

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS**

CRISTIANE REGINA GUERINO FURINI

**ANÁLISE NEUROFARMACOLÓGICA E NEUROQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE
MEMÓRIAS ESPACIAIS**

Porto Alegre

2012

CRISTIANE REGINA GUERINO FURINI

**ANÁLISE NEUROFARMACOLÓGICA E NEUROQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE
MEMÓRIAS ESPACIAIS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor 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

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

F984a Furini, Cristiane Regina Guerino
Análise neurofarmacológica e neuroquímica da expressão de memórias espaciais / Cristiane Regina Guerino Furini. - Porto Alegre: PUCRS, 2012.

61f.: gráf. il. Inclui artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Martin Pablo Cammarota.

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

1. MEMÓRIA/fisiologia. 2. HIPOCAMPO/efeitos de drogas. 3. COMPORTAMENTO ESPACIAL. 4. RECEPTORES DE N-METIL-D-ASPARTATO. 5. RECEPTORES DE GABA. 6. RATOS WISTAR. 7. ESTUDOS EXPERIMENTAIS. 8. ANIMAIS DE LABORATÓRIO.. I. Cammarota, Martin Pablo. II. Título.

C.D.D. 616.8
C.D.U. 616.8:159.953.2 (043.2)
N.L.M. WL 337

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sonia e Roberto, por sempre me apoiarem e incentivarem a lutar por meus sonhos, obrigada por todo amor e carinho.

Ao meu esposo Leandro, pelo amor e apoio em mais esta etapa.

Ao meu orientador, Prof. Martín Cammarota, por contribuir e ajudar sempre no meu aprendizado. Por seu empenho e dedicação para a realização deste trabalho.

A Profa. Janine, pela grande ajuda e dedicação em todas as etapas de realização deste e de outros trabalhos.

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

A minha irmã Eduarda, por estar sempre ao meu lado, teu apoio é imprescindível.

Aos meus amigos e colegas que fazem parte do Centro de Memória, e que me ajudaram muito na realização destes e outros experimentos: Siomara, Jociane, Cristiano, Ramón, Profa. Lia, Andressa, Gerard, Jéssica, Natália, Fernando, Camila, Felipe, Germana.

A minha família e amigos que fizeram parte e contribuíram para a minha caminhada.

A todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desta tese ou em outros momentos da minha vida.

Ao CNPq, pelo financiamento dos meus estudos.

RESUMO

As memórias não são armazenadas em sua forma definitiva. Logo após a aquisição, elas passam por um longo processo de estabilização conhecido como consolidação. Memórias já consolidadas podem se tornar novamente lábeis logo após a evocação e suscetíveis a ação de agentes amnésicos. Dessa forma, para persistirem devem passar pelo processo de reestabilização denominado, reconsolidação. Inúmeras evidências indicam que o hipocampo tem um papel importante tanto na consolidação quanto na reconsolidação de diferentes memórias. Assim, decidimos investigar a participação dos receptores NMDA e GABA da região CA1 do hipocampo dorsal na evocação e reconsolidação da memória espacial. Utilizando a tarefa de labirinto aquático de Morris (LAM) em ratos, demonstramos que a infusão na região CA1 do hipocampo do antagonista seletivo do receptor NMDA, AP5 (5 µg/µl) é capaz de bloquear temporariamente a evocação da memória espacial. Porém quando administrado diferentes doses e diferentes tempos, após a sessão de reativação na ausência de reforço não se observa efeito algum sobre a reconsolidação da memória espacial. Enquanto que o agonista do sítio da glicina no receptor NMDA, D-SER (10 µg/µl), melhora não só a consolidação, mas também a reconsolidação da memória espacial. Além disso, a infusão do agonista do receptor GABA, muscimol (0,1 µg/µl), impede temporariamente a evocação da memória do LAM. Porém, quando os animais recebem a infusão de muscimol antes da sessão de reativação e do inibidor da síntese de proteínas, anisomicina (160 µg/µl), imediatamente após esta sessão, a memória espacial permanece inibida. Assim, demonstramos que a inibição dos receptores NMDA impede a evocação mas não a reconsolidação da memória espacial e seu agonista é capaz de melhorar a consolidação e a reconsolidação dessa memória, enquanto a ativação do receptor GABA impede temporariamente a evocação e o prejuízo na memória é mantido com a inibição da síntese de proteínas.

Palavras-chave: memória, consolidação, reconsolidação, evocação, memória espacial, receptor NMDA, receptor GABA.

ABSTRACT

Memories are not stored in its final form immediately after the acquisition. They undergo a long stabilization process known as consolidation. Consolidated memories can become labile again after the retrieval and susceptible to the action of amnesic agents. Thus, to persist must go through the re-stabilization process called reconsolidation. Several evidences indicate that the hippocampus plays an important role in both consolidation and reconsolidation process of different memories. In this way, we decided investigate the participation of NMDA and GABA receptors of dorsal hippocampus CA1 region on the retrieval and reconsolidation of spatial memory. We used the Morris water maze task (MWM) to demonstrate that infusion of AP5 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), the selective antagonist of the NMDA receptor, into the dorsal hippocampus CA1 region of rats is able to block temporarily the retrieval of spatial memory. However, when we administered different doses and different times after the reactivation session in the absence of reinforcement is not observed any effect on spatial memory reconsolidation. While agonists of the glycine site of NMDA receptors, D-SER (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), improves the consolidation and the reconsolidation of spatial memory. Furthermore, we found that infusion of the agonist of GABA, muscimol (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), temporarily prevents the memory retrieval of MWM. However, when the animals received infusion of muscimol before the reactivation session and the protein synthesis inhibitor, anisomycin (160 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), immediately after this session, spatial memory remains inhibited. Thus, we have demonstrated that inhibition of NMDA receptors prevents the retrieval but not the reconsolidation of the spatial memory and the NMDA agonist is capable of improving consolidation and reconsolidation of memory, while the GABA activation temporarily prevents retrieval and the impairment of memory is maintained through inhibition of protein synthesis.

Key words: memory, consolidation, reconsolidation, retrieval, spatial memory, NMDA receptors, GABA receptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal16
- Figura 2.** Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal17
- Figura 3.** Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.....19
- Figura 4.** Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM.....20
- Figura 5.** Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas21
- Figura 6.** AP5 modifica a evocação da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal antes de um teste na ausência de plataforma de escape.....23
- Figura 7.** AP5 não interfere na retenção da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape.....24
- Figura 8.** A D-cicloserina melhora a retenção da memória espacial quando administrada na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape.....26
- Figura 9.** Muscimol modifica a evocação da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal antes de um teste na ausência de plataforma de escape.....28
- Figura 10.** Muscimol interfere na evocação da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal antes de uma sessão de reativação na ausência da plataforma de escape, e anisomicina imediatamente após essa evocação impede que a memória se recupere29

LISTA DE ABREVIATURAS

ANI- Anisomicina
AP5- Ácido D(-)-2-Amino-5-fosfopentanóico
CPFm- Córtex pré-frontal medial
D-SER- D-cicloserina
EI- Esquiva inibitória
GABA- Ácido gama-aminobutírico
h- horas
INF- infusão
i.p.- Intraperitoneal
i.c.v.- Intracerebroventricular
LAM- Labirinto Aquático de Morris
LTP- Potenciação de longa duração. Do inglês: *Long-term Potentiation*
min - minuto
LTM- Memória de longa duração. Do inglês: *Long-term Memory*
MUS- Muscimol
NMDA- N-Metil D-Aspartato
PT- Teste na ausência da plataforma de escape
QA- quadrante alvo
s- segundos
STM- Memória de curta duração. Do inglês: *Short-term Memory*
VEH- Veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral:.....	15
2.2 Objetivos específicos:	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Animais Experimentais	15
3.2 Cirurgia Estereotáxica.....	16
3.3 Manipulação dos animais	17
3.4 Labirinto Aquático de Morris – LAM.....	17
3.5 Aprendizado espacial no LAM	19
3.6 Reativação da memória espacial associada ao LAM	20
3.7 Tratamentos farmacológicos.....	20
3.8 Controle histológico da região estudada.....	21
3.9 Análise Estatística dos Dados	22
4 RESULTADOS	22
4.1 A infusão intra-hipocampal de AP5 antes de uma sessão de reativação não reforçada no labirinto aquático de Morris, prejudica a evocação da memória espacial.....	22
4.2 A infusão intra-hipocampal de AP5 após uma sessão de reativação não reforçada no labirinto aquático de Morris, não prejudica a reconsolidação da memória espacial.....	23
4.3 A D-cicloserina melhora a consolidação e a reconsolidação da memória espacial quando administrada na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape.	24
4.4 A infusão intra-hipocampal de muscimol, 15 minutos antes de uma sessão de reativação não reforçada no labirinto aquático de Morris, prejudica a evocação da memória espacial.....	27
4.5 A infusão intra-hipocampal de muscimol, 15 minutos antes de uma sessão de reativação não reforçada no LAM impede a evocação da memória espacial. A infusão de anisomicina imediatamente após essa sessão prejudica a retenção da memória em um segundo teste.	28
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	35
7 REFERÊNCIAS	36
ANEXO	44

1 INTRODUÇÃO

As memórias são uma parte essencial da vida (Doyle e Kiebler, 2011), pois seu acervo é o que faz de cada indivíduo um ser único, e seu conjunto determina o que se conhece por personalidade (Squire e Kandel, 2003).

Ao longo do processo evolutivo, o surgimento da capacidade de armazenar informações permitiu que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver problemas apresentados pelo meio ambiente, oferecendo aos animais uma maior adaptabilidade. Os grupos taxonomicamente mais antigos, como os invertebrados, já apresentam alguma capacidade mnemônica. No caso dos seres humanos, a memória exerce um papel ainda mais nobre, funcionando como um arcabouço que armazena nossa história pessoal, torna possível que crescamos e mudemos ao longo da vida (Kandel *et al.*, 2000).

Para que uma memória se forme, informações originárias de fontes externas (experiências sensoriais oriundas da interação com o ambiente) ou internas (cognição, emoção) devem ser adquiridas e armazenadas. Porém, de todas as informações processadas pelo sistema nervoso, apenas algumas são de fato retidas. A maioria nem sequer é adquirida, sendo filtrada por mecanismos atencionais e emocionais. Dentre aquelas que são adquiridas, apenas algumas são armazenadas, e mesmo dentre essas, muitas são esquecidas.

O acervo de informações que constitui a memória pode se diferenciar de acordo com vários critérios, porém os mais marcantes são quanto ao conteúdo e tempo de duração. Quanto ao conteúdo, as memórias podem ser classificadas como explícitas e implícitas. As memórias explícitas ou declarativas contêm informações que usualmente sabemos que possuímos e das quais temos acesso consciente. Esse tipo de memória inclui o conhecimento sobre nossa história pessoal e sobre o mundo que nos rodeia e ainda podem ser divididas em duas subclasses: as memórias episódicas, que são as autobiográficas, referentes a eventos aos quais assistimos ou participamos; e as memórias semânticas, que são as de conhecimento geral (Izquierdo e McGaugh, 2000; Squire e Zola, 1996). Já as memórias implícitas (também chamadas de não-declarativas) contêm informação à qual não precisamos ter acesso de forma consciente, tal como o conhecimento procedimental e a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles produzidos pelo treino em tarefas de condicionamento e habituação (Izquierdo, 2002).

Quanto ao tempo de duração, as memórias que permanecem armazenadas por um curto período de tempo, poucos minutos ou horas, são denominadas de memória de curta duração (STM; sigla do inglês: *short-term Memory*; Izquierdo *et al.*, 1998a; Alberini *et al.*, 2006), enquanto que, se ficarem armazenadas por um longo período de tempo, muitas horas, dias ou meses são denominadas de memórias de longa duração (LTM; sigla do inglês: *long-term Memory*; Izquierdo *et al.*, 1998a). O processo no qual ocorre a formação da LTM é denominado de consolidação, e consiste em um conjunto complexo e altamente regulado de reações bioquímicas e requer a ativação de diversas proteínas e vias de sinalização interdependentes; esse processo ocorre nos neurônios e leva a modificações sinápticas que culminam em uma progressiva estabilização pós-aquisição das LTM (Dudai, 2004; Costa-Mattioli e Sonenberg, 2008).

Após a consolidação, uma memória pode permanecer estavelmente armazenada e ser evocada quando necessário, mas isso não significa que esta memória estará cristalina e indefinidamente gravada, insensível a todo tipo de evento após a consolidação. Ao invés disso, as memórias consolidadas tornam-se novamente labilizadas quando reativadas, o que ocorre quando são evocadas. Durante esse novo período de fragilidade, as memórias podem ter sua retenção prejudicada se houver bloqueio da síntese de proteínas, de forma semelhante ao que ocorre na fase inicial de consolidação. Como um conjunto semelhante de interferências pode afetar a estabilidade de memórias quando agem tanto na fase inicial do aprendizado quanto logo após a evocação, o processo que converte a memória labilizada pela evocação em uma forma novamente estável denomina-se reconsolidação (Alberini, 2005; Dudai e Eisenberg, 2004; Nader *et al.*, 2000; Sara, 2000; Tronson e Taylor, 2007).

Apesar da denominação usada, o processo da reconsolidação não é apenas uma simples reiteração da consolidação, pois a estabilização pós-reativação é um processo diferente da estabilização promovida na consolidação, apesar de existir uma sobreposição destes processos quanto a função de armazenamento de memórias e quanto a necessidade subjacente de síntese de proteínas (Tronson e Taylor, 2007).

Trabalhos realizados em vários laboratórios, utilizando diferentes agentes amnésicos, bem como diversos paradigmas de aprendizado e espécies de animais, mostraram que após a evocação na ausência de reforço, as LTM necessitam da

síntese de proteínas para persistirem, ou seja, elas precisam ser reconsolidadas (Debiec *et al.*, 2002; Kida *et al.*, 2002; Pedreira *et al.*, 2002; Sangha *et al.*, 2003; Eisenberg *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Stollhoff *et al.*, 2005; Inda *et al.*, 2005; Gainutdinova *et al.*, 2005; Merlo *et al.*, 2005),

A ocorrência do processo reconsolidatório na tarefa de aprendizado espacial do labirinto aquático de Morris (LAM), foi comprovado através da infusão intrahipocampal em ratos, de diferentes agentes amnésicos (Rossato *et al.*, 2006; Bonini *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008).

Na literatura está bem estabelecido que a integridade da formação hipocampal é essencial para a aprendizagem espacial, porém os mecanismos neurais sobre o envolvimento do hipocampo neste processo não estão totalmente compreendidos (Stewart e Morris, 1993; D'Hooge e De Deyn, 2001). O hipocampo é uma estrutura encefálica bilateral localizada no lobo temporal e é um importante componente do sistema límbico, desempenhando um papel fundamental na formação de memórias de curto e longo prazo, sendo que diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com esta estrutura para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações (Izquierdo *et al.*, 1998a, 1998b).

Além da interação de diferentes regiões cerebrais com o hipocampo, inúmeros elementos moleculares e bioquímicos são necessários para o processamento da memória. Dentre esses componentes estão os receptores excitatórios glutamatérgicos do tipo NMDA e também os receptores inibitórios do tipo GABA, os quais se encontram amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central de mamíferos (Brioni *et al.*, 1989; Monaghan *et al.*, 1998).

Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são encontrados em grande número no hipocampo (Monaghan *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1993). Onde sabe-se que estão envolvidos com a plasticidade sináptica (Collingridge, 1987). Sua ativação é capaz de gerar potenciação de longa duração (LTP, sigla do inglês: *long-term potentiation*), que é um meio artificial de indução de plasticidade sináptica (Lynch, 1986; Bliss e Collingridge, 1993; Nicoll e Malenka, 1999; Rodrigues, 2004), sobre o qual se acredita ser uma valiosa ferramenta para estudar mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação de memórias (Morris *et al.* 1986; Sakimura *et al.*, 1995; Tsien *et al.*, 1996, McDonald *et al.*, 2005). Camundongos transgênicos com déficit de receptores NMDA apresentam prejuízo na plasticidade sináptica e no aprendizado (Sakurai *et al.*, 1993; Shimizu *et al.*, 2000), enquanto que os animais

capazes de produzir mais receptores NMDA apresentam mais habilidades de aprendizado em algumas tarefas (Tang *et al.*, 1999, 2001).

No paradigma de esquia inibitória (EI), observa-se que a infusão do antagonista do receptor NMDA, AP5, em ratos, é capaz de bloquear a consolidação da memória de esquia inibitória, se administrado imediatamente, mas não 30 ou 180 minutos após o treino (Izquierdo *et al.*, 1992; Jerusalinsky *et al.*, 1992). O efeito inibitório também é observado quando o bloqueio ocorre pré-teste, demonstrando prejudicar a evocação da memória para a tarefa de EI. Além disso, a administração sistêmica do antagonista do receptor NMDA, ifenprodil, antes do treino na tarefa de medo condicionado ao som e ao contexto leva a um prejuízo dose dependente na aquisição destas memórias, enquanto injeções antes do teste não produzem efeito (Rodrigues *et al.*, 2001).

A participação dos receptores NMDA não se restringe apenas as memórias aversivas, pois estudos também evidenciaram o envolvimento desses receptores na aquisição e consolidação de memórias espaciais. Sendo que o primeiro estudo a sugerir isto ocorreu em 1986 por Morris *et al.* (1986), que demonstrou que o bloqueio dos receptores NMDA, pela administração crônica intracerebroventricular (i.c.v.) de AP5, inibe o aprendizado espacial. Outros estudos usando camundongos geneticamente modificados chegaram à mesma conclusão. Tsien *et al.* (1996) demonstrou que camundongos *nocautes* para os receptores NMDA na região CA1 exibem prejuízo na memória espacial, enquanto a memória não espacial fica intacta.

Além do envolvimento no processo de consolidação de memórias, os receptores NMDA também se mostraram envolvidos no processo de reconsolidação, onde trabalhos evidenciaram que na memória de medo condicionado, a administração do antagonista do receptor NMDA, MK-801 i.p. (intraperitoneal), em ratos, prejudica a memória quando administrado após uma sessão de reativação, enquanto que a administração do seu agonista, D-cicloserina (D-SER) melhora a memória, indicando a participação dos receptores NMDA no processo de reconsolidação desse traço mnemônico (Lee *et al.*, 2006). Esta participação também foi observada na tarefa de discriminação de odores, pois quando Torras-Garcia e colaboradores administraram i.c.v., em ratos, o antagonista dos receptores NMDA, AP5, imediatamente após a sessão de reativação, viram um prejuízo na retenção desta memória em um teste realizado 48 h após a sessão de reativação (Torras-Garcia *et al.*, 2005).

Outro grupo de receptores extremamente importantes para a formação de memórias e amplamente distribuídos pelo SNC de mamíferos são os GABAérgicos, os quais são os principais receptores inibitórios do SNC (Brioni *et al.*, 1989; Castellano *et al.*, 1989). Dentre os receptores GABA, o GABAA é o subtipo mais abundante no cérebro (Pirker *et al.*, 2000).

Estudos têm demonstrado que a LTP pode ser bloqueada pelo agonista do receptor GABA, muscimol (Bliss e Collingridge, 1993), e que a administração desse, após o treino, leva a uma redução na resposta de medo durante a sessão de teste na tarefa de EI, isso é observado quando a infusão ocorre tanto sistemicamente quanto diretamente na amígdala, hipocampo, córtex entorrinal, área pré-central medial anterior, córtex pré-frontal medial e dorso lateral (Ammassari-Teule *et al.*, 1991; Brioni *et al.*, 1989; Carbo Tano *et al.*, 2009; Introini-Collison *et al.*, 1994, Mello e Souza *et al.*, 2000, Izquierdo *et al.*, 2007).

Quanto ao envolvimento dos receptores GABA nas memórias espaciais, quando o agonista do receptor GABA, muscimol, é infundido no CPFm (córtex pré-frontal medial) de ratos, ocorre um prejuízo na memória para a tarefa do labirinto radial, em que os animais são treinados para escolher um objeto associado a uma recompensa. Assim, os animais que receberam muscimol apresentaram prejuízo ao expressar a memória para a localização do objeto se comparado com o grupo controle (Lee e Solivan, 2008).

O prejuízo causado por muscimol também é observado ao administrá-lo no córtex entorrinal de ratos, ocasionando prejuízo na aquisição e expressão da informação em um labirinto radial, em que os animais na sessão de teste, não são capazes de recordar qual dos braços havia comida durante o treino (Gaskin e White, 2010).

Além disso, diazepam, um fármaco da família dos benzodiazepínicos que interage com os receptores GABA ativando-os, ao ser administrado i.p. em ratos, é capaz de levar a um déficit na memória espacial, prejudicando a aquisição da memória do labirinto aquático (Arolfo e Brioni, 1991).

Com base nas evidências apresentadas acima quanto ao envolvimento dos receptores NMDA e GABA em diferentes tipos de memórias, o objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento desses receptores na memória espacial utilizando a tarefa de labirinto aquático de Morris.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Verificar a participação dos receptores NMDA e GABA, da região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, na evocação e reconsolidação da memória espacial.

2.2 Objetivos específicos:

- Investigar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, no processo de evocação da memória espacial.

- Investigar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, no processo de reconsolidação da memória espacial.

- Investigar o efeito do agonista do receptor NMDA, D-SER, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, no processo de consolidação e reconsolidação da memória espacial.

- Investigar a participação dos receptores GABA da região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, no processo de evocação da memória espacial.

- Investigar o envolvimento da síntese de proteínas da região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, no processo de retenção da memória espacial, após a ativação dos receptores GABA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2,5 a 3 meses de idade, pesando em média 300 g. Os animais foram mantidos em caixas moradias em número de 5 por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23° C) submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram adquiridos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos no biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N°85-23, revised 1996) e tiveram a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUC-RS.

Trata-se de um estudo com animais experimentais, desta forma o tamanho amostral (número de animais por grupo) foi definido com base nos estudos da área publicados em revistas científicas *qualis* A internacional e baseado em estudos prévios do nosso laboratório. Então, para um poder de 90%, com nível de significância de 0,05 os grupos precisarão ter um número de 8 animais.

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 da região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas (A -4,2, L \pm 3,0, V -2,0 mm) segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1986; FIG. 1).



Figura 1. Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal (Paxinos e Watson, 1986).

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com Xilazina, que é um sedativo/miorrelaxante/analgésico (“Coopazine”; Coopers), administrados intra-peritonealmente (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente (FIG. 2).

Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia, e não houve troca entre os animais em cada caixa ao longo de todo o experimento.



Figura 2. Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do equipamento estereotáxico.

3.3 Manipulação dos animais

Quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 5 minutos.

3.4 Labirinto Aquático de Morris – LAM

O LAM foi desenvolvido há mais de 20 anos por Richard G. Morris (1984) como um instrumento para investigar aprendizado espacial em roedores. A relativa simplicidade do LAM é indubitavelmente uma das razões para seu sucesso. Na sua versão espacial (também denominada de “plataforma oculta”), esta tarefa está baseada em uma capacidade universal, a utilização de dicas ambientais para encontrar um alvo que, ao permitir o escape de uma situação desprazerosa, atua como reforço positivo. De fato, o LAM é o modelo comportamental mais amplamente usado para analisar a participação do hipocampo no processamento de informação espacial. O paradigma é plástico o suficiente como para poder ser adaptado com êxito à análise de diferentes fases e modalidades do processamento do traço mnemônico espacial, aonde um maior número de sessões de treino, ou bem a execução do mesmo durante vários dias conduz ao estabelecimento de um mapa

mnemônico perdurável, claramente evidenciado pelo surgimento de uma marcada preferência espacial. O fato de que a intensidade e a duração do treinamento possam ser alteradas com consequências previsíveis na magnitude da resposta adquirida e da preferência espacial estabelecida, facilita a análise correlativa entre os dados comportamentais e suas contrapartidas bioquímicas.

O LAM utilizado em nossos experimentos encontra-se em uma sala ampla, bem iluminada (iluminação indireta) e sem janelas, a qual foi especialmente construída nas instalações do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O labirinto em si consiste de uma piscina circular feita de concreto rebocado e impermeabilizado pintada da cor preta (2 m de diâmetro e 0,6 m de altura). A piscina está conceitualmente dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos. Dois centímetros abaixo da água (mantida entre 21–23°C durante todo o experimento) e oculta da vista do sujeito experimental encontra-se uma plataforma de escape de 12 cm de diâmetro. A superfície da plataforma é abrasiva para permitir que o animal suba nela assim que a detectar. O LAM está rodeado de numerosos elementos claramente visíveis e de cores e motivos contrastantes ainda que comportamentalmente neutros (figuras, fotografias, desenhos geométricos e abstratos, etc.) pendurados nas paredes da sala, esses elementos servem como dicas de localização espacial e sua posição pode ser mudada a vontade do experimentador (FIG. 3).

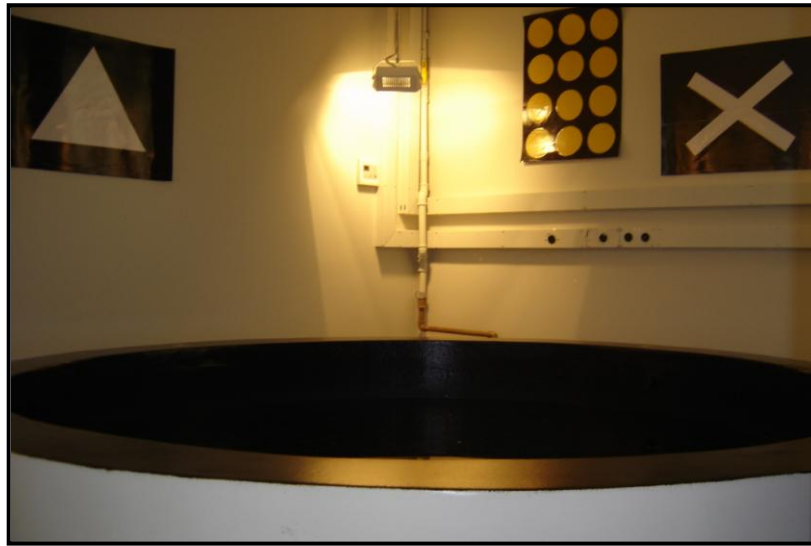


Figura 3. Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

3.5 Aprendizado espacial no LAM

O treino na versão espacial do LAM consistiu de 1 sessão diária de 8 largadas durante 2 ou 5 dias, sendo o treino de 2 dias empregado na tentativa de se avaliar se fármacos podem levar a uma melhora no processamento da tarefa. A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante os dias de treino. Cada uma das 8 largadas diárias foi iniciada de uma posição distinta da piscina de acordo com um padrão pseudoaleatório gerado por um sistema computadorizado desenvolvido em nosso laboratório. A duração máxima da largada foi de 60 s e se o animal não encontrasse a plataforma neste período de tempo era conduzido até ela pelo experimentador, permanecendo sobre a mesma durante 30 s. A retenção da memória no LAM foi avaliada em um teste de retenção na ausência da plataforma de escape de 60 s, realizado 24 h após o treino. O tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante alvo (QA, quadrante onde a plataforma de escape esteve localizada durante o treino) foi utilizado como o principal indicador de retenção da memória espacial (FIG. 4; Da Silva *et al.*, 2008).

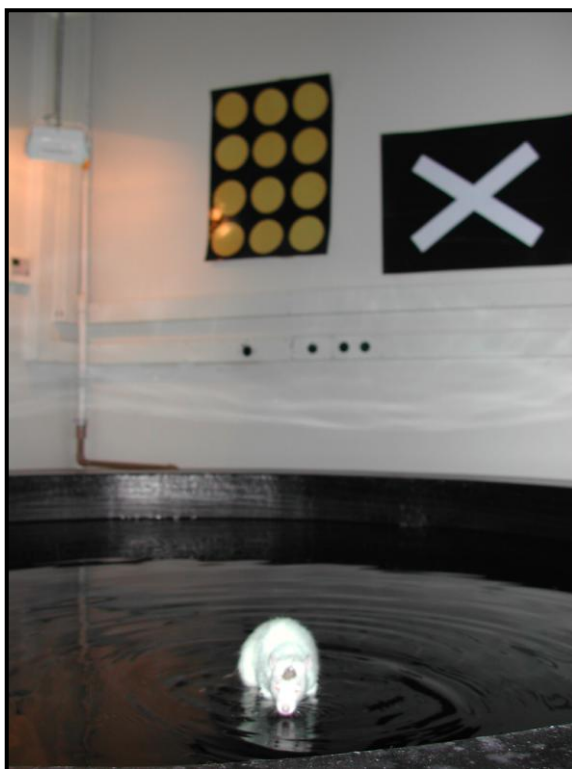


Figura 4. Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM.

3.6 Reativação da memória espacial associada ao LAM

O treino no LAM foi realizado como descrito no item 3.5. Vinte quatro ou 120 horas após a última sessão de treino os ratos foram submetidos a um teste de reativação na ausência da plataforma de escape (PT). 24 ou 120 horas após o teste (PT1) realizamos um novo teste na ausência da plataforma de escape (PT2 ou PT3).

3.7 Tratamentos farmacológicos

Para a realização dos diferentes tratamentos farmacológicos utilizamos uma cânula de infusão (0,05 mm de diâmetro), conectada a uma micro-seringa por meio de um tubo de polietileno acoplado a uma agulha de infusão; o fármaco a ser administrado foi colocado dentro do tubo e a agulha acoplada então à luz da cânula guia de infusão na cabeça do animal. A infusão foi realizada a uma velocidade de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ao término de cada infusão, a cânula foi deixada no local por 30-60 s adicionais para evitar refluxo. Utilizamos neste trabalho os seguintes fármacos:

- Anisomicina: inibidor da síntese de proteínas,

- AP5: antagonista seletivo competitivo do receptor NMDA,
- D-cicloserina: agonista do sitio da glicina do receptor NMDA,
- MK-801: antagonista seletivo não competitivo do receptor NMDA,
- Muscimol: agonista do receptor GABA.

Os fármacos foram dissolvidos em DMSO 2% ou solução salina 0,9% e guardados protegidos da luz a -20°C até o uso. As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios que mostraram o efeito destes fármacos sobre o aprendizado e a memória de ratos, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas. Os animais do grupo controle receberam infusão bilateral de $1\ \mu\text{l}$ do veículo utilizado para a preparação dos fármacos estudados.

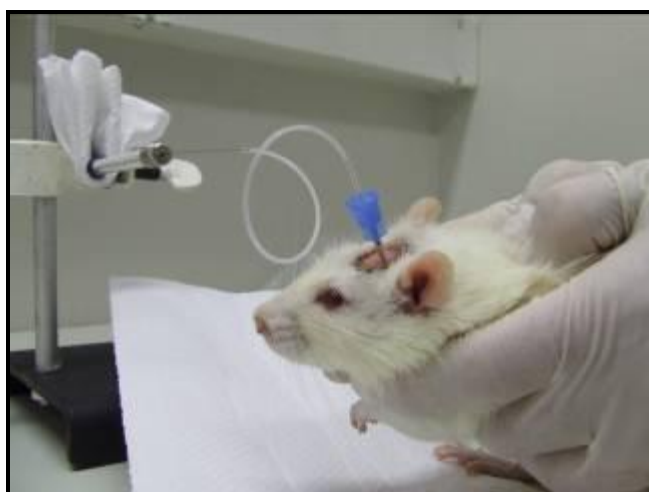


Figura 5. Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão, 1,0 mm maior em comprimento do que a cânula-guia é introduzida na luz desta, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco ou salina sejam infundidos.

3.8 Controle histológico da região estudada

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 $1\ \mu\text{l}$ de uma solução de azul de metileno 0,1% através das mesmas cânulas utilizadas para a aplicação das drogas. Quinze minutos depois da infusão, os animais foram sacrificados por decapitação, seus cérebros 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 (FIG. 1).

3.9 Análise Estatística dos Dados

Para a análise dos dados do LAM utilizamos testes de estatística paramétrica (ANOVA de uma ou duas vias seguidas do contraste adequado ou teste t de Student para amostra única ou amostra pareadas). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise foi realizada utilizando o software Prism Graph-Pad 5.1.

4 RESULTADOS

4.1 A infusão intra-hipocampal de AP5 antes de uma sessão de reativação não reforçada no labirinto aquático de Morris, prejudica a evocação da memória espacial.

Com o objetivo de verificar se o bloqueio do receptor NMDA antes de uma sessão de reativação, não reforçada (sem a presença da plataforma), exerce algum efeito sobre a evocação da memória espacial, ratos foram treinados durante cinco dias na versão espacial do LAM, conforme descrito no item 3.5, sendo submetidos a uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape (PT1) 24 horas após o treino. 5, 15 ou 30 minutos antes da realização de PT1 (FIG. 6), os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal com VEH ou o antagonista do receptor NMDA, AP5 (5 μ g/lado). A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o PT1. Como se pode observar nas FIG. 6B e 6C os animais que receberam a infusão de AP5 15 ou 30 min antes de PT1 passaram uma menor porcentagem de tempo no quadrante alvo em comparação com os animais controles, porém no teste realizado 24 horas após PT1 (PT2), ambos os grupos de animais passaram a mesma porcentagem de tempo no quadrante alvo. Indicando que os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são necessários durante a evocação da memória espacial, e que seu efeito inibitório é temporário.

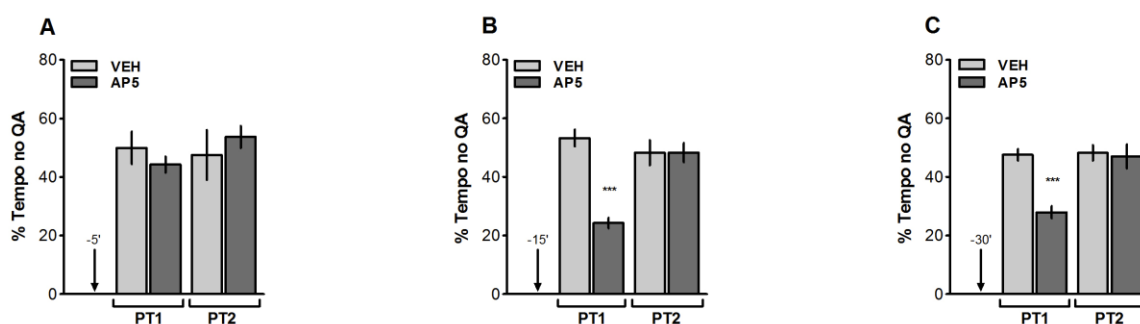


Figura 6. AP5 modifica a evocação da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal antes de um teste na ausência de plataforma de escape. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 h após foram divididos em grupos experimentais e submetidos a um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape (PT1). **A)** Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam VEH ou AP5 (5 µg/lado) 5 minutos antes do teste (PT1). A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 horas após PT1. Os dados estão apresentados como a média ± SEM. **B)** Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam VEH ou AP5 (5 µg/lado) 15 minutos antes do teste (PT1). A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 horas após PT1. Os dados estão apresentados como a média ± SEM. *** $p < 0,0001$ vs VEH; $n = 8$ por grupo. **C)** Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam VEH ou AP5 (5 µg/lado) 30 minutos antes do teste (PT1). A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 horas após PT1. Os dados estão apresentados como a média ± SEM. *** $p < 0,0001$ vs VEH; $n = 8$ por grupo.

4.2 A infusão intra-hipocampal de AP5 após uma sessão de reativação não reforçada no labirinto aquático de Morris, não prejudica a reconsolidação da memória espacial.

Com o objetivo de investigar se o bloqueio do receptor NMDA, após uma sessão de reativação não reforçada (sem a presença da plataforma), exerce algum efeito sobre a reconsolidação da memória espacial, ratos foram treinados durante cinco dias na versão espacial do LAM, conforme descrito no item 3.5, sendo submetidos a uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape (PT1) 24 horas após a última sessão de treino. Imediatamente, 30 ou 90 minutos após PT1, os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal, com VEH ou o antagonista seletivo do receptor NMDA, AP5 (FIG. 7: A-0,5 µg/lado; B-2,5 µg/lado; C-5 µg/lado ou D-25 µg/lado). A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste na ausência da plataforma de escape (PT2) realizado 24 ou 120 horas após o PT1.

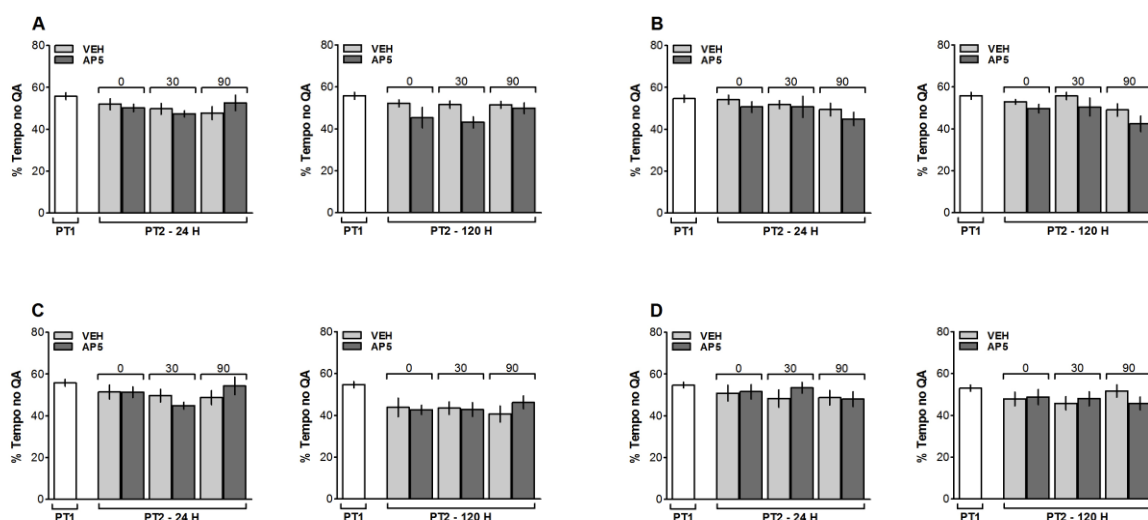


Figura 7. AP5 não interfere na retenção da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM, 24 h após foram divididos em grupos experimentais e submetidos a um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape (PT1). Os animais receberam na região CA1, VEH ou AP5 (A-0,5 µg/lado; B-2,5 µg/lado; C-5 µg/lado; D-25 µg/lado) imediatamente, 30 ou 90 minutos após PT1. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste na ausência da plataforma de escape (PT2) realizado 24 ou 120 h após PT1. Os dados estão apresentados como a média (\pm SEM) da porcentagem do tempo total gasto no quadrante alvo (QA); n=8 por grupo.

Como pode ser observado nas FIG. 7A, 7B, 7C e 7D os animais que receberam a infusão de AP5 em diferentes tempos após a sessão de reativação, apresentaram um comportamento similar ao grupo controle quando testados 24 ou 120 horas após PT1. Assim, o bloqueio do receptor NMDA por AP5 não prejudica a reconsolidação da memória espacial, pois quando esta foi labilizada, através da utilização de uma sessão de reativação, AP5 não interferiu sobre esta memória.

4.3 A D-cicloserina melhora a consolidação e a reconsolidação da memória espacial quando administrada na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape.

Da mesma forma que a hipótese tradicional da consolidação só foi aceita após a comprovação da existência de drogas pró amnésicas, a corroboração conclusiva da existência de um processo reconsolidatório requer a demonstração de que o mesmo possa ser modulado positivamente por agentes farmacológicos. Com o objetivo de verificar se a consolidação da memória espacial poderia ser melhorada farmacologicamente, decidimos avaliar o efeito da D-cicloserina (D-SER), um agonista do sítio da glicina no receptor NMDA, e que diversos estudos já

demonstraram ser capaz de facilitar o aprendizado de distintas tarefas (Lelong *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2004; Akirav *et al.*, 2006). Primeiramente determinamos se a D-SER (10 µg/lado) infundida na região CA1 hipocampal era capaz de melhorar a aquisição da memória espacial no LAM. Para isso, os animais foram treinados no LAM somente por dois dias, utilizando um protocolo que envolvia oito largadas/dia (ver metodologia). Imediatamente após cada dia de treino, os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo, com VEH, D-SER (10 µg/lado) ou MK-801 (10 µg/lado), um antagonista não competitivo dos receptores NMDA. Os animais que receberam D-SER, encontraram a plataforma de escape mais rapidamente que os animais controles durante o segundo dia de treino (FIG. 8A), e passaram mais tempo nadando no quadrante alvo durante uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape realizado 24 h após a última sessão de treino (FIG. 8B). Enquanto que os animais que receberam MK-801, demoraram mais tempo para encontrar a plataforma de escape em comparação com os animais controles, durante o segundo dia de treino (FIG. 8A), e passaram menos tempo nadando no quadrante alvo durante uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape realizado 24 h após a última sessão de treino (FIG. 8B). Após termos demonstrado que a administração de D-SER melhora a consolidação da memória espacial no LAM avaliamos se a D-SER também poderia atuar melhorando a reconsolidação da memória espacial do LAM. Para isso, treinamos animais na versão espacial do LAM durante dois dias e 24 horas após realizamos um teste de retenção na ausência da plataforma de escape. Imediatamente depois administramos VEH, D-SER (10 µg/lado) ou MK-801 (10 µg/lado) na região CA1 hipocampal. Os animais que receberam D-SER logo após a reativação na ausência da plataforma de escape (FIG. 8C) mostraram uma melhora na retenção da memória durante um segundo teste de evocação (PT2) não reforçada realizado 24 h após PT1. Entretanto esse efeito não foi observado no teste realizado 120 h após PT1 (PT3). Os animais que receberam a infusão de MK-801 após a sessão de reativação, tiveram um comportamento parecido com o grupo controle, quando testados 24 ou 120 h após PT1 (FIG. 8C).

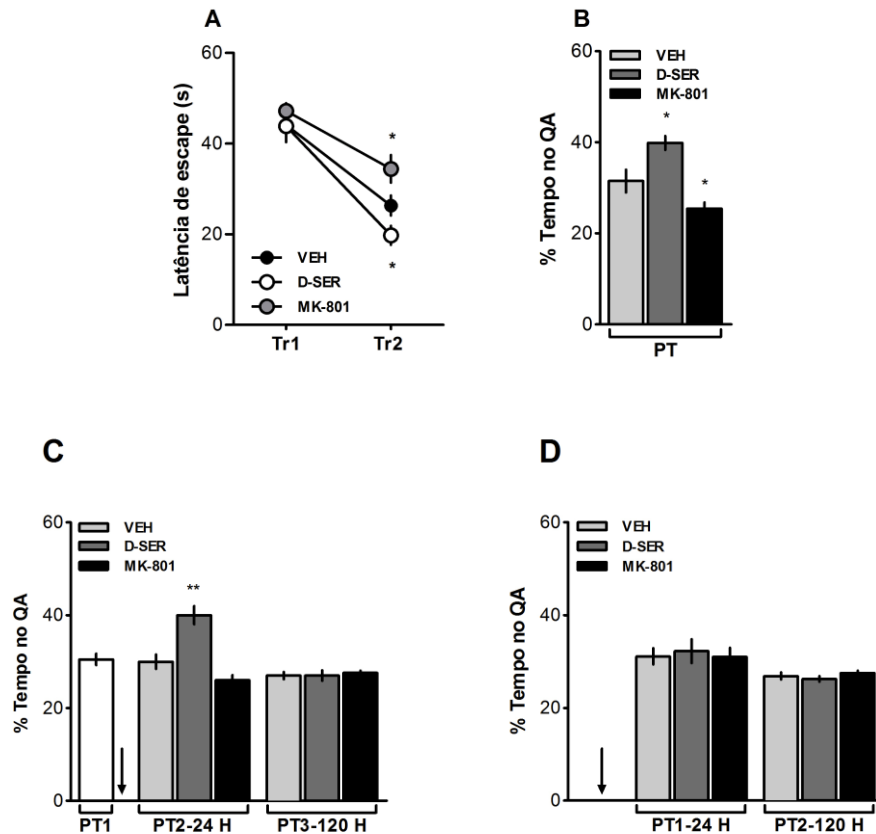


Figura 8. A D-cicloserina melhora a retenção da memória espacial quando administrada na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 2 dias na versão espacial do LAM. **A)** Média das latências de escape durante 2 dias de aquisição do aprendizado espacial para ratos que receberam VEH, D-cicloserina (10 µg/lado; D-SER) ou MK-801 (10 µg/lado) imediatamente após a última largada de cada sessão de treino. Os dados estão apresentados como médias ± SEM. * $p < 0,05$ vs VEH; $n = 8$ por grupo. **B)** Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam VEH, D-SER (10 µg/lado) ou MK-801 (10 µg/lado). Os dados estão apresentados como a média ± SEM. * $p < 0,05$ vs VEH; $n = 8$ por grupo. **C)** Os animais foram treinados durante 2 dias na versão espacial do LAM e, 24 h após a última sessão de treino foram submetidos a um teste na ausência da plataforma de escape. Imediatamente após o teste os animais receberam VEH, D-SER (10 µg/lado) ou MK-801 (10 µg/lado). A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 h após o primeiro e em um terceiro teste realizado 120 h após o primeiro (PT3). Os dados estão apresentados como a média ± SEM da porcentagem do tempo total de natação gasto no QA. ** $p < 0,01$ vs VEH; $n = 8$ por grupo. **D)** Os animais foram tratados exatamente como mostrado na figura 8C, exceto que não foram submetidos a um teste um dia após a última sessão de treino. VEH, D-SER (10 µg/lado) ou MK-801 (10 µg/lado) foram infundidos na região CA1 24 h pós treino (INF) e a retenção da memória foi avaliada em um PT realizado 24 h (PT1) ou 120 h (PT2) após a infusão; $n = 8$ por grupo.

Estes dados confirmam que a administração de D-SER na região CA1 hipocampal melhora a aquisição e a consolidação da memória espacial do LAM. A infusão de D-SER, imediatamente após o teste de reativação na ausência da plataforma de escape também melhora a reconsolidação da memória espacial no LAM. Enquanto MK-801, prejudica a aquisição e a consolidação, mas não a reconsolidação da memória do LAM. A infusão intra-hipocampal de D-SER ou MK-801, 24 h após o treino no LAM, na ausência de um evento comportamental

relevante, não induz qualquer alteração na retenção da memória espacial previamente adquirida (FIG. 8D).

4.4 A infusão intra-hipocampal de muscimol, 15 minutos antes de uma sessão de reativação não reforçada no labirinto aquático de Morris, prejudica a evocação da memória espacial.

Com o objetivo de verificar se a ativação do receptor GABA, antes de uma sessão de reativação, não reforçada (sem a presença da plataforma), exerce algum efeito sobre o processo de evocação da memória espacial, ratos foram treinados durante cinco dias na versão espacial do LAM, conforme descrito no item 3.5, sendo submetidos a uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape (PT1) 24 horas após a última sessão de treino. 15 minutos antes da realização de PT1 (FIG. 9), os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal com VEH ou o agonista seletivo do receptor GABA, muscimol (0,1 µg/lado). A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o PT1 (PT2).

Como pode ser observado na FIG. 9, os animais que receberam a infusão de muscimol, na região CA1 do hipocampo, 15 minutos antes de PT1 passaram uma menor porcentagem de tempo no quadrante alvo em comparação com os animais controles, porém durante a sessão de teste realizada 24 horas após PT1 (PT2), ambos os grupos de animais, passaram a mesma porcentagem de tempo no quadrante alvo. Estes resultados mostram que a ativação dos receptores GABA prejudica a evocação da memória espacial, e que seu efeito inibitório é temporário.

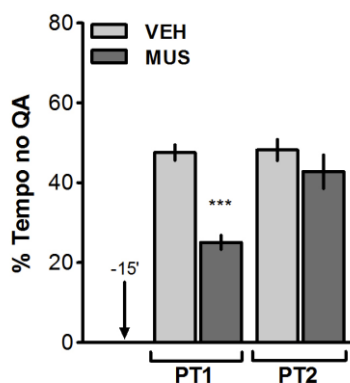


Figura 9. Muscimol modifica a evocação da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal antes de um teste na ausência de plataforma de escape. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM, 24 h após foram divididos em grupos experimentais e submetidos a um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape (PT1). Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam VEH ou muscimol (0,1 µg/lado) 15 minutos antes do teste (PT1). A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 h após PT1. Os dados estão apresentados como a média ± SEM. *** $p < 0,0001$ vs VEH; $n = 8$ por grupo.

4.5 A infusão intra-hipocampal de muscimol, 15 minutos antes de uma sessão de reativação não reforçada no LAM impede a evocação da memória espacial. A infusão de anisomicina imediatamente após essa sessão prejudica a retenção da memória em um segundo teste.

Ao verificarmos que a ativação do receptor GABA, antes de uma sessão de reativação, não reforçada (sem a presença da plataforma), é capaz de prejudicar a evocação da memória do LAM, decidimos verificar o efeito da infusão de anisomicina (ANI), inibidor de síntese de proteínas, quando administrado imediatamente após a sessão de reativação na ausência de reforço (PT1) nos animais que haviam recebido muscimol 15 minutos antes de PT1. Para tal, ratos foram treinados durante cinco dias na versão espacial do LAM, conforme descrito no item 3.5, sendo submetidos a uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape (PT1) 24 horas após o último dia de treino. 15 minutos antes da realização de PT1, os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal com VEH ou o agonista seletivo do receptor GABA, muscimol (0,1 µg/lado). Imediatamente após PT1, os grupos que receberam VEH ou muscimol, foram divididos em 2 grupos cada, que receberam VEH ou ANI (160 µg/lado) na região CA1 do hipocampo. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste (PT2) na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o PT1.

Como pode se observar na FIG. 10, os animais que receberam muscimol 15 minutos antes do teste na ausência da plataforma de escape (PT1), passaram uma menor porcentagem de tempo no quadrante alvo em comparação com os animais controles. Os animais que receberam VEH ou muscimol 15 minutos antes e ANI imediatamente após PT1, ao serem submetidos ao segundo teste 24 horas após PT1 (PT2), permaneceram com a memória inibida. Porém, os animais que receberam muscimol 15 minutos antes e VEH imediatamente após PT1, apresentaram o mesmo desempenho dos animais controles. Demonstrando que os receptores GABA interferem na evocação da memória espacial, entretanto sua ativação não é suficiente para impedir a síntese de proteínas, levando a um prejuízo na retenção da memória espacial no teste realizado 24 horas após PT1.

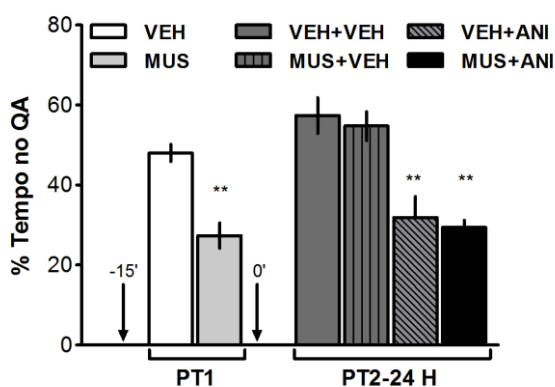


Figura 10. Muscimol interfere na evocação da memória espacial quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal antes de uma sessão de reativação na ausência da plataforma de escape, e anisomicina imediatamente após essa evocação impede que a memória se recupere. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 h após foram divididos em grupos experimentais e submetidos a um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape (PT1). Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam VEH ou muscimol (0,1 µg/lado) 15 minutos antes do teste (PT1). Imediatamente após PT1 os animais foram divididos em grupos que receberam VEH ou anisomicina (160 µg/lado). As setas pretas indicam o momento das infusões. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 horas após PT1. Os dados estão apresentados como a média ± SEM. ** $p < 0,01$ vs VEH; $n = 8$ por grupo.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a inibição dos receptores NMDA por AP5, 15 ou 30 min antes da sessão de reativação na ausência de reforço no LAM, foi capaz de prejudicar a evocação dessa memória, porém esse efeito foi temporário, não sendo observado no teste realizado 24 horas após PT1 (PT2; FIG. 6), demonstrando que durante determinado tempo antes da evocação da memória, é necessário que ocorra a ativação dos receptores NMDA.

Memórias já consolidadas, quando evocadas entram em um estado vulnerável, durante o qual se tornam novamente sensíveis à interferência de agentes amnésicos, influências neuro-humorais e aprendizados adicionais (Loftus e Palmer, 1974; Izquierdo, 1989; Schacter e Dodson, 2001). Essas memórias, para persistirem, necessitam passar por um processo de estabilização conhecido como reconsolidação (Sara, 2000; Nader, 2003; Eisenberg e Dudai, 2004; Lee *et al.*, 2004). Os receptores NMDA parecem estar envolvidos nesse processo, pois já foi demonstrado sua participação na reconsolidação de memórias de medo contextual em camundongos (Kida *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004; Mamiya *et al.*, 2009). Entretanto, os resultados aqui obtidos, mostram que esses receptores parecem não estar envolvidos na reconsolidação da memória espacial do LAM, pois quando seu antagonista, AP5, foi administrado em diferentes tempos (0, 30 e 90 min) e diferentes doses (0,5 µg/lado; 2,5 µg/lado; 5 µg/lado ou 25 µg/lado) após a sessão de reativação na ausência de reforço, não foi capaz de bloquear a memória em questão (FIG. 7).

Diversos trabalhos, utilizando diferentes paradigmas comportamentais, demonstram que para haver a reconsolidação da memória, é preciso que ocorra um evento comportamental relevante durante a sessão de reativação (Debiec *et al.*, 2002; Kida *et al.*, 2002; Pedreira *et al.*, 2002; Eisenberg *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Inda *et al.*, 2005; Gainutdinova *et al.*, 2005). Na tarefa de LAM, a reconsolidação pode ser observada quando a evocação da memória ocorre na ausência de reforço (ausência da plataforma de escape). Isso foi comprovado através do uso de diferentes agentes amnésicos que atuam sobre a inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de RNAm e inibição da PKC (proteína cinase C) (Rossato *et al.*, 2006; Bonini *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008).

Nos resultados obtidos neste trabalho, o antagonista do receptor NMDA não interfere na reconsolidação da memória do LAM, e isso não é devido a um protocolo ineficaz, pois trabalhos anteriores já comprovaram a existência do processo reconsolidatório, utilizando o mesmo protocolo do presente trabalho (Rossato *et al.*, 2006; Bonini *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008).

Os primeiros autores a sugerirem o envolvimento dos receptores NMDA na memória espacial foram Morris e colaboradores (1986), ao estudarem o efeito da administração crônica i.c.v. de AP5, na memória espacial no labirinto aquático.

Depois desse, diversos outros estudos têm demonstrado que a ativação de receptores NMDA é requerida para a memória espacial (Sakimura *et al.*, 1995; Tsien *et al.*, 1996; Nakazawa *et al.*, 2004). Estudos genéticos têm descrito que a deleção gênica de subunidades do receptor NMDA é capaz de prejudicar a memória espacial (Tsien *et al.*, 1996; Sakimura *et al.*, 1995), enquanto a expressão aumentada de subunidades do receptor levam ao aumento do aprendizado espacial (Tang *et al.*, 1999; Zhuo, 2009).

No LAM, AP5 prejudica o aprendizado não só com a infusão i.c.v. (Butcher *et al.*, 1990, Davis *et al.*, 1992) mas também quando a administração ocorre intrahipocampal (Morris *et al.*, 1989), além de prejudicar a memória quando a plataforma é mudada de lugar para o quadrante diagonal oposto, mas não quando uma versão não espacial é realizada, sugerindo que AP5 não interfere no processo sensorimotor e motivacional (Butcher *et al.*, 1991).

Outros trabalhos também tentaram demonstrar a participação dos receptores NMDA, observando que a infusão de seu antagonista pré-treino mostrou-se capaz de prejudicar a aquisição da memória espacial em ratos, porém a mesma dose administrada após o treino não tem um efeito inibidor acentuado. Entretanto, quando a infusão ocorre cinco minutos antes do teste, o inibidor não é capaz de prejudicar a evocação da memória espacial (Liang *et al.*, 1994).

Além da memória espacial, a infusão do antagonista dos receptores NMDA tem sido relatada por prejudicar o aprendizado de outras tarefas, dentre elas, a tarefa de localização (Morris, 1986), aquisição da memória do radial maze, retenção da memória de esquiva inibitória (Danysz *et al.*, 1983) e aquisição da tarefa de discriminação olfativa (Staubli *et al.*, 1989), quando o tratamento é realizado tanto pré quanto pós-treino.

Baseado nos resultados apresentados, podemos determinar que durante um

certo período de tempo, os receptores NMDA devem estar ativos para que a memória aprendida possa ser evocada. Quanto a participação de receptores NMDA na reconsolidação da memória espacial do LAM, demonstramos que até a dose estudada, os receptores NMDA parecem não estar envolvidos na reconsolidação desta memória.

Quanto a D-cicloserina, podemos verificar que ocorre uma melhora na aquisição (FIG. 8A), na consolidação (FIG. 8B), bem como na reconsolidação da memória espacial (FIG. 8C). Um argumento muito utilizado para contestar a hipótese da reconsolidação é que quase todas as conclusões a respeito deste processo resultaram de experimentos usando drogas conhecidas por bloquear a consolidação e/ou a evocação.

Entretanto, algumas tentativas foram feitas no intuito de analisar os efeitos da administração de drogas pró-amnésicas após a reativação. Em muitos casos, no entanto (Horne *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1993, 1999), o protocolo usado para a reativação envolveu reexposição a um estímulo igual ou muito similar àquele usado durante o treino e, portanto, o efeito facilitatório observado pode ser atribuído à ação destas drogas no que é aprendido durante esta nova sessão de treino, e não da reconsolidação do traço original.

Assim, nos experimentos realizados demonstramos que o agonista do sítio de união para glicina do receptor NMDA, D-SER, acelera a aquisição e a consolidação da memória espacial associada ao LAM. Mais importante ainda, indica que a D-SER administrada na região CA1 do hipocampo dorsal logo após um teste de evocação não reforçado, melhora a retenção da memória durante um segundo teste realizado 24 horas após (FIG. 8).

Quanto a administração do antagonista não competitivo dos receptores NMDA, MK-801, esse mostrou-se capaz de prejudicar a aquisição e também a consolidação da memória num teste realizado 24 h após a última sessão de treino no LAM. Porém, assim como AP5, MK-801, não tem efeito sobre a reconsolidação da memória espacial do LAM.

O fato de a D-SER não ter afetado a retenção na ausência de reativação da memória (FIG. 8D), demonstra que esta droga não age *per se*, e indica que o efeito pró-amnésico da infusão de D-SER após a evocação é dependente da reativação da memória espacial. Nossos resultados estão de acordo com um trabalho que mostra que a ativação da PKA (proteína cinase dependente de AMPc) na amígdala

basolateral após a evocação, aumenta a retenção da memória de medo (Tronson *et al.*, 2006), sendo a reconsolidação o processo mais plausível para descrever estes resultados.

A evocação não reforçada pode enfraquecer o traço reativado, mas, se a memória original persiste como acontece no trabalho de Tronson e colaboradores (2006) e em outros experimentos, então este enfraquecimento pode ser desfeito e permitir a re-estabilização do traço original. A ativação farmacológica da maquinaria molecular envolvida neste processo pode melhorar e levar a produção de uma memória reconsolidada mais forte do que a inicial. A possibilidade de um fenômeno semelhante a este está extensivamente documentada em inúmeros trabalhos que mostram drogas que induzem melhora da consolidação da memória (Lynch, 2002; Izquierdo e McGaugh, 2000; Izquierdo *et al.*, 2006). Nossos resultados sugerem que a evocação labiliza a memória espacial e o traço desestabilizado recupera-se através de um processo de reconsolidação, dependente do hipocampo e que é melhorado por D-SER logo após a reativação da memória.

Assim como acontece com o antagonista do receptor NMDA, o efeito inibitório sobre a evocação da memória espacial do LAM, também é observado com o agonista dos receptores GABA, muscimol, quando infundido 15 minutos antes da sessão de reativação na ausência de reforço (PT1; FIG. 9). O efeito do agonista muscimol sobre os receptores GABA não é duradouro, pois no teste realizado 24 horas após PT1 (PT2), a memória original é recuperada. Porém, ao administrarmos muscimol 15 minutos antes da sessão de reativação na ausência de reforço e administrarmos ANI imediatamente após essa sessão (PT1), observamos que ocorre um prejuízo na retenção da memória (FIG. 10).

O neurotransmissor GABA, é o principal neurotransmissor com ação inibitória no SNC de mamíferos (Brioni *et al.*, 1989; Castellano *et al.*, 1989). Diversos estudos farmacológicos, tem demonstrado o efeito de agonistas e antagonistas GABAérgicos sobre os mecanismos da memória, demonstrando que a administração pós-treino de antagonistas GABA é capaz de aumentar a consolidação de memórias (Castellano e McGaugh, 1990), enquanto agonistas (Akirav *et al.*, 2006) prejudicam a retenção de memórias. Sugerindo assim, que os receptores GABA são funcionalmente envolvidos na formação e estabilização de memórias.

Estudos quanto a participação desses receptores, demonstraram que a infusão do agonista GABA, muscimol, é capaz de impedir a formação da memória de

esquiva inibitória se administrada sistemicamente ou localmente na amígdala, hipocampo ou córtex entorrinal (Ammassari-Teule *et al.*, 1991; Brioni *et al.*, 1989; Carbo Tano *et al.*, 2009; Introini-Collison *et al.*, 1994). E Rossato *et al.* (2004) examinou o curso de tempo do envolvimento de GABA na memória, onde demonstrou que a memória da esquiva inibitória é prejudicada quando a infusão de muscimol na região CA1 e na amígdala ocorre imediatamente após o treino.

A infusão de muscimol também prejudica a memória de maneira dose-dependente, se administrado na região septal, antes do treino no LAM (Brioni *et al.*, 1990). Enquanto a administração de muscimol imediatamente após o treino, leva ao prejuízo da memória de habituação a um novo ambiente, a qual é uma das mais elementares formas de memória não associativa (Viana *et al.*, 2000).

O efeito do inibidor de síntese proteica, anisomicina (ANI), na reconsolidação da memória espacial já foi comprovado, demonstrando que a administração de ANI, imediatamente após uma sessão de reativação na ausência de reforço é capaz de bloquear a reconsolidação da memória do LAM (Rossato *et al.*, 2006). Neste trabalho observamos que ao se bloquear a evocação da memória com o agonista do receptor GABA, muscimol, 15 minutos antes do primeiro dia de teste (PT1), e injetar ANI imediatamente após essa sessão de reativação, ao se realizar o segundo teste 24 h após PT1 (PT2), a memória não é capaz de se recuperar, prejudicando assim, a retenção da memória espacial. Corroborando os resultados de Rossato *et al.* (2006), observa-se que os animais que receberam a infusão de VEH antes de PT1 e receberam ANI imediatamente após PT1, não recuperaram a memória no segundo teste (PT2), prejudicando também a retenção da memória. Enquanto os animais que não receberam o inibidor de síntese proteica, a memória é recuperada no teste realizado 24 h depois (PT2; FIG.10).

Estes resultados demonstram que o efeito de ANI é mais marcante que a inibição da evocação por muscimol, pois mesmo o receptor GABA estando ativado no momento da reativação sem reforço, o efeito de ANI permanece o mesmo em PT2, onde os grupos que receberam VEH ou muscimol antes da reativação e receberam ANI imediatamente após essa sessão, apresentam um prejuízo na retenção da memória do LAM, dependendo um menor tempo no quadrante alvo, se comparado com o grupo que recebeu VEH em ambos os momentos. Indicando assim, que mesmo não ocorrendo a reativação da memória espacial devido a ativação do receptor GABA por muscimol, observamos um prejuízo na retenção da

memória espacial dos animais que receberam anisomicina.

6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A inibição dos receptores NMDA 15 ou 30 minutos antes da sessão de reativação na ausência de reforço, impede a evocação da memória por um breve período de tempo, esse efeito inibitório não se observa se a infusão ocorrer 5 minutos antes da sessão de reativação sem reforço.

- Os receptores NMDA na região CA1 do hipocampo dorsal, não estão envolvidos na reconsolidação da memória espacial do labirinto aquático de Morris.

- O agonista do receptor NMDA, D-SER, melhora a consolidação e a reconsolidação da memória espacial do LAM, quando administrada na região CA1 do hipocampo dorsal.

- A ativação dos receptores GABA 15 minutos antes da sessão de reativação na ausência de reforço, impede a evocação da memória por um breve período de tempo.

- A administração do inibidor da síntese de proteínas, anisomicina, imediatamente após a reativação na ausência de reforço em animais que haviam recebido muscimol 15 minutos antes da sessão de reativação, impede a retenção da memória do LAM, no teste realizado 24 horas após PT1.

7 REFERÊNCIAS

- AKIRAV, I.; RAIZEL, H.; MAROUN, M. Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA-A agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. **The European Journal of Neuroscience**, 23:758–64, 2006.
- ALBERINI, C.M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends in Neuroscience**, 28:51-6, 2005.
- ALBERINI, C.M.; MILEKIC, M.H.; TRONEL, S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. **Cellular and Molecular Life Science**, 63: 999-1008, 2006.
- AMMASSARI-TEULE, M.; PAVONE, F.; CASTELLANO, C.; MCGAUGH, J.L. Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. **Brain Research**, 551: 104–9, 1991.
- AROLFO, M.P. e BRIONI, J.D. Diazepam impairs place learning in the Morris water maze. **Behavioral and Neural Biology**, 55: 131-6, 1991.
- BLISS, T.V.P. e COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361:31–9, 1993.
- BONINI, J.S.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, 147(1):37-45, 2007.
- BRIONI, J.D.; NAGAHARA, A.H.; MCGAUGH, J.L. Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. **Brain Research**, 487: 105–2, 1989.
- BRIONI, J.D.; DECKER, M.W.; GAMBOA, L.P.; IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. **Brain Research**, 522: 227-34, 1990.
- BUTCHER, S.P.; DAVIS, S.; MORRIS, R.G.M. A dose-related impairment of spatial learning by the NMDA receptor antagonist, 2-amino-S-phosphonovalerate (APS). **European Neuropsychopharmacology**, 1: 15-20, 1990.
- BUTCHER, S.P.; HAMMERGER, A.; MORRIS, R.G.M. Intracerebral distribution of D-L-2-amino-phosphonopetanoic acid (AP5) and the dissociation of different types of learning. **Experimental Brain Research**, 83: 1521-6, 1991.
- CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learning and Memory**, 11: 572-78, 2004.
- CARBO TANO, M.; MOLINA, V.A.; MALDONADO, H.; PEDREIRA, M.E. Memory

consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: The role of the GABAergic system. **Neuroscience**, 158: 387–401, 2009.

CASTELLANO, C.; BRIONI, J.D.; NAGAHARA, A.H.; MCGAUGH, J.L. Post-training systemic and intra-amygdala administration of the GABA-B agonist baclofen impairs retention. **Behavioral Neural Biology**, 52: 170-9, 1989.

CASTELLANO, C. e MCGAUGH, J.L. Effects of post training bicuculline and muscimol on retention: Lack of state dependency. **Behavioral Neural Biology**, 54, 156–64, 1990.

COLLINGRIDGE, G. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. **Nature**, 330: 604-5, 1987.

COSTA-MATTIOLI, M. e SONENBERG, N. Translational control of gene expression: a molecular switch for memory storage. **Progress in Brain Research**, 169: 81-95, 2008.

DANYSZ, W.; WROBLEWSKI, J. T.; COSTA, E. Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. **Neuropharmacology**, 27:653-6, 1988.

DAVIS, S.; BUTCHER, S.P.; MORRIS, R.G.M. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. **The Journal of Neuroscience**, 12, 21–34, 1992.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus**, 18 (10): 29-39, 2008.

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

D`HOOGHE, R. e DE DEYN, P.P. Application of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, 36: 60-90, 2001.

DOYLE, M. e KIEBLER, M.A. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. **The Ambo Journal**, 30: 3540-52, 2011.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual Review of Psychology**, 55: 51-86, 2004.

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Current Opinion In Neurobiology**, 16: 174-8, 2006.

DUDAI, Y. e EISENBERG, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. **Neuron**, 44:93-100, 2004.

EISENBERG, M.; KOBILO, T.; BERMAN, D.E.; DUDAI, Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. **Science**, 301:1102-4, 2003.

EISENBERG, M. e DUDAI, Y. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Melaka: old fears don't die. **The European journal of neuroscience**, 20: 3397– 403, 2004.

GAINUTDINOVA, T.H.; TAGIROVA, R.R.; ISMAILOVA, A.I.; MURANOVA, L.N.; SAMAROVA, E.I.; GAINUTDINOV, K.L.; BALABAN, P.M. Reconsolidation of a context long- term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis. **Learning & Memory**, 12: 620–5. 2005.

GASKIN, S. e WHITE, N.M. Temporary inactivation of the dorsal entorhinal cortex impairs acquisition and retrieval of spatial information. **Neurobiology of Learning and Memory**, 93: 203-7, 2010.

HORNE, C.A.; RODRIGUEZ, W.A.; WRIGHT, T.P.; PADILLA, J.L. Time-dependent effects of fructose on the modulation of a reactivated memory. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, 21:649-58, 1997.

INDA, M.C.; DELGADO-GARCIA, J.M.; CARRION, A.M. Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. **The Journal of Neuroscience**, 25: 2070–80, 2005.

INTROINI-COLLISON, I.B.; CASTELLANO, C.; MCGAUGH, J.L. Interaction of GABAergic and beta-noradrenergic drugs in the regulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, 61: 150–5, 1994.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, 51: 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I., DA CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M. B. C., & MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behavioral and Neural Biology**, 58:16–25, 1992.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393: 635-6, 1998a.

IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. **Trends in Neuroscience**, 21: 421-4, 1998b.

IZQUIERDO, I. e MCGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**, 11: 517-34, 2000.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 134 p.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neuroscience**, 29: 496-505, 2006.

IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; DA COSTA, J.C.; FURINI, C.; ZINN, C.; CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I. A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, 88: 160-6, 2007.

JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C.; DA SILVA, R.C.; BIANCHIN, M.; RUSCHEL, A.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Amnesia by infusion of glutamate receptor blockers into the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex. **Behavioral and Neural Biology**, 58:76–80, 1992.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000, 592 p.

KIDA, S.; JOSSELYN, S.A.; DE ORTIZ, S.P.; KOGAN, J.H.; CHEVERE, I.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nature Neuroscience**, 5: 348-55, 2002.

LEE, J.L.; EVERITT, B.J.; THOMAS, K.L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, 304: 839–43, 2004.

LEE, J.L.; MILTON, A.L.; EVERITT, B.J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. **The Journal of Neuroscience**, 26: 10051-6, 2006.

LEE, I. e SOLIVAN, F. The roles of the medial prefrontal cortex and hippocampus in a spatial paired-association task. **Learning and Memory**, 15: 357-67, 2008.

LELONG, V.; DAUPHIN, F.; BOULOUARD, M. RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. **Neuropharmacology**, 41:517-22, 2001.

LIANG, K.C.; HON, W.; TYAN, Y.M.; LIAO, W.L. Involvement of hippocampal NMDA and AMPA receptors in acquisition, formation and retrieval of spatial memory in the Morris water maze. **The Chinese Journal of Physiology**, 37 :201-12, 1994.

LOFTUS, E.F. e PALMER, J.C. Reconstruction of automobile destruction: An example of interaction between language and memory. **Journal of Verbal Learning & Verbal Behavior**, 13: 585-9, 1974.

LYNCH, G. Memory enhancement: the search for mechanism-based drugs. **Nature Neuroscience**, Suppl:1035-8, 2002.

MAMIYA, N.; FUKUSHIMA, H.; SUZUKI, A.; MATSUYAMA, Z.; HOMMA, S.; FRANKLAND, P.W.; KIDA, S. Brain Region-Specific Gene Expression Activation Required for Reconsolidation and Extinction of Contextual Fear Memory. **The Journal of Neuroscience**, 29: 402-13, 2009.

MCDONALD, R.J.; HONG, N.S.; CRAIG, L.A.; HOLAHAN, M.R.; LOUIS, M.; MULLER, R.U. NMDA-receptor blockade by CPP impairs post-training consolidation of a rapidly acquired spatial representation in rat hippocampus. **The European Journal of Neuroscience**, 22: 1201-13, 2005.

MELLO E SOUZA, T.; VIANNA, M.R.; RODRIGUES, C.; QUEVEDO, J.; MOLETA, B.A.; IZQUIERDO, I. Involvement of the medial precentral prefrontal cortex in memory consolidation for inhibitory avoidance learning in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 66: 615-22, 2000.

MERLO, E.; FREUDENTHAL, R.; MALDONADO, H.; ROMANO, A. Activation of the transcription factor NF-kappa B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. **Learning and Memory**, 12: 23-9, 2005.

MONAGHAN, D.T.; ANDALORO, V.J.; SKIFTER, D.A. Molecular determinants of NMDA receptor pharmacological diversity. **Progress in Brain Research**, 116: 171-90, 1998.

MORRIS, R.G.M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 11: 47-60, 1984.

MORRIS, R.G.M.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by N-methyl-D-aspartate antagonist, AP-5. **Nature**, 319: 774-6, 1986.

MORRIS, R.G.M.; HALLIWELL, R.F.; BOWERY, N. Synaptic plasticity and learning. Do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? **Neuropsychological**, 27: 41-59, 1989.

NADER, K.; SCHAFE, G.E.; LE DOUX, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406: 722-6, 2000.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends in Neuroscience**, 26: 65-72, 2003.

NAKAZAWA, K.; MCHUGH, T.J.; WILSON, M.A.; TONEGAWA, S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. **Nature Reviews Neuroscience**, 5: 361-72, 2004.

NICOLL, R.A. e MALENKA, R.C. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. **Annals of New York Academy of Science**, 868: 515-25, 1999.

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

PEDREIRA, M.E.; PEREZ-CUESTA, L.M.; MALDONADO, H. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. **The Journal of Neuroscience**, 22: 8305-11, 2002.

PIRKER, S.; SCHWARZER, C.; WIESELTHALER, A.; SIEGHART, W.; SPERK, G. GABA_A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult brain. **Neuroscience**, 101: 815–50, 2000.

RICCIO, A.; ALVANIA, R.S.; LONZE, B.E.; RAMANAN, N.; KIM, T.; HUANG, Y.; DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H.; GINTY, D.D. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. **Molecular Cell**, 21: 283-94, 2006.

RICHARDSON, R.; LEDGERWOOD, L.; CRANNEY, J. Facilitation of fear extinction by D-cycloserine: theoretical and clinical implications. **Learning & Memory**, 11: 510-6, 2004.

RODRIGUEZ, W.A.; RODRIGUEZ, S.B.; PHILLIPS, M.Y.; MARTINEZ, J.L. JR. Post-reactivation cocaine administration facilitates later acquisition of an avoidance response in rats. **Behavioural and brain research**, 59: 125-9, 1993.

RODRIGUEZ, W.A.; HORNE, C.A.; PADILLA, J.L. Effects of glucose and fructose on recently reactivated and recently acquired memories. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, 23: 1285-317, 1999.

RODRIGUES, S.M.; SCHAFF, G.E.; LEDOUX, J.E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, 21: 6889-96, 2001.

RODRIGUES, S.M.; SCHAFF, G.E.; LEDOUX, J.E. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. **Neuron**, 44: 75-91, 2004.

ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; COITINHO, A.S.; VIANNA, M.R.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. **Behavioral Neuroscience**, 118: 563-8, 2004.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. **Learning and Memory**, 13: 431-40, 2006.

SAKIMURA, S.; KUTSUWADA, T.; ITO, I.; MANABE, T.; TAKAYAMA, C.; KUSHIYA, E.; YAGI, T.; ALZAWA, S.; INOUE, Y.; SUGIYAMA, H.; MISHINA, M. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor E1 subunit. **Nature**, 373: 151–5, 1995.

SAKURAI, S.Y.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Regionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors distinguished by quantitative autoradiography of [³H]MK-801 binding in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, 60: 1344–53, 1993.

SANGHA, S.; SCHEIBENSTOCK, A.; MORROW, R.; LUKOWIAK, K. Extinction requires new RNA and protein synthesis and the soma of the cell right pedal dorsal 1 in Linnaean strangles. **The Journal of Neuroscience**, 23: 9842–51, 2003.

SARA, S.J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learning & Memory**, 7: 73-84, 2000.

SCHACTER, D.L. e DODSON, C.S. Misattribution, false recognition and the sins of memory. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, 356: 1385-93, 2001.

SHIMIZU, E.; TANG, Y.P.; RAMPON, C.; TSIEN, J.Z. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. **Science**, 290: 1170-4, 2000.

SQUIRE, L.R. e ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and non declarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93: 13515-22, 1996.

SQUIRE, L.R. e KANDEL, E.R. **Memória: da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed, 2003, 252 p.

STAUBLI, U.; THIBAUT, O.; DI LORENZO, M.; LYNCH, G. Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition, but not retention, of olfactory memory. **Behavioral Neuroscience**, 103: 54-60, 1989.

STEWART, C.A. e MORRIS, R.G.M. The water maze, in: Saga A (Ed.), *Behavioural Neuroscience. A Practical Approach*, Vol. 1, IRL Press, and Oxford: 107-22, 1993.

STOLLHOFF, N.; MENZEL, R.; EISENHARDT, D. Spontaneous recovery from extinction depends on the reconsolidation of the acquisition memory in an appetitive learning paradigm in the honeybee (*Apis mellifera*). **The Journal of Neuroscience**, 25: 4485-92, 2005.

SUZUKI, A.; JOSELYN, S.A.; FLANKLAND, P.W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **The Journal of Neuroscience**, 24: 4787-95, 2004.

TANG, Y.P.; SHIMIZU, E.; DUBE, G.R.; RAMPON, C.; KERCHNER, G.A.; ZHUO, M.; LIU, G.; TSIEN, J.Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, 401: 63-9, 1999.

TANG, Y.P.; WANG, H.; FENG, R.; KYIN, M.; TSIEN, J.Z., Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. **Neuropharmacology**, 41: 779-90, 2001.

TORRAS-GARCIA, M.; LELONG, J.; TRONEL, S.; SARA, S.J. Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. **Learning & Memory**, 12: 18-22, 2005.

TRONSON, N.C.; WISEMAN, S.L.; OLAUSSON, P.; TAYLOR, J.R. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. **Nature in Neuroscience**, 9:167-9, 2006.

TRONSON, N.C. e TAYLOR, J.R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8: 262–75, 2007.

TSIEN, J.Z.; HUERTA, P.T.; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87: 1327-38, 1996.

VIANNA, M.R., ALONSO, M., VIOLA, H., QUEVEDO, J., DE PARIS, F., FURMAN, M., DE STEIN, M.L., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a non-associative learning task in the rat. *Learning and Memory*, 7: 333-40, 2000.

ZHUO, M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Molecular Brain*, 2:4, 2009.

ANEXO**ANEXO A-** Artigo submetido ao periódico Revista Brasileira de Psiquiatria.

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to Revista Brasileira de Psiquiatria.

Manuscript ID: RBP-2012-UA-0879
Title: Reconsolidação de memórias: o que acontece depois da evocação
Authors: Furini, Cristiane Cammarota, Martin
Date Submitted: 26-Apr-2012

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.1 (patents #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

[Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Revista Brasileira de Psiquiatria

**Reconsolidação de memórias: o que acontece depois da evocação**

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:	Furini, Cristiane; PUC-RS, Cammarota, Martin; PUC-RS,
Keywords:	Memory, Behavioral Neurology, Cognitive Neuroscience, Neurology, Other Areas Of Neuroscience

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

<http://mc.manuscriptcentral.com/rbp>

Reconsolidação de memórias: o que acontece depois da evocação**Memory reconsolidation: What's happen after retrieval****Título resumido:** Reconsolidação de memóriasCristiane R. G. Furini^{1,2} & Martín Cammarota^{1,2}

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

Correspondência deve ser enviada para:

Cristiane R. G. Furini

E-mail: cristianefurini@hotmail.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 ramal: 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 pesquisa	Outro apoio à pesquisa ou educação médica continuada	Honorários de palestrantes	Participação acionária	Consultor/ Conselho consultivo	Outro
Cristiane R. G. Furini	PUCRS	---	---	---	---	---	---
Martin Cammarota	PUCRS	---	---	---	---	---	---

Resumo

A evocação na ausência de reforço torna as memórias consolidadas novamente lábeis e suscetíveis a interferências farmacológicas e comportamentais, indicando que para persistirem depois de reativadas, as memórias devem passar por um processo ativo de re-estabilização denominado reconsolidação. Primeiramente descrita para uma tarefa de medo condicionado, a existência do processo reconsolidatório vem sendo demonstrada em inúmeras tarefas comportamentais e em diferentes espécies de animais. A reconsolidação também foi descrita em humanos, com a possibilidade de uso no tratamento de distúrbios psiquiátricos.

Palavras-chave: memória, consolidação, reconsolidação, evocação

Abstract

The memory retrieval in the absence of reinforcement makes the memories consolidated again labile and susceptible to behavioral and pharmacological interference, indicating that to persist after reactivated, memories must go through an active process of re-stabilization called reconsolidation. First described for a conditioned fear task, the existence of reconsolidatory process has been demonstrated in numerous behavioral tasks and in different animal species. The reconsolidation is also been described in humans, with the possibility of use in psychiatric disorders treatment.

Keywords: memory, consolidation, reconsolidation, retrieval

Introdução

O aprendizado é o processo por meio do qual nós, humanos, e outros animais adquirimos conhecimento sobre o mundo. O surgimento da capacidade de armazenar informações permitiu que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver problemas apresentados pelo meio ambiente, oferecendo aos animais uma maior adaptabilidade. No caso específico dos seres humanos, a memória exerce um papel ainda mais nobre, funcionando como um arcabouço que armazena nossa história pessoal, torna possível que crescamos e mudemos ao longo da vida, moldando o caráter e a personalidade dos indivíduos.¹

Porém, as memórias não se estabelecem em sua forma definitiva no momento da aprendizagem. Ao contrário, durante um breve período depois de adquiridas, as memórias permanecem suscetíveis à ação de distintos agentes amnésicos², e vão tornando-se paulatinamente resistentes a esses agentes, através de um processo de estabilização dependente da síntese de proteínas denominado consolidação.³ A teoria da consolidação postula que, uma vez consolidadas, as memórias são armazenadas de forma permanente e tornam-se imunes a alterações subsequentes.⁴

Entretanto, essa premissa foi desafiada ainda na década de 1960, por Misanin e colaboradores.⁵ Desde então, diversos estudos vem sugerindo que a evocação na ausência de reforço torna as memórias consolidadas novamente lábeis e suscetíveis a interferências farmacológicas e comportamentais,^{6,7} indicando que para persistirem depois de reativadas, as memórias devem passar por um processo ativo de re-estabilização denominado reconsolidação.⁷⁻⁹

Mecanismos da reconsolidação

Da mesma forma que a consolidação, somente durante um período de tempo a fase de reconsolidação pode sofrer interferências.⁵

Os achados reportados por Nader e colaboradores⁷ demonstrando que, em ratos, a infusão intra-amígdala de um inibidor da síntese proteica imediatamente após a evocação de uma resposta de medo condicionado induz amnésia persistente, resultaram de grande importância para reavivar o estudo da reconsolidação. E o fato de inibidores da síntese de proteínas não apresentarem efeito algum quando administrados na ausência da expressão da memória sugere que, ao serem reativadas, as memórias entram outra vez em um estado lábil e que, para persistirem, devem passar novamente por um processo dependente da síntese proteica.

Depois destes achados, muitos estudos tem demonstrado a existência deste processo em tarefas que não são motivadas por medo, como condicionamento clássico,¹⁰ habituação,¹¹ reconhecimento de objetos,¹² memória espacial.¹³ Trabalhos também tem evidenciado a existência do fenômeno da reconsolidação em diferentes espécies animais.¹¹⁻¹⁵⁻¹⁷⁻²⁴

Além disso, evidências sobre a existência do processo de reconsolidação não vem apenas da análise em nível comportamental. Recentemente um fenômeno celular, similar a reconsolidação foi demonstrado ocorrer na LTP (potenciação de longa duração; do inglês: *long term potentiation*) a qual é considerada o mecanismo fisiológico do aprendizado e da memória.¹⁴

Dessa forma, a busca por entender os mecanismos envolvidos no processo reconsolidatório tem se intensificado a cada dia. Com o objetivo de aprofundar o

conhecimento sobre este tema, estudos têm utilizado recursos já testados para delinear os mecanismos da consolidação com o intuito de desvendar os mecanismos da reconsolidação. Isso tem evidenciado que os mecanismos moleculares da reconsolidação e consolidação são similares, porém não são idênticos.

Apesar de trabalhos sugerirem o contrário,⁷⁻¹⁵ inúmeras evidências indicam que a reconsolidação não é uma mera recapitulação da consolidação, mas um processo distinto onde inúmeras cascatas de sinalização são ativadas em regiões cerebrais envolvidas nos processos que seguem a aquisição, mas não a evocação de memórias.⁹⁻¹⁶ Propondo assim, que a reconsolidação poderia operar permitindo modificações das memórias consolidadas.

Muitas evidências têm se acumulado nos últimos anos sobre o envolvimento de receptores de membranas, cascatas de sinalização, fatores de transcrição, mecanismos dependentes de síntese de proteínas e circuitos neuronais¹⁷⁻¹⁹ no processo de reconsolidação de memórias. Os principais estudos são os que diferenciam os mecanismos moleculares e os circuitos da reconsolidação, daqueles da consolidação, e que promovem mais conclusões que, a reconsolidação não é uma repetição da consolidação.⁹⁻¹⁷⁻¹⁹

Tais estudos têm atuado, principalmente, através do uso de diferentes agentes amnésicos administrados de maneira sistêmica ou em regiões cerebrais, e tem permitido observar que a reconsolidação pode ser afetada não só pela inibição da síntese de proteínas, mas também por agentes que agem em distintos mecanismos moleculares.

Dentre os mecanismos moleculares que se demonstrou estarem envolvidos no processo reconsolidatório, estão os fatores de transcrição, como se observa com

a interferência em CREB (proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc) no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, que é capaz de prejudicar a reconsolidação de memórias de medo ao som e de medo contextual.¹⁵ CREB e o fator de transcrição ELK-1 são também ativados no núcleo accumbens core após a evocação de uma memória de localização.²⁰

Já o fator de transcrição CCAAT-potencializador de ligação para proteína- β (C/EBP β), é requerido para consolidação no hipocampo, mas não para reconsolidação da memória de esquivas inibitórias.¹⁶

As cinases fosforilam fatores de transcrição, e também foram demonstradas participar da reconsolidação de memórias. A cinase ERK (cinase reguladora do sinal extracelular) mostrou ser requerida para que ocorra a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos.¹²

Os eventos moleculares envolvidos na reconsolidação de memórias também têm sido examinados através do uso de imagens da atividade celular após a evocação. A atividade pós evocação pode ser acessada usando técnicas de imunohistoquímica para marcar proteínas como os genes iniciais imediatos (IEGs), que são expressos em células ativas.

Os IEGs têm fornecido importantes informações sobre as regiões cerebrais ativadas após a evocação de memórias previamente consolidadas. Na região CA1 do hipocampo os IEGs, c-fos e JunB, mas não c-jun ou JunD são ativados após a evocação da memória de medo contextual,²¹ enquanto as memórias de aprendizado associativo tem a ativação de SGK3 após serem evocadas.¹⁹

Além desses, agentes como inibidores da síntese de RNAm,²² inibidores da MAPK,¹² bloqueadores β -adrenérgicos e antagonistas de receptores NMDA⁶⁻²² também se mostraram capazes de inibir o processo de reconsolidação de memórias.

Assim, a reconsolidação pode ser considerada um estado temporariamente alterado da memória, que ocorre após sua reativação, e é caracterizado pela sensibilidade aumentada a agentes capazes de interferir em inúmeros mecanismos.

Aplicação terapêutica da reconsolidação

O potencial de se poder extrapolar o entendimento da reconsolidação para propósitos terapêuticos, é um grande incentivo para se buscar saber mais a respeito deste tema. A tentativa de disponibilizar este fenômeno para o uso clínico avança em paralelo com a tentativa de entender o que o fenômeno realmente significa. Ao se buscar entender os mecanismos que envolvem a reconsolidação de memórias, permite-se ampliar as oportunidades para o entendimento não só dos mecanismos normais do processamento mnemônico, mas também auxilia a promover a compreensão de memórias patológicas e doenças psiquiátricas.

A demonstração em humanos de um processo reconsolidatório após a evocação, já foi possível através da observação que a memorização de uma sequência motora recentemente consolidada, é prejudicada pelo aprendizado de uma nova sequência imediatamente após a evocação da memória original,²⁴ e que a evocação de uma lista de palavras previamente aprendida, também pode levar a reconsolidação da memória.²⁵

Nas desordens psiquiátricas, memórias patológicas podem tornar-se lábeis pela reativação e serem susceptíveis a interferências que podem levar ao tratamento. A possibilidade de a memória ser alterada durante a evocação, permite que a interferência na reconsolidação possa ser eficaz no tratamento de doenças como dependência de drogas, fobias e estresse pós-traumático.²⁰⁻²⁶⁻²⁷⁻²⁸

Considerando que é muito difícil conseguir administrar um agente amnésico logo após um trauma ou evento traumático, a possibilidade de posteriormente modificar a memória traumática através do bloqueio farmacológico da reconsolidação torna-se clinicamente relevante.²⁹⁻³⁰

Assim, a reconsolidação pode ser o mais promissor estudo para a preservação de memórias de longa duração. Compreender os possíveis papéis desempenhados pela reconsolidação de memórias e determinar as conexões entre os mecanismos moleculares e os processos psicológicos deve ser um dos temas de estudo da área de neurociências juntamente com a área psiquiátrica.

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

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- Spear NE, Riccio DC. *Memory: Phenomena and principles*. Boston: Allyn and Bacon, 1994.
- 3- McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science*. 1966;153:1351-8.
- 4- Squire LR, Alvarez P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5:169-77.
- 5- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*. 1968;160:554-5.
- 6- Przybylski J, Sara SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav brain res*. 1997;84:241-6.
- 7- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 2000; 406:722-6.

- 8- Sara SJ. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* 2000;7:73-84.
- 9- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science.* 2004;304: 839–43.
- 10- Inda MC, Delgado-Garcia JM, Carrion AM. Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *J Neurosci.* 2005;25:2070–80.
- 11- Rose JK, Rankin CH. Blocking memory reconsolidation reverses memory-associated changes in glutamate receptor expression. *J. Neurosci.* 2006;26:11582-7.
- 12- Kelly A, Laroche S, Davis S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J. Neurosci.* 2003; 23:5354–60.
- 13- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron.* 2006;50(3):479-89.
- 14- Fonseca R, Nagerl UV, Bonhoeffer T. Neuronal activity determines the protein synthesis dependence of long-term potentiation. *Nature Neurosci.* 2006;9: 478–80.

- 15- Kida S, Josselyn SA, De Ortiz SP, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci*. 2002;5:348-55.
- 16- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP. *Nat Neurosci*. 2001;4:813-8.
- 17- Salinska A, Bourne RC, Rose SPR. Reminder effects: the molecular cascades following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance test. *Eur J Neurosci*. 2004;19:3042-7.
- 18- Tronson NC, Wiseman SL, Olausson P, Taylor JR. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci*. 2006;9:167-9.
- 19- von Herten LSJ, Giese KP. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci*. 2005;25:1935-42.
- 20- Miller CA, e Marshall JF. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron*. 2005;47:873-84.
- 21- Strekalova, T. Zörner B, Zacher C, Sadovska G, Herdegen T, Gass P. Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes Brain Behav*. 2003;2:3-10.

- 22- Da Silva WN, Bonini JS, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus*. 2008;18:29-39.
- 23- Debiec J e JE LeDoux. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience*. 2004;129:267-72.
- 24- Walker MP, Brakefield T, Hobson JA, Stickgold R. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. *Nature*. 2003; 425:616-20.
- 25- Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn. Mem.* 2007;14:47-53.
- 26- Lee JL, Di Ciano P, Thomas KL, Everitt BJ. Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. *Neuron*. 2005;47:795–801.
- 27- Hellems KG, Everitt BJ, Lee JL. Disrupting reconsolidation of conditioned withdrawal memories in the basolateral amygdala reduces suppression of heroin seeking in rats. *J. Neurosci.* 2006;26:12694-9.
- 28- Debiec J e LeDoux JE. Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006;1071:521-4.

- 29- McCleery JM e Harvey AG. Integration of psychological and biological approaches to trauma memory: implications for pharmacological prevention of PTSD. *J. Trauma. Stress.* 2004;17:485-96.
- 30- Centonze D, Siracusana A, Calabresi P, Bernardi G. Removing pathogenic memories: a neurobiology of psychotherapy. *Mol. Neurobiol.* 2005;32:123-32.

For Peer Review