persistência da mesma. Para tal, ratos Wistar machos foram treinados na EI e submetidos ao protocolo de extinção.

Imediatamente (Figura 2) ou 6 horas (Figura 3) após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais na região CA1 do hipocampo dorsal de veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) ou do inibidor da síntese protéica anisomicina (ANI; 160 µg/lado). A expressão da memória de extinção foi avaliada em um teste, sem reforço, 3, 24 ou 168 horas após a reativação. De acordo com a Figura 2 e 3, os animais tratados com VEH lembraram perfeitamente da memória de extinção (o que é demonstrado pela latência baixa) em todos os tempos em que foram testados. A ANI quando dada imediatamente após a reativação da memória de extinção para o aprendizado em esquiva inibitória (Figura 2), mas não 6 horas depois (Figura 3), impediu a retenção futura da mesma e permitiu o reaparecimento da memória aversiva original. Este efeito observou-se apenas quando os animais foram testados 24 h ou 168 h, mas não 3 h após a reativação, indicando que a inibição da síntese protéica hipocampal logo após a reativação não afeta a retenção da memória de curta duração e sugerindo então que o efeito amnésico demonstrado para a memória de longa duração se deve efetivamente ao bloqueio do processo de manutenção da memória após sua reativação.

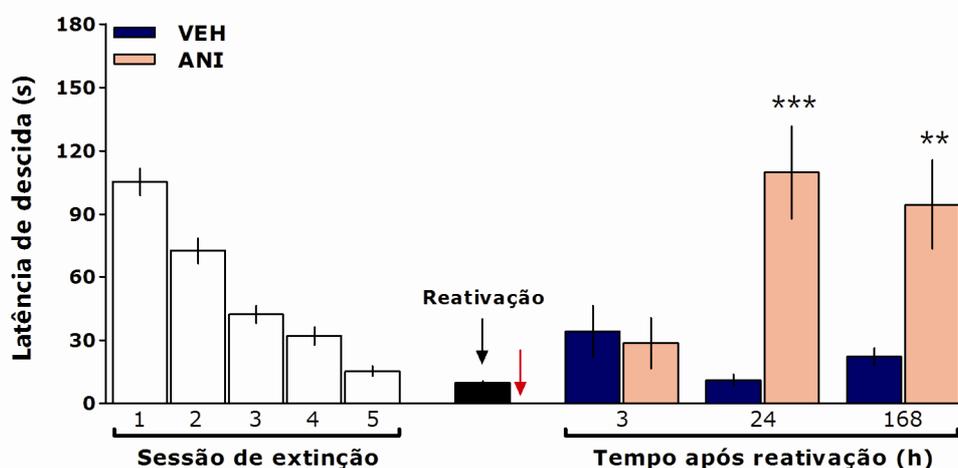


Figura 2. A inibição da síntese protéica hipocampal logo após a reativação do traço impede a persistência da memória de extinção do medo condicionado. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia mais tarde a memória de extinção foi reativada, logo após os animais receberam injeções bilaterais de veículo (VEH) ou anisomicina (ANI; 160 µg/lado) na região CA1 do

hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi avaliada 3, 24 ou 168 h mais tarde. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

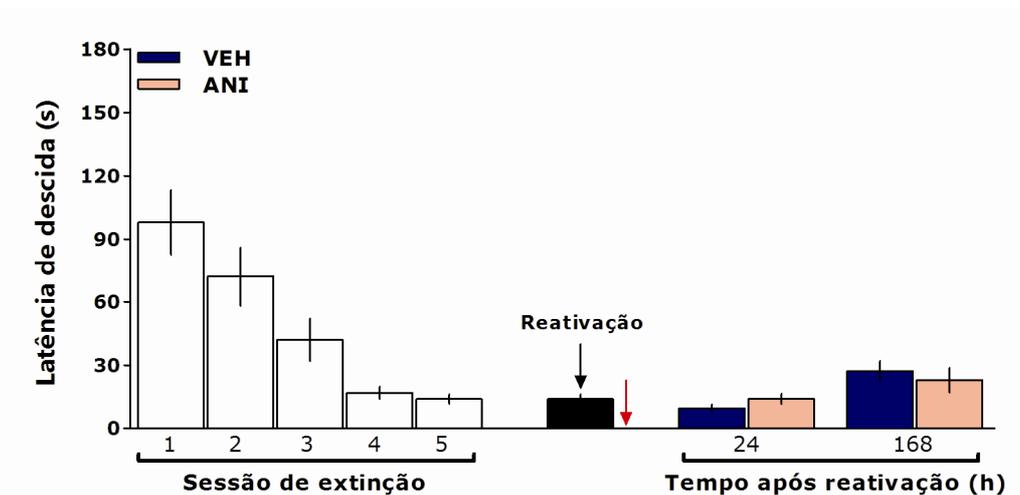


Figura 3. A inibição da síntese protéica hipocampal 6 h após a reativação do traço não impede a persistência da memória de extinção do medo condicionado. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia mais tarde a memória de extinção foi reativada, 6h após os animais receberam injeções bilaterais de veiculo (VEH) ou anisomicina (ANI; 160 μ g/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi avaliada 24 ou 168 h mais tarde. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

A ANI é um inibidor de síntese protéica que atua no bloqueio da enzima peptidil transferase em ribossomos eucariotos. Decidiu-se então, investigar o efeito de outros inibidores de síntese protéica que atuam por mecanismos distintos. A emetina (EME; 20 μ g/lado) que atua na indução da apoptose e a cicloheximida (CHX; 50 μ g/lado) que inibe a tradução em eucariotos resultando na morte celular. Animais treinados e submetidos ao protocolo de extinção receberam na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após a reativação, infusões bilaterais de VEH, EME, ou CHX e tal como no experimento anterior, foram testados 3, 24 ou 168 horas após a reativação.

Como pode se observar na figura 4, os animais tratados com VEH possuem memória de extinção, enquanto que o tratamento com EME ou CHX impediu a retenção futura da mesma e permitiu o reaparecimento da memória aversiva original, somente quando os animais foram testados 24 ou 168 horas depois da reativação. Esses resultados indicam que independentemente do fármaco utilizado para inibir síntese protéica após a reativação da memória de extinção, observou-se a perda da mesma com a concomitante reaparição da memória aversiva original.

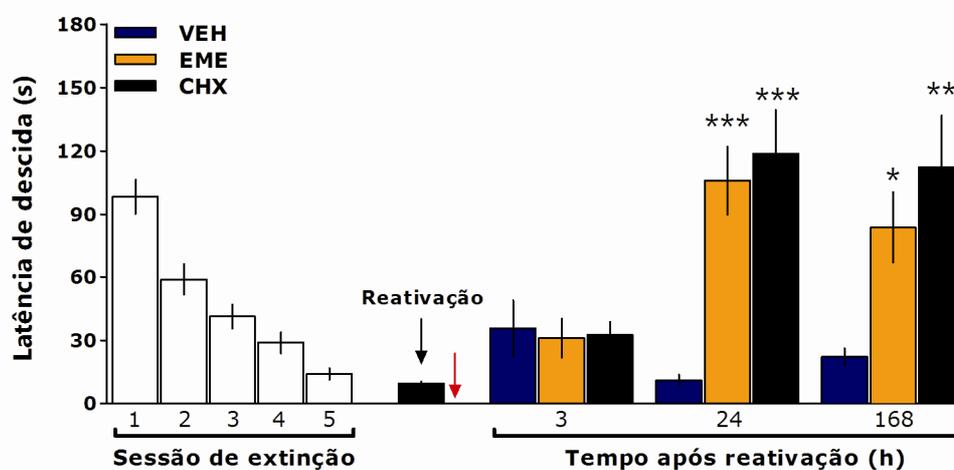


Figura 4. A inibição da síntese protéica hipocampal logo após a reativação do traço impede a persistência da memória de extinção do medo condicionado. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia mais tarde a memória de extinção foi reativada, logo após os animais receberam injeções bilaterais de veiculo (VEH), emetina (EME; 50 µg/lado) ou cicloheximida (CHX; 20 µg/lado) em lugar de ANI. na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi avaliada 3, 24 ou 168 h mais tarde. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

Estudos sugerem que os efeitos pós-evocação de alguns agentes amnésicos dependem da duração da sessão de reativação e da idade do traço mnemônico. Decidiu-se então, analisar se a reativação de um traço envelhecido estaria suscetível aos efeitos da inibição de síntese protéica. Para tal, animais foram treinados e submetidos ao protocolo de extinção, sete dias após o último dia de extinção a memória foi reativada e imediatamente após os animais receberam infusões bilaterais de VEH, ANI, EME ou CHX e foram testadas 24 horas mais tarde. Como podemos observar na Figura 5, os animais que receberam infusão de VEH continuam recordando da memória de extinção, enquanto que os animais tratados com os diferentes inibidores de síntese protéica mostram uma perda da memória de extinção onde a memória original reaparece. Esses resultados indicam que um traço mnemônico mais velho também é suscetível ao bloqueio de expressão através da infusão de inibidores de síntese protéica.

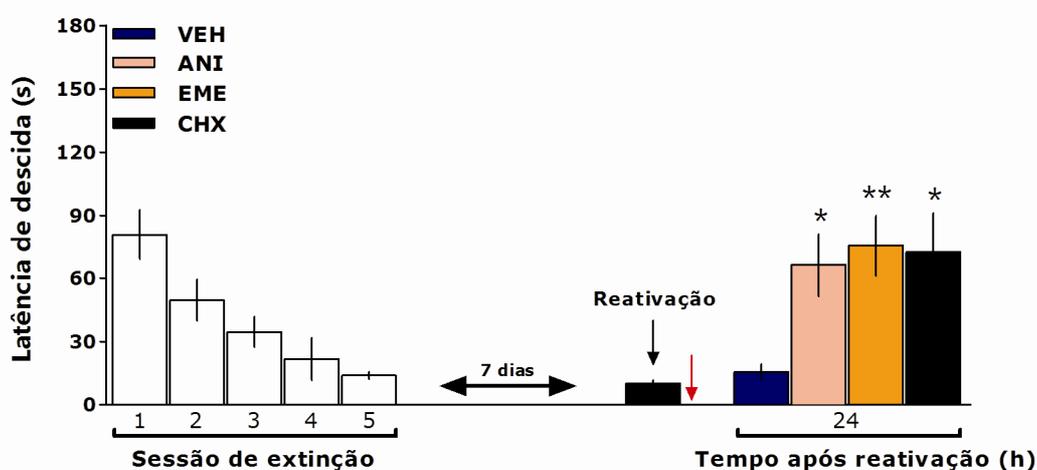


Figura 5. A inibição da síntese protéica hipocampal após a reativação realizada 7 dias após a última sessão de extinção impede a persistência da memória de extinção do medo condicionado. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. 7 dias mais tarde a memória de extinção foi reativada, logo após os animais receberam injeções bilaterais de veiculo (VEH), anisomicina (ANI; 160 µg/lado), emetina (EME; 50 µg/lado) ou cicloheximida (CHX; 20 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi avaliada 24 h mais tarde.

Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

Para descartar a possibilidade de que os inibidores de síntese protéica (ANI, EME ou CHX) estivessem provocando algum prejuízo na funcionalidade hipocampal, e que este fosse à causa da amnésia observada, animais foram treinados e submetidos ao protocolo de extinção. Um ou sete dias após o término da extinção os animais receberam infusão bilateral na região CA1 do hipocampo dorsal de VEH, ANI, EME ou CHX e 24 horas mais tarde foram submetidos a uma sessão de teste. Como se pode observar na Figura 6 e 7, a infusão intra-hipocampal de ANI, EME ou CHX, por si só, não produz qualquer alteração na retenção do traço mnemônico. O fato de que estes inibidores da síntese protéica não tenham efeito na retenção do traço quando administrados na ausência de um comportamento relevante, sugere que a expressão não reforçada da memória de medo associada à EI inicia um processo reconsolidatório dependente da síntese protéica hipocampal.

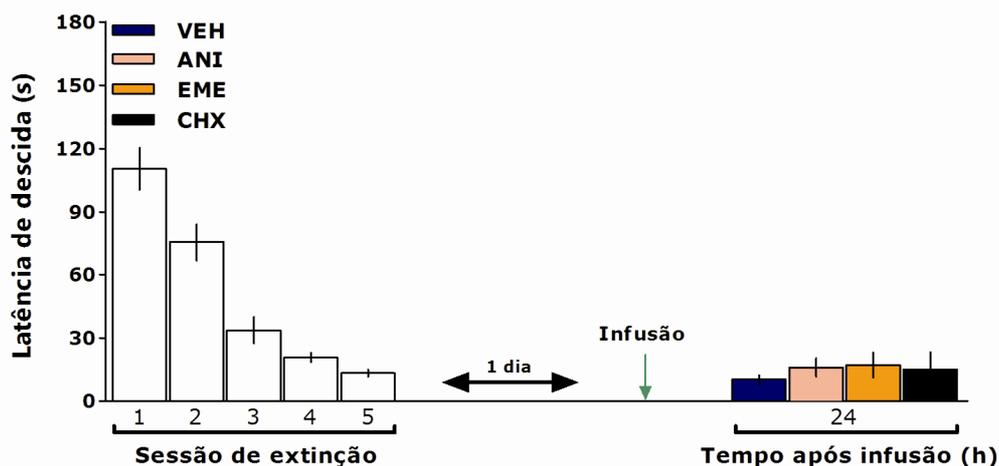


Figura 6. A inibição da síntese protéica hipocampal na ausência de um estímulo relevante não afeta a retenção da memória de extinção. Ratos Wistars treinados na tarefa de EI foram submetidos a cinco sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia após a última sessão, os animais

receberam infusões bilateral de VEH, ANI, EME, ou CHX na região CA1 do hipocampo dorsal. A Retenção foi avaliada 24 h depois. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

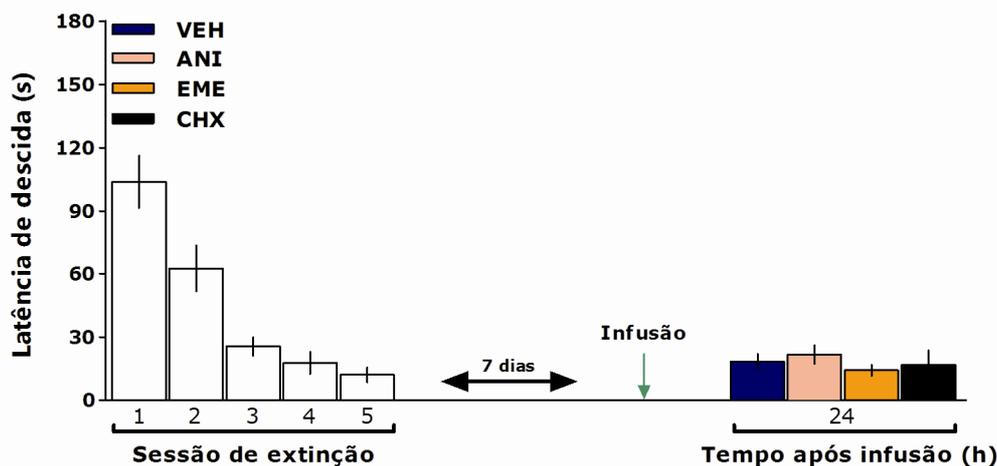


Figura 7. A inibição da síntese protéica hipocampal na ausência de um estímulo relevante não afeta a retenção da memória de extinção. Os animais foram tratados exatamente como em 3A, exceto que as drogas foram infundidas 7 dias após a última sessão de extinção ($n = 12/10$ por grupo). Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

O conjunto de experimentos acima descritos sugere que a memória de extinção quando reativada se torna suscetível à ação de inibidores de síntese protéica que impedem a expressão da mesma e fazem com que a memória aversiva original reapareça.

Depois de demonstrado o efeito da inibição da síntese protéica na manutenção da memória de extinção após sua evocação, foi verificado se a inibição da expressão gênica hipocampal após a reativação desta memória afeta sua persistência. Para tanto, animais foram treinados na EI e submetidos ao protocolo de extinção durante cinco dias. Um dia mais tarde, os animais foram reativados e logo após foram tratados com VEH ou um inibidor de transcrição gênica, α -amanitina (AMA; 50 μ M). Os animais foram testados 3, 24

ou 168 horas após a infusão dos fármacos. Como observado na Figura 8, os animais que receberam infusão bilateral intra-CA1 de VEH lembraram a memória de extinção em todos os tempos analisados, enquanto que os animais tratados com AMA não evocaram a memória de extinção quando testados 24 ou 168 horas, mas não 3 horas após a reativação. É sabido que, uma das diferenças mais notáveis entre as memórias de longa (LTM) e de curta duração (STM) é sua sensibilidade à ação de inibidores da síntese protéica e transcrição gênica. A partir desta diferença entre LTM e STM foi avaliado se o efeito amnésico da AMA devia-se efetivamente à inibição da memória de extinção consolidada ou, pelo contrário, devia-se simplesmente a um efeito inibitório sobre a capacidade de expressão do traço.

Este bloqueio da expressão da memória de extinção é observado com a concomitante reaparição da memória aversiva original. Estes resultados indicam que além da síntese protéica, a expressão gênica também é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua expressão.

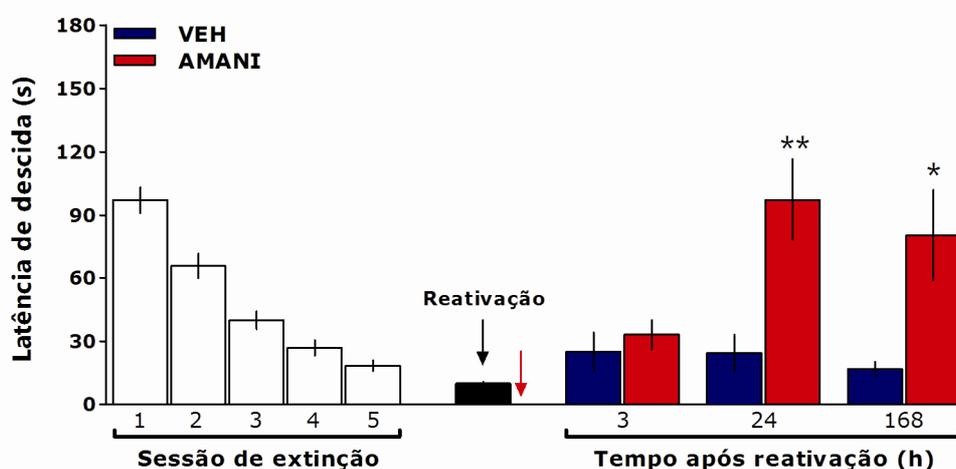


Figura 8. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua expressão. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia mais tarde a memória de extinção foi reativada, logo após os animais receberam injeções bilaterais de veiculo (VEH) ou α -amanitina (AMANI; 50 μ M) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi

avaliada 3, 24 ou 168 h mais tarde. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

Para analisar a janela temporal do efeito amnésico da AMA após expressão da memória de extinção, os animais foram treinados e submetidos ao protocolo de extinção. Um dia depois se realizou a reativação da memória de extinção e seis horas mais tarde os animais foram tratados com VEH ou AMA. De acordo com o que se observa na Figura 9, tanto os animais controles quanto os AMA recordaram da memória de extinção, indicando que a expressão gênica é necessária para a manutenção desta dentro de uma janela de tempo restrita que pode ir até perto de 6 horas.

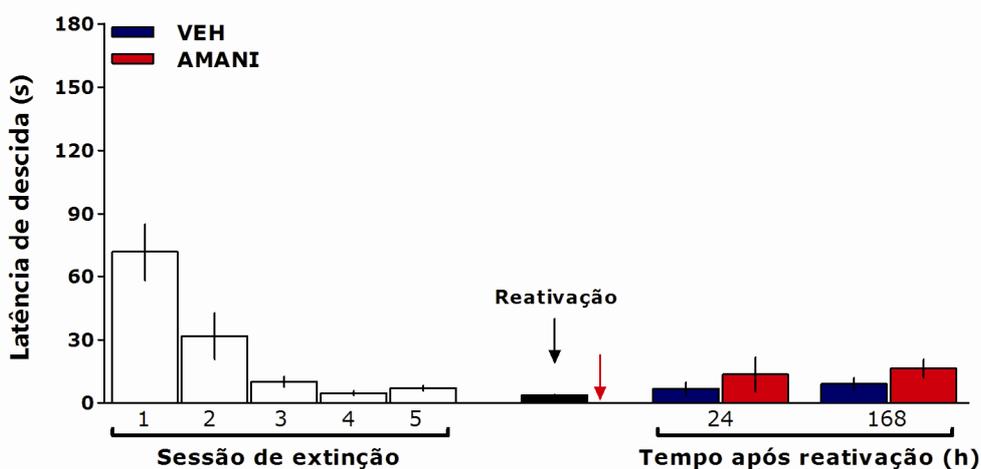


Figura 9. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção dentro de uma janela de tempo restrita após sua expressão. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia mais tarde a memória de extinção foi reativada, 6 h após os animais receberem injeções bilaterais de veiculo (VEH) ou α -amanitina (AMANI; 50 μ M) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi avaliada 24 ou 168 h mais tarde. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

Como citado e demonstrado anteriormente, a idade do traço mnemônico após a reativação pode afetar a suscetibilidade deste à ação de agentes amnésicos. Neste experimento mostrou-se que a infusão intra-hipocampal de VEH ou AMA após a reativação do traço da memória de extinção envelhecido exerce algum efeito na manutenção deste. Observando-se a Figura 10, pode ser percebido que a infusão de AMA afeta a manutenção do traço após este ser reativado, onde foi observado o reaparecimento da memória original.

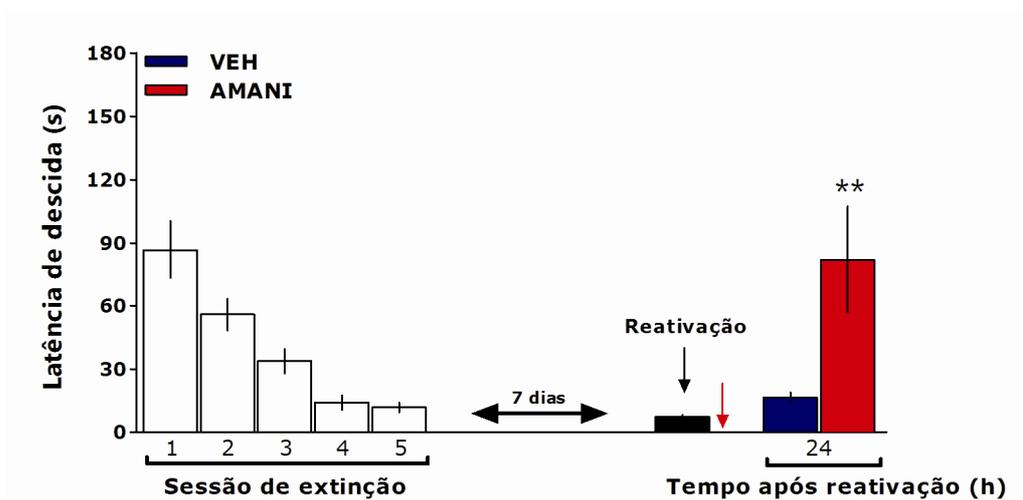


Figura 10. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua reativação. Ratos Wistars treinados na tarefa de EI foram submetidos a cinco sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. 7 dias após a última sessão, os animais receberam, imediatamente após a reativação, infusões bilaterais de veículo (VEH) ou α -amanitina (AMANI; 50 μ M) na região CA1 do hipocampo dorsal. A Retenção foi avaliada 24 h depois. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

Para determinar se a infusão intra-hipocampal de AMA um (Figura 11) ou sete (Figura 12) dias após a extinção afeta a manutenção da mesma, foram

treinados animais na EI que foram submetidos ao protocolo de extinção. Um dia ou sete dias após a extinção os animais receberam infusão intra-hipocampal de AMANI e foram testados 24 horas mais tarde. De acordo com as Figuras 11 e 12, observa-se que a infusão de AMANI por si só não afeta a manutenção da memória de extinção, indicando que a amnésia observada nos experimentos anteriores se deve a um bloqueio real da persistência da memória de extinção após sua reativação.

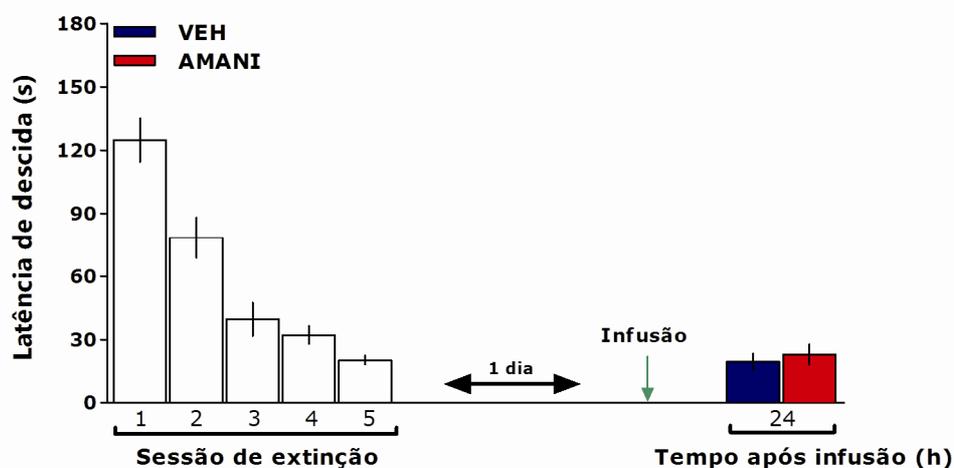


Figura 11. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua reativação. Ratos Wistars treinados na tarefa de EI foram submetidos a cinco sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. 24h após a última sessão, os animais receberam infusões bilaterais de veículo (VEH) ou α -amanitina (AMANI; 50 μ M) na região CA1 do hipocampo dorsal. A Retenção foi avaliada 24 h depois. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

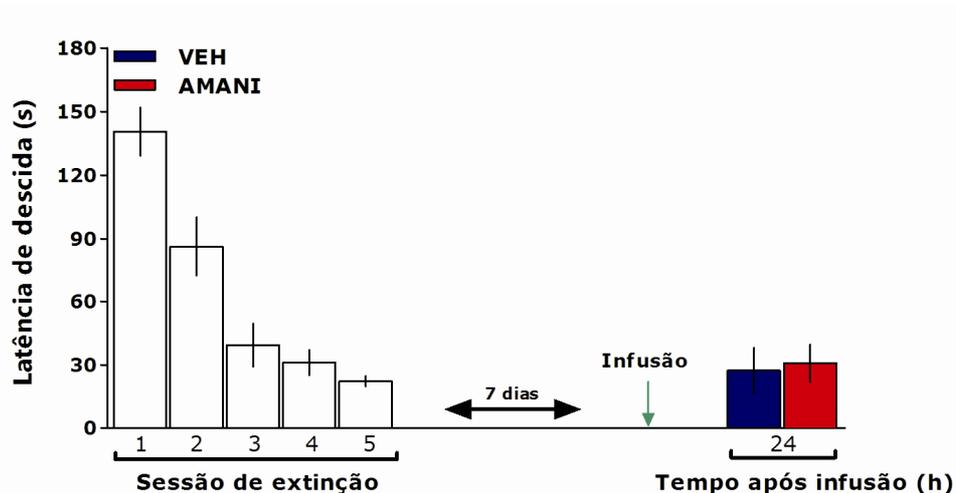


Figura 12. A expressão gênica hipocampal é necessária para a manutenção da memória de extinção após sua reativação. Ratos Wistars treinados na tarefa de EI foram submetidos a cinco sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. 7 dias após a última sessão, os animais receberam infusões bilaterais de veiculo (VEH) ou α -amanitina (AMANI; 50 μ M) na região CA1 do hipocampo dorsal. A Retenção foi avaliada 24 h depois. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

A partir dos resultados acima, observou-se que a síntese de novas proteínas e a expressão gênica são necessárias para a manutenção da memória de extinção após sua reativação, com esses dados, foi investigado quais proteínas poderiam estar envolvidas neste processo.

A atividade neuronal regula a transcrição de uma grande variedade de genes, muitos dos quais codificam proteínas que modificam a funcionalidade sináptica. No hipocampo, a proteína BDNF parece estar envolvida em processos de plasticidade neural e neurogênese. Vários autores sugerem que o BDNF exerce um papel importante na formação e na manutenção de memórias (Bekinschtein et al., 2008; Rossato et al., 2009; Alonso, 2005). Desta forma, decidiu-se investigar se a proteína BDNF estaria sendo ativada após a reativação da memória de extinção. Para tal, animais foram treinados na EI e submetidos ao protocolo de extinção, um dia após o término da mesma os animais passaram pela sessão de reativação e foram mortos a distintos

tempos. Como podemos observar na Figura 13 a expressão da proteína BDNF aumenta após a reativação quando comparada com os grupos que foram submetidos ao protocolo de extinção sem a presença da reativação.

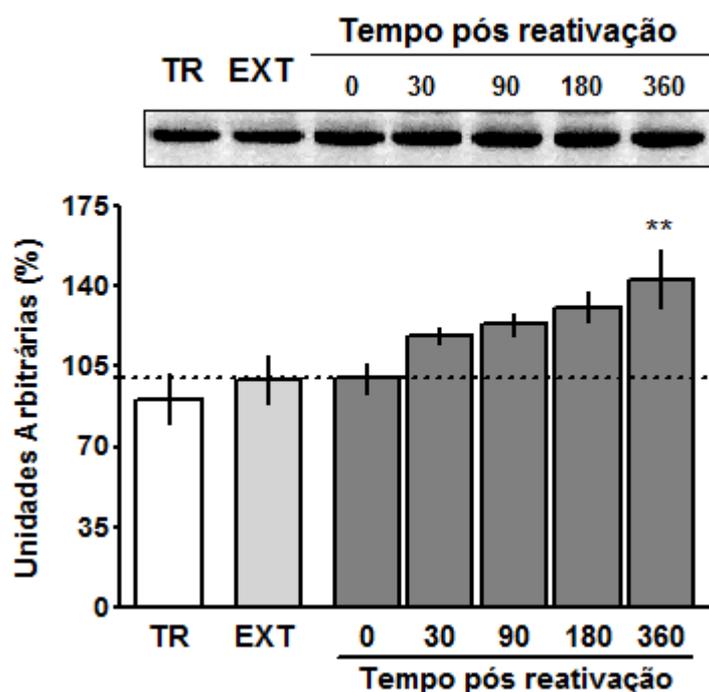


Figura 13. A expressão da proteína BDNF aumenta após a reativação. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. 24h após o último dia de extinção, esta memória foi reativada e imediatamente, 30, 90, 180 ou 360 min após a reativação os animais foram sacrificados e a região CA1 do hipocampo dorsal removida. Os níveis da proteína BDNF foram verificados mediante técnica de Western-Blotting. Os dados estão expressos (média \pm erro padrão) e são representados como porcentagem em relação ao grupo controle. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ em teste ANOVA seguido de Bonferroni ($n = 5$ por grupo).

Para ter-se certeza de que o aumento da expressão de BDNF se deve realmente a reativação da memória de extinção e não a uma modificação na quantidade de proteínas totais, foi analisada a expressão de uma proteína endógena que não deveria estar alterada por uma condição comportamental. Para tal, analisamos a expressão da proteína tubulina. Como se pode ver na

Figura 14 a expressão desta proteína não está alterada nas diferentes condições comportamentais apresentadas, indicando que a variação encontrada na expressão de BDNF é devido à reativação da memória de extinção.

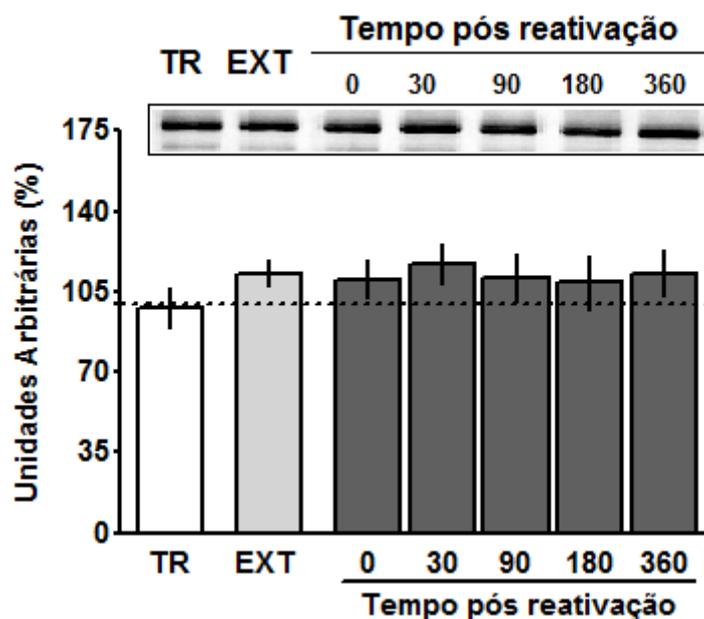


Figura 14. A expressão da proteína Tubulina não se altera após a reativação. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. 24h após o último dia de extinção, esta memória foi reativada e imediatamente, 30, 90, 180 ou 360 min após a reativação os animais foram sacrificados e a região CA1 do hipocampo dorsal removida. Os níveis da proteína Tubulina foram verificados mediante técnica de Western-Blotting. Os dados estão expressos (média \pm erro padrão) e são representados como porcentagem em relação ao grupo controle absoluto total. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ em teste ANOVA seguido de Bonferroni ($n=5$ por grupo).

Após certificar-se que a proteína BDNF aumenta após a reativação da memória de extinção, foi averiguado se o bloqueio farmacológico de BDNF possui algum efeito na manutenção deste traço após sua reativação. Para tanto, animais foram treinados e submetidos ao protocolo de extinção. Imediatamente ou 6 horas após a reativação os animais receberam infusões bilaterais intra-hipocampais de VEH ou Anti-BDNF, um anticorpo bloqueador da função da proteína (A-BDNF; 0,5 $\mu\text{g/lado}$). Os animais foram testados 24 ou

168 horas mais tarde. Os animais tratados com VEH se recordam da memória de extinção independentemente do tempo em que foram testados e do momento em que receberam a infusão (Figura 15 e 16). No entanto os animais tratados com A-BDNF imediatamente após a reativação perdem a memória de extinção, onde é observado o reaparecimento da memória aversiva original (Figura 15), este efeito amnésico não é observado quando a infusão é realizada 6 horas após a reativação (Figura 16).

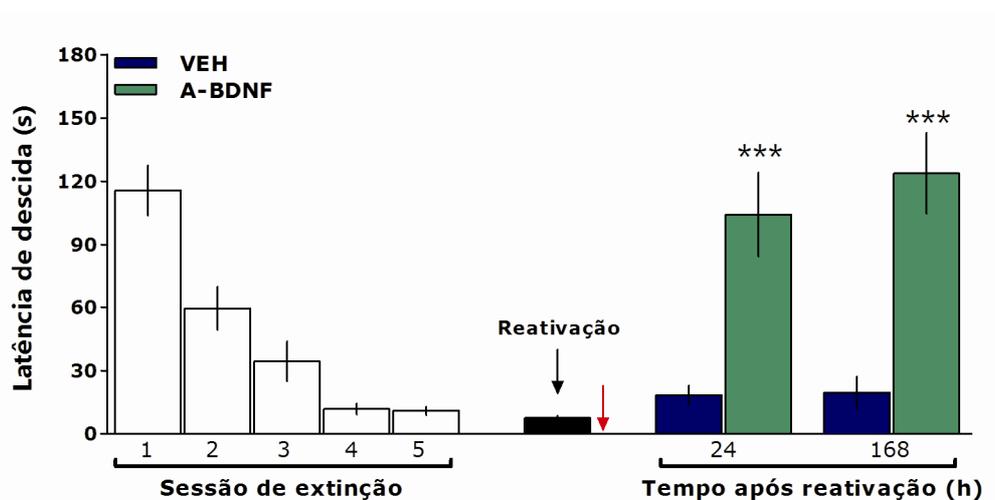


Figura 15. A funcionalidade de BDNF é necessária para a manutenção da memória de extinção imediatamente após sua reativação. Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia mais tarde a memória de extinção foi reativada, logo após os animais receberam injeções bilaterais de veiculo (VEH) ou Anti-BDNF (A-BDNF; 0,5 μ L /lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi avaliada 24 ou 168 h mais tarde. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

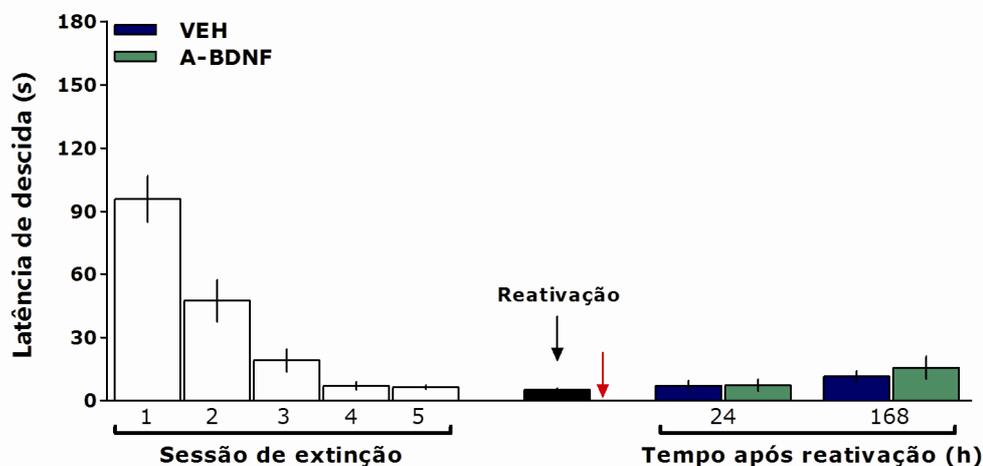


Figura 16. A funcionalidade de BDNF é necessária para a manutenção da memória de extinção imediatamente, mas não 6h após sua reativação.

Ratos Wistar treinados na tarefa de EI foram submetidos a 5 sessões de extinção 24, 48, 72, 96 e 120 h após o treino. Um dia mais tarde a memória de extinção foi reativada, 6h após os animais receberam injeções bilaterais de veiculo (VEH) ou Anti-BDNF (A-BDNF; 0,5 μ L /lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória em questão foi avaliada 24 ou 168 h mais tarde. Barras representam a média (\pm SEM) de latência de descida. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ usando o teste t de Student ou teste de Bonferroni após ANOVA. As setas indicam o momento da infusão da droga.

Para averiguar se a infusão intra-hipocampal dos fármacos utilizados neste trabalho, anisomicina – ANI, emetina – EME, cicloheximida – CHX, amanitina – AMA e anti-BDNF – A-BDNF, exercia alguma ação tardia no estado de ansiedade ou na atividade exploratória dos animais que pudesse mascarar a evocação da memória de extinção relacionada à EI, infundiu-se bilateralmente VEH, ANI, EME, CHX, AMANI ou A-BDNF e os animais foram submetidos 24 horas mais tarde, a uma sessão comportamental no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado. Como se pode observar na Tabela 1 nenhuma das drogas utilizadas afetou o número de entradas totais, o número de entradas nos braços abertos nem o tempo total gasto nos braços abertos

durante uma sessão de 5 min no labirinto em cruz elevado. Similarmente, as drogas utilizadas não alteram nem o número de cruzamentos nem o número de elevações durante uma sessão comportamental de 5 min de duração num campo aberto. Em conjunto, estes resultados indicam que quando infundida no hipocampo 24 h antes da avaliação comportamental as drogas utilizadas neste trabalho não modificaram o estado de ansiedade e a atividade motora dos animais.

	VEH	ANI	EME	CHX	AMA	A-BDNF
1	15.2 ± 0.9	13.65 ± 0.9	9.7 ± 2.0	13.2 ± 0.8	16.3 ± 1.4	13.1 ± 0.8
2	8.5 ± 0.8	7.0 ± 0.7	5.9 ± 1.6	7.2 ± 0.6	8.3 ± 0.8	7.4 ± 0.6
3	41.6 ± 3.7	46.9 ± 8.3	44.2 ± 7.9	39.6 ± 3.7	42.9 ± 3.7	39.7 ± 3.6
4	42.0 ± 7.9	48.6 ± 8.4	40.1 ± 10.4	54.3 ± 9.7	40.1 ± 5.3	42.0 ± 8.0
5	16.7 ± 2.0	20.2 ± 3.6	14.1 ± 4.1	17.6 ± 4.1	17.4 ± 4.7	14.6 ± 3.2

Tabela 1: Infusões de VEH, ANI, EME, CHX, AMANI, A-BDNF na região CA1 do hipocampo dorsal não apresentam efeito sobre as atividades locomotoras e exploratória ou sobre o estado de ansiedade. ANI (1µg/lado), EME (20 µg/lado), CHX (50 ng/lado), AMA (5 µg/lado), A-BDNF (0,5 µg/lado) ou veículo (VEH; 0.1% DMSO em salina) foram infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes da exposição às tarefas de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Os dados são expressos como média ± erro padrão do número total de entradas (1), número de entradas nos braços abertos (2) e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (3), Labirinto em cruz elevado; n = 8 por grupo, e o número de cruzamentos e elevações (4 e 5), Campo aberto; n = 8 por grupo, teste t de Student. Diferentes grupos de animais foram utilizados para cada teste comportamental.

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados acima indicam que a inibição da síntese protéica e da expressão gênica na região CA1 do hipocampo dorsal após a reativação da memória de extinção, prejudica a retenção da mesma sem afetar a memória original aversiva, conseqüentemente, o traço original do medo reaparece. Este fenômeno foi observado mediante a utilização de inibidores de síntese protéica com mecanismos de ação distintos, com isso é possível descartar qualquer efeito farmacológico inespecífico. Além disso, o efeito amnésico dos fármacos foi tempo-dependente e ocorreu concomitantemente à reativação da memória de extinção, não podendo ser atribuído aos fenômenos de recuperação espontânea (Rescorla, 2004), renovação (Bouton et al., 2004) ou restabelecimento (McAllister & McAllister, 2006). Nos grupos experimentais que receberam inibidores de síntese protéica e de expressão gênica 6 h após a reativação, não foi observado a presença desses fenômenos. De fato, o protocolo de treinamento utilizado induz uma memória de extinção que persiste pelo menos até 14 dias (Fig. 1). Deste modo, a explicação mais plausível para os dados sugere que a memória de extinção para a tarefa de esQUIVA inibitória debilita-se após sua reativação de modo que, para persistir, precisa passar por um processo de reconsolidação dependente de síntese protéica no hipocampo.

Atualmente, muitos trabalhos têm demonstrado que a evocação de uma memória consolidada, quando reativada na ausência de um reforço, desencadeia dois processos opostos: a consolidação da memória de extinção e a reconsolidação da memória original. O que vai determinar a direção desses dois processos são as condições ambientais, fisiológicas e comportamentais expostas no momento da reativação (Eisenberg, 2003; Suzuki et al., 2004). Juntamente com essas descobertas recentes (Garcia-Delatorre, 2010), os resultados desse trabalho sugerem que a dinâmica do processamento da memória após a reativação é muito mais complexa do que se pensava, e indicam que o modelo atual acerca da evocação deve incluir a possibilidade de que a memória de extinção consolidada também está suscetível à atualização e modificação após a evocação. Esta possibilidade tem profundas implicações a nível clínico, pois ajuda a compreender e evitar a reincidência de uma memória aversiva após o aparente sucesso das terapias de extinção utilizadas

para o tratamento de fobias e distúrbios de ansiedade (Foa, 2000; Miller & Sweatt, 2006).

A atividade neuronal após a reativação parece estar associada com a regulação de muitos genes, os quais estão envolvidos na codificação de proteínas que modificam a funcionalidade sináptica (Dudai, 2004; Kandel, 2001). No hipocampo, a proteína BDNF exerce um papel fundamental na plasticidade neuronal e neurogênese (Schinder, 2000; Tyler, 2002), sendo fundamental para formação e manutenção de memórias (Rossato, 2009), além de promover alterações morfológicas nas sinapses que suportam a manutenção da LTM (Bekinschtein et al., 2008; Lamprecht & LeDoux, 2004). A partir desses dados, os resultados bioquímicos e farmacológicos deste trabalho acerca do envolvimento do BDNF demonstraram que, o aumento dessa proteína após a reativação pode estar relacionado com a manutenção do traço mnemônico extinto no momento da sua expressão, deste modo, a atuação deste fator neurotrófico também é de extrema relevância na manutenção da memória de extinção após reativação.

7. CONCLUSÃO

O conjunto desses resultados apresentados sugere que, a inibição da síntese protéica e da expressão gênica após a reativação da memória de extinção prejudica a retenção da mesma, não por apagar o traço extinto, mas sim, por inibir um processo dependente de síntese de proteínas iniciado no momento da evocação dessa memória. Esta expressão após a reativação é fundamental para acessar as informações armazenadas no momento da aquisição, possibilitando sua atualização. Portanto, a memória de extinção consolidada, quando reativada, desencadeia um processo reconsolidatório dependente da síntese de proteínas e expressão de novos genes no hipocampo para se re-estabilizar.

A partir desses achados, novos estudos serão necessários para compreender esse dinâmico caminho mnemônico desencadeado pela reativação de uma memória extinta, e com isso possibilitar o avanço no conhecimento acerca de futuras estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias associados ao medo aprendido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, M.; BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; VIANNA, M.R.; BARAD, M. Fear extinction in rodents: basic insight to clinical promise. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 15: 710–715, 2005.

BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. **Behavioural pharmacology**, 14 (8): 649-652, 2003.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; KATCHE, C.; SLIPCZUK, L.; ROSSATO, I.J.; GOLDIN, A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, H.J. 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): 2711-6, 2008.

BONINI, J. S.; BEVILAQUA, L. R.; ZINN, C. G.; KERR, D. S.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Hormones and Behavior**, 50 (2): 308-13, 2006.

BOUTON, M.E.; WESTBROOK, R.F.; CORCORAN, K.A.; MAREN, S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. **Biol. Psychiatry**, 60:352-60, 2004.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; KERR, D.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. **Eur J Neurosci**, 23: 737-741, 2003.

CAMMAROTA, M.; BARROS, D.M.; VIANNA, M. R.; BEVILAQUA, L. R.; COITINHO, A.; SZAPIRO, G.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO I. The transition from memory retrieval to extinction. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 76(3): 573-582, 2004.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory

consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, 86: 100-6, 2006.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J.E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, 36:527-38, 2002.

DUVARCI, S.; MAMOU, C.B.; NADER, K. Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. **Eur J. Neurosci.**, 24:249-60, 2006.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu. Rev. Psychol.**, 55, 51–86, 2004.

EISENBERG, M.; KOBILO, T.; BERMAN, D.E.; DUDAI, Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. **Science**, 301: 1102-1104, 2003.

FOA, E.B. Psychosocial treatment of posttraumatic stress disorder. **J. Clin. Psychiatry**, 61(Suppl 5):43–48, discussion 49–51, 2000.

FORCATO, C.; RODRÍGUEZ, M.L.; PEDREIRA, M.E.; MALDONADO, H. Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. **Neurobiol Learn Mem.**, 93:77-84, 2010.

GARCIA-DELATORRE, P.; RODRÍGUEZ-ORTIZ, C.J.; BALDERAS, I.; BERMÚDEZ-RATTONI, F. Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. **Eur. J. Neurosci.**, 32:1018–1023, 2010.

HUPBACH, A.; GOMEZ, R.; HARDT, O.; NADEL, L. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. **Learn Mem.**, 14:47-53, 2007.

KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, 294, 1030–1038, 2001.

KERR, D.S.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATO, J.I.; KOHLER, C.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, 179 (3): 529-35, 2005.

LAMPRECHT, R. & LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nat. Rev. Neurosci.**, 5, 45–54, 2004.

LEE, J.L. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. **Nat. Neurosci.**, 11:1264-6, 2008.

McALLISTER, W.R. & McALLISTER, D.E. Recovery of conditioned fear by a single postextinction shock: effect of similarity of shock contexts and of time following extinction. **Learn. Behav.**, 34:44-9, 2006.

MILLER, C.A. & SWEATT, J.D. Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. **Learn Mem.**, 13:498–505, 2006.

MONFILS, M.H.; COWANSAGE, K.K.; KLANN E.; LEDOUX, J.E. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. **Science**, 324:951-5, 2009.

NADER, K. & HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nat. Rev. Neurosci.**, 10:224-34, 2009.

PAPE, H.C. & PARE, D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiol. Rev.**, 90:419-63, 2010.

PAXINOS, G. & WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press: San Diego, 119p, 1986.

PAVLOV I. **Conditioned Reflexes.** New York: Liveright, 1927.

PEDREIRA, M.E. & MALDONADO, H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. **Neuron.**, 38:863-9, 2003.

PRZYBYSLAWSKI, J. & SARA, S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behav Brain Research**, 84(1-2): 241-246, 1997.

QUIRK, G.J. & MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, 33:56-72, 2008.

ROSSATO, J.I. **Participação da síntese protéica hipocampal nos mecanismos envolvidos na persistência do traço mnemônico após sua reativação.** 2006. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. **Science**, 325:1017-20, 2009.

RESCORLA, R.A. Spontaneous recovery. **Learn Mem.**, 11:501–509, 2004.

SANGHA, S.; SCHEIBENSTOCK, A.; LUKOWIAK, K. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. **J. Neurosci.**, 23: 8034–8040, 2003.

SCHILLER, D.; MONFILS, M.H.; RAIIO, C.M.; JOHNSON, D.C.; LEDOUX, J.E.; PHELPS, E.A. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. **Nature**, 463:49-53, 2010.

SCHINDER, A.F. & POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, 23:639–645, 2000.

SUZUKI, A.; JOSSELYN, S.A.; FRANKLAND, P.W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J.Neurosci.**, 24:4787-95, 2004.

TYLER, W.J.; ALONSO, M.; BRAMHAM, C.R.; POZZO-MILLER, L.D. From acquisition to consolidation: On the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal dependent learning. **Learn Mem.**, 9:224–237, 2002.

9. **ANEXO 1:** Artigo submetido à Revista Brasileira de Psiquiatria (RBP) – ISSN 1516-4446



Acerca da consolidação, reconsolidação e extinção de memórias

Journal:	<i>Revista Brasileira de Psiquiatria</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Update Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Radiske, Andressa; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório de Neuroquímica e Neurofisiologia da Memória
Keywords:	Memory, Behavioral Neurology, Cognitive Neuroscience, Neurophysiology, Phobic Disorders

SCHOLARONE™
Manuscripts

Acerca da consolidação, reconsolidação e extinção de memórias**About consolidation, reconsolidation and extinction of memories****Título resumido:** Consolidação, reconsolidação e extinçãoAndressa Radiske^{1,2} & Martín Cammarota^{1,2,3}

¹ Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul & ²Instituto Nacional de Neurociência Translacional, ³Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, RS 90610-000, Porto Alegre, Brasil

Correspondência deve ser enviada para: Andressa Radiske

E-mail: andressa.radiske@gmail.com

Laboratório de Neuroquímica e Neurofisiologia da Memória

Centro de Memória, IPB, 2º andar HSL PUCRS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Avenida Ipiranga, 6690, 2º andar, HSL-PUCRS.

Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90610-000

Fone: (+55 51) 3320-3000 r: 2532

Fax: (+55 51) 3320-3312

Fontes de auxílio à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Conselho Nacional Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Tabela de Financiamento e Conflitos de Interesse

Membro do grupo de autores	Local de trabalho	Verba de pesquisa¹	Outro apoio à pesquisa ou educação médica continuada²	Honorários de palestrante	Participação acionária	Consultor/ Conselho consultivo	Outro³
Andressa Radiske	PUCRS	---	---	---	---	---	---
Martín Cammarota	PUCRS	---	---	---	---	---	---

Resumo

A expressão de uma memória já consolidada pode levar à ocorrência de dois processos opostos, que requerem a síntese *de novo* de proteínas nas mesmas áreas do cérebro: a extinção e a reconsolidação. A extinção debilita a expressão da memória original, enquanto que a reconsolidação permite a incorporação de nova informação a ela. O conhecimento dos processos envolvidos após a expressão de distintos tipos de memórias tem avançado muito nos últimos anos, e alguns conceitos novos foram instituídos. Portanto, neste artigo, serão reunidas algumas das principais descobertas das últimas décadas envolvendo o estudo dos processos decorrentes da expressão de memória, com o intuito de acumular o conhecimento básico que permita o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias associadas ao medo aprendido.

Palavras-chave: Consolidação, reconsolidação, extinção, memória, evocação

Abstract

The non-reinforced expression of long-term memory may lead to two opposite protein synthesis-dependent processes in the same brain areas: extinction and reconsolidation. Extinction weakens consolidated memories, whereas reconsolidation allows incorporation of additional information into them. Knowledge about the processes initiated by the expression of different types of memory has advanced greatly in recent years, and some new concepts have been introduced. Therefore, in this article, we will comment about some of the main findings of the last decades concerning the study of the processes resulting from memory expression. This is important to consolidate our knowledge about the possible development of new therapeutic strategies to treat anxiety disorders and phobias associated to learned fear.

Keywords: Consolidation, reconsolidation, extinction, memory, retrieval

Introdução

A famosa frase proferida por Descartes “penso, logo existo”, quando colocada em um contexto mais atual, talvez não possa ser considerada totalmente correta, pois como sugerido por Squire e Kandel¹, nossa individualidade é formada pelo acervo mnemônico construído a partir de experiências vivenciadas que podem ser expressas. Deste modo, não somos aquilo que somos simplesmente porque pensamos. Somos aquilo que somos porque podemos lembrar aquilo que pensamos. Sendo assim, a evocação das memórias é fundamental para a sobrevivência, já que este processo nos permite utilizar, consciente ou inconscientemente, a informação adquirida para responder e adaptar-nos aos desafios que o ambiente nos apresenta ao longo da vida. Evidências indicam que, após serem evocadas, as memórias tornam-se instáveis e, para persistirem, devem passar por um processo de re-estabilização dependente de síntese proteica denominado reconsolidação². Esse processo não é simplesmente a repetição da consolidação inicial, mas sim um mecanismo independente com um objetivo biológico específico: atualizar e estabilizar uma informação previamente armazenada com relação às modificações ambientais ou internas do indivíduo para assim determinar sua persistência.³ A evocação de uma memória pode ainda desencadear outro fenômeno conhecido como extinção, que se caracteriza pela evocação repetida do traço na ausência do estímulo incondicionado que levou a sua formação⁴, o qual também requer síntese de proteínas em áreas específicas do cérebro⁵

Deste modo, o conhecimento dos processos envolvidos após a expressão de distintos tipos de memórias, tem avançado muito nos últimos anos, e alguns

conceitos novos foram instituídos. Portanto, neste artigo, serão reunidas as principais descobertas das últimas décadas envolvendo o estudo dos processos decorrentes da expressão de memórias: extinção e reconsolidação, com o intuito de acumular o conhecimento básico que permita o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias.

Consolidação, extinção e reconsolidação de memórias

Após o processo de aprendizagem, a informação tem dois destinos possíveis: ela pode ser perdida para sempre, de maneira que, nunca mais estará disponível para ser acessada; ou ela pode passar por um processo de estabilização, durante o qual ocorrem modificações bioquímicas que determinam sua persistência.¹ Este processo é denominado consolidação. Distintos eventos moleculares estão envolvidos com a formação e manutenção das memórias de longa duração. Estes eventos incluem a ativação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), proteínas cinases e fatores de transcrição.⁶

Quando uma memória consolidada é reativada, ou seja, evocada, na ausência de um reforço, dois processos antagônicos podem ser desencadeados: a consolidação da memória de extinção ou a reconsolidação da memória original. O que vai determinar a direção desses dois processos são as condições ambientais, fisiológicas e comportamentais expostas no momento da reativação.⁷⁻⁸ Esses processos desempenham um papel fundamental para a modificação de uma memória existente, pois proporcionam as mesmas características dinâmicas, uma

vez que estão em permanente reorganização, conferindo aos indivíduos uma fácil adaptação em função de uma experiência ou de alterações do ambiente externo.²

Desde os estudos pioneiros de Pavlov⁴ sabe-se que a reativação repetida da memória na ausência de reforço conduz a sua extinção, que se caracteriza por suprimir a expressão do aprendizado original ao invés de apagá-lo.⁹⁻¹⁰ Além disso, essa memória extinta que foi consolidada pode tornar-se suscetível à atualização após a reativação, assim como ocorre com a reconsolidação.¹¹

A hipótese da reconsolidação foi primeiramente proposta no final da década de 1960, por Misanin e colaboradores¹² sugerindo que, as memórias de longa duração quando evocadas entram em um período de labilização necessitando ser reconsolidadas para permanecerem. Essa hipótese foi reafirmada a partir dos achados reportados por Nader e colaboradores¹³⁻¹⁴ demonstrando que, em ratos, a infusão intra-amígdala de um inibidor da síntese protéica imediatamente após a evocação de uma resposta condicionada ao medo, induz amnésia persistente. A partir desses trabalhos, outros grupos têm pesquisado o papel da reconsolidação na manutenção da memória após a reativação, enfatizando o estudo acerca dos requisitos moleculares desse processo.¹⁵⁻¹⁷

Deste modo, os processos de reconsolidação e extinção estão relacionados funcionalmente, pois ambos baseiam-se na aquisição de informação sobre o que acontece no momento da expressão, informação que, por sua vez, está associada com o aprendizado original. Contudo, eles apresentam mecanismos distintos quanto à formação. Apesar de estar difundida na literatura a relação molecular e bioquímica destes dois processos, ainda é contraditória a interação comportamental destes eventos. Trabalhos de diversos laboratórios demonstraram que, a ocorrência de extinção é um dos fatores que limitam ou de fato impedem a reconsolidação de

memórias. Enquanto, resultados mais recentes indicam que a reconsolidação pode ocorrer independentemente da extinção prévia da memória em questão, sugerindo que ambos os processos são independentes.¹⁸⁻²¹ Entretanto, em um estudo recente, foi demonstrado que a memória de extinção para a tarefa de esquiva inibitória debilita-se após sua reativação de modo que, para persistir, precisa passar por um processo de reconsolidação dependente de síntese protéica no hipocampo.¹¹ A partir desses achados, mais estudos serão necessários para compreender o caminho de uma memória extinta após a sua expressão.

A memória é um produto formado a partir de uma experiência passada, que é usada para responder questões no presente. O traço mnemônico quando evocado, permite que sejam feitas modificações plásticas nas sinapses para a manutenção das memórias de longa duração. Essa atualização, mediante a reconsolidação, confere ao traço mnemônico características dinâmicas, que estão em constante reorganização em função de experiências futuras que a vida proporciona.

O conhecimento acerca dos requerimentos moleculares, bioquímicos e comportamentais que sustentam a manutenção de um traço mnemônico após sua reativação, ainda é limitado, porém necessário para compreender o mecanismo associado com a reincidência de uma memória aversiva após o aparente sucesso das psicoterapias baseadas no processo de extinção, que são utilizadas para o tratamento de transtornos de ansiedade e do estresse pós-traumático. Portanto, os fenômenos denominados recuperação espontânea,²² renovação,²³ ou restabelecimento,²⁴ que envolvem o reaparecimento de uma memória aversiva após a extinção, são alvos nos estudos acerca desses distúrbios. Deste modo, serão necessárias mais investigações para compreender esse dinâmico caminho mnemônico desencadeado pela reativação de uma memória, e com isso possibilitar

o avanço no conhecimento com relação às futuras estratégias terapêuticas para o tratamento de distúrbios de ansiedade e fobias associados ao medo aprendido.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Conselho Nacional Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

For Peer Review

Referências

1. Squire LR, Kandel ER. *Memória: da mente às moléculas*. Tradução: C. Dalmaz e J. A. Quillfeldt. Porto Alegre (RS): Ed.Artmed; 2000.
2. Przybylski J, Sara SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Research*. 1997; 84(1-2): 241-246.
3. Cammarota M, Bevilaqua LR, Kerr D, Medina JH, IZQUIERDO I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *Eur J Neurosci*. 2003; 23: 737-741.
4. Pavlov I. *Conditioned Reflexes*. New York: Liveright; 1927.
5. Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem*. 2006 Jul-Aug;13(4):431-40.
6. Milner B, Squire LR, Kandel ER.. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 1998; 20:445-68.
7. Eisenberg M, Kobilov T, Berman DE, Dudai Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*. 2003; 301: 1102-1104.
8. Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci*. 2004; 24:4787-95.

9. Rescorla RA. Spontaneous recovery. *Learn Mem.* 2004; 11:501–509.
10. Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry.* 2004; 60:352-60.
11. Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M . Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:21801-5.
12. Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science.* 1968; 160: 554–555.
13. Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature.* 2000a; 406:722-726.
14. Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci.* 2000b; 1:216-219.
15. Child FM, Epstein HT, Kuzirian AM, Alkon DL. Memory reconsolidation in Hermisenda. *Biol Bull.* 2003 Oct;205(2):218-9.
16. Lattal KM, Abel T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 4667–4672.
17. Alberini CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* 2005; 28(1): 51-56.

18. Debiec J, Ledoux JE, Nader K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*. 2002; 36:527-38.
19. Sangha S, Scheibestock A, Lukowiak K. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci*. 2003; 23: 8034–8040.
20. Pedreira ME, Maldonado H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*. 2003; 38:863-9.
21. Duvarci S, Mamou CB, Nader K. Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci*. 2006; 24:249-60.
22. Rescorla RA. Spontaneous recovery. *Learn Mem*. 2004; 11:501-9.
23. Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry*. 2004; 60:352-60.
24. McAllister WR, McAllister DE. Recovery of conditioned fear by a single postextinction shock: effect of similarity of shock contexts and of time following extinction. *Learn Behav*. 2006; 34:44-9.