

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

NATÁLIA GINDRI FIORENZA

**PARTICIPAÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA E SISTEMA NORADRENÉRGICO NA
RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Porto Alegre

2010

NATÁLIA GINDRI FIORENZA

**PARTICIPAÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA E SISTEMA NORADRENÉRGICO NA
RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre
2010

NATÁLIA GINRI FIORENZA

**PARTICIPAÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA E SISTEMA NORADRENÉRGICO NA
RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

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

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Mirna Wetters Portuguez

Dra. Janine Inez Rossato

Dra. Juliana Sartori Bonini

Dr. Fernando Benetti

AGRADECIMENTOS

À minha família e, em particular meus pais, **Eni e Irineu**, por me guiarem nesta jornada, sempre com muito amor, liberdade, dedicação e bons conselhos. Aos meus irmãos **Alexei e Rodrigo**, amigos e companheiros de todas as horas, que sempre participaram incondicionalmente de todos os momentos da minha vida. A **Fernanda**, minha irmã emprestada e uma grande amiga

Ao **Martin Cammarota**, meu orientador, por acolher-me em seu valioso grupo de pesquisa, depositando confiança em meu trabalho e constante preocupação com seus alunos.

Ao professor **Ivan Izquierdo**, pelos ensinamentos de ciências e de vida, por sua atenção com todos e seu profissionalismo.

A querida amiga **Janine** por sem empenho na realização deste trabalho e pelo exemplo de pessoa e de pesquisadora.

A grande amiga **Jociane**, responsável por meus primeiros passos na ciência, e que me ensinou a ter força e a acreditar em mim.

Aos amigos, colegas, companheiros, ouvintes, enfim, às pessoas que formam o melhor grupo de pesquisa do mundo: **Julia, Siomara, Clarice, Cristiane, Ramón, Fernando, Pâmela, Weber, Juliana, Cristiano, Gabriela, Andressa, Lucas, Dagiéli e Carolina**. Sem a amizade e a participação ativa de vocês, este trabalho não teria sido concretizado. Valeu Centro de Memória!

A meus tios e primos, que sempre se fizeram presentes em minha vida e aos meus amigos das horas boas e ruins, dos momentos difíceis, das alegrias e que são também responsáveis por esta conquista.

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

Ao CNPq, pelo financiamento da minha bolsa nestes últimos dois anos.

RESUMO

Desde os primeiros estudos sobre a formação da memória pensou-se que a memória consolidada permanecia inalterada ou imutável por todo o tempo pelo qual permanecesse armazenada. Porém, diversos estudos têm desafiado esta teoria, sugerindo que uma vez evocadas, as memórias precisam passar por um novo processo de estabilização, chamado de reconsolidação, que pode ser uma simples repetição da consolidação inicial ou um processo independente, que utiliza vias moleculares distintas. Sendo assim, nosso objetivo neste trabalho foi verificar a existência real do processo reconsolidatório e a participação do sistema noradrenérgico no mesmo. Aqui nós demonstramos que a infusão intra-núcleo basolateral da amígdala de inibidores da síntese protéica, anisomicina ou emetina, imediatamente, mas não 6 horas após a reativação bloqueia permanentemente a memória da tarefa de esquiva inibitória. Além disso, verificamos que a infusão de noradrenalina no núcleo basolateral imediatamente, mas não 6 horas após a sessão de reativação, facilita a retenção da memória. Este efeito facilitatório da NA provavelmente deve-se à ativação de receptores β -adrenérgicos, já que a administração intra-núcleo basolateral da amígdala de timolol, um antagonista deste subtipo de receptor, imediatamente, mas não 6 horas após a reativação, causa prejuízo sobre esta memória. Os resultados sugerem que a reativação da memória desencadeia um processo de reconsolidação, dependente da síntese de novas proteínas e da ativação de vias neuromodulatórias, como a via noradrenérgica, no núcleo basolateral da amígdala.

Palavras-chave: Memória, reconsolidação, amígdala, sistema noradrenérgico, esquiva inibitória.

ABSTRACT

Since the first experiments about the mechanisms that underlies memory formation researchers has been thought that memory once consolidated passes through a phase that makes the memory trace stable and resistant to amnesic agents. Although, several studies has been challenge this theory suggesting that after the consolidation process there is another stabilization step called reconsolidation, which could be just a perfect copy of the initial consolidation process or an independent process that uses distinct molecular pathways. In doing so, our goal in this study was to verify the real existence of the reconsolidation process and how is the noradrenergic system involved on this process. Here we demonstrate that infusions of well-known protein synthesis inhibitors, Anysomicin (ANI) or Emetine (EME) intra-basolateral nucleus of the amygdala immediately but not 6 hours after the reactivation phase causes permanent amnesia on the inhibitory avoidance task. Furthermore we verify that infusion of Noraepinephrine (NE) intra-basolateral nucleus of the amygdala immediately but not 6 hours after the reactivation phase facilitates the memory retention. However the facilitatory effect that we found of NE probably is due to the activation of β -adrenergic receptors since the administration of Timolol, a well-known antagonist of this type of receptor, intra-basolateral nucleus of the amygdala, immediately but not 6 hours after the reactivation impairs the mnemonic trace. Our results suggest that the memory reactivation unleash a reconsolidation process, which depends on protein synthesis and activation of neuromodulatory pathways just like the noradrenergic path on the basolateral nucleus of the amygdala.

Key words: Memory, Reconsolidation, Amygdala, Noradrenergic System, Inhibitory Avoidance Task.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Taxonomia dos sistemas de memória e estruturas cerebrais envolvidas. ...	11
Figura 2. Local de implantação das cânulas de infusão no núcleo basolateral da amígdala. (Paxinos e Watson, 1986).	18
Figura 3. Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão no núcleo basolateral da amígdala. No detalhe, vista geral do equipamento estereotáxico.	18
Figura 4. Fotografia do aparato para o procedimento de esquiva inibitória.	19
Figura 5. Esquema de execução do experimento utilizando a tarefa de esquiva inibitória.	20
Figura 6. Fotografia de um rato explorando o Campo Aberto. Observe-se o comportamento de elevação sobre as patas traseiras (“rearing”).	21
Figura 7. Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.	22
Figura 8. Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia estereotaxicamente implantadas.	23
Figura 9. A infusão do inibidor da síntese de proteínas, Anisomicina, imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.	25
Figura 10. A infusão de Emetina imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.	26
Figura 11. A infusão de ANI ou de EME 6 h após a sessão de reativação não tem efeito sobre a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.	28
Figura 12. A administração de NA no núcleo basolateral da amígdala, imediatamente após a reativação facilita a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.	29
Figura 13. A infusão de Timolol imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.	30
Figura 14. A infusão de NA ou de TIM 6 h após a sessão de reativação não tem efeito sobre a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória.	32

Figura 15. A administração de ANI, EME, NA ou TIM 24 horas após o treino, na ausência da reativação não tem efeito sobre a memória na tarefa de Esquiva Inibitória.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANI - anisomicina

cm - centímetros

EC – estímulo condicionado

e col. – e colaboradores

EI - esquiiva inibitória

EME - emetina

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

Fig – figura

g – gramas

hr – horas

i.p. – intra-peritoneal

Kg - quilogramas

mA – Mili-ampéres

mg - miligramas

min - minutos

mm - Milímetros

NA - noradrenalina

RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro. Do inglês: *messenger ribonucleic acid*.

seg - segundos

Tim – timolol

Tr – treino

T1 – teste 1

T2 – teste 2

Veh – veículo

µg - microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS	10
1.2. NORADRENALINA E A MODULAÇÃO DA MEMÓRIA.....	12
1.3. O PROCESSO DE RECONSOLIDAÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. METODOLOGIA	17
3.1. DESENHO DO ESTUDO	17
3.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	17
3.3. PROCESSO CIRÚRGICO	17
3.4. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	19
3.4.1. <i>Esquiva Inibitória</i>	19
3.4.2. <i>Campo Aberto</i>	20
3.4.3. <i>Labirinto em Cruz Elevado</i>	21
3.5. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	22
3.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	23
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição e Classificação das Memórias

A memória é um processo essencial para a experiência humana e pode ser caracterizada como a capacidade que um indivíduo tem de armazenar dados ou conhecimentos para, assim, modificar o próprio comportamento. Através da interação com o meio ambiente, adquirimos informações a cerca do mundo e aprendemos a associar estímulos externos e respostas internas. A memória é, então, um registro das nossas percepções e um produto dos nossos sentidos (Baddeley, 1999).

A memória pode ser dividida em diferentes estágios. Num primeiro momento ocorre a aquisição da informação através da exposição ao estímulo. Esta informação é processada pelos sistemas sensoriais e retida temporariamente. Se for útil para o nosso desenvolvimento e sobrevivência, ela será armazenada em um sistema de memória mais estável, de longo prazo, por meio de um processo chamado consolidação. Uma vez armazenada a informação pode ser recuperada ou evocada sempre que necessário. Neste estágio, o traço mnemônico poderá ser fortalecido ou enfraquecido, dependendo da relevância da informação.

A aquisição de novas experiências e conhecimentos ao longo da vida nos faz seres únicos e determina nossa maneira de pensar e agir. Porém, a memória não é uma identidade única; é, ao contrário, composta de diferentes sistemas. Já no século XIX o filósofo Maine de Biran descreveu três subdivisões dentro dela: a memória representativa, que seria a recordação de idéias e eventos, a memória mecânica, relacionada com as habilidades motoras e a memória sensitiva, relacionada à aquisição de valores afetivos. Hoje, a distinção mais usual entre os sistemas de memória, quanto ao seu conteúdo, é a seguinte:

- Memória declarativa (ou explícita): adquirida de forma consciente; diz respeito a fatos, eventos e acontecimentos que podem ser relatados. É subdividida em memórias episódicas (também chamadas autobiográficas) e semânticas (referentes às informações de conhecimentos gerais);

- Memória não-declarativa (ou implícita): refere-se às habilidades motoras e sensoriais, que não podem ser verbalizadas de forma consciente. A memória não-declarativa envolve tipicamente um conhecimento que é de natureza reflexa, mas

que não envolve reflexão, ou seja, são memórias inconscientes (Squire e Kandel, 2003). Esta memória é subdividida em: 1) habilidades e hábitos; 2) pré-ativação (do inglês *Priming*; utiliza representações sem significado aparente, mas que são úteis como dicas facilitatórias da evocação); 3) aprendizado não-associativo (incluindo sensibilização e habituação, relacionada à atividade das vias reflexas) e; 4) condicionamento clássico simples (condiciona dois ou mais estímulos ou um estímulo a uma resposta).

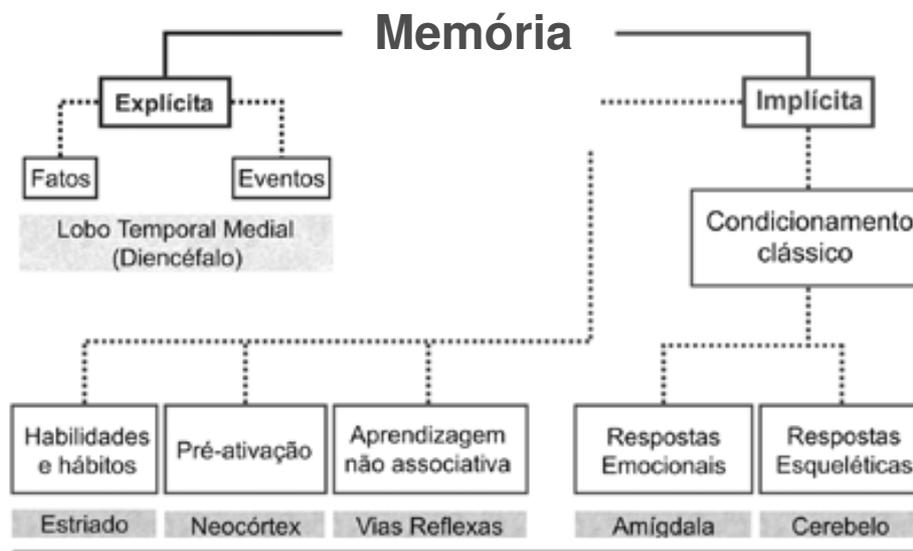


Figura 1. Taxonomia dos sistemas de memória e estruturas cerebrais envolvidas.

As memórias declarativas e não-declarativas recrutam sistemas encefálicos diferentes (Figura 1) e utilizam distintas estratégias para seu armazenamento. Memórias implícitas de condicionamento relacionadas a respostas emocionais têm como ponto central de processamento a amígdala, estrutura localizada profundamente no lobo temporal e composta de mais de 10 sub-regiões ou núcleos funcional e anatomicamente heterogêneos. Dentre estes estão o núcleo central e os núcleos lateral e basal (juntos conhecidos como complexo basolateral da amígdala), os quais apresentam conexões entre si e com diversas regiões cerebrais. Desde os estudos pioneiros de Kluver e Bucy, que demonstraram que lesões no lobo temporal medial, de macacos resultavam em comportamentos afetivamente descaracterizados (Kluver e Bucy, 1937), muitos laboratórios têm demonstrado que

a amígdala é crucial para a aquisição, armazenamento e expressão de memórias aversivas (Davis, 1992; LeDoux, 1996; Maren, 2001). Além disso, vários estudos realizados em humanos (Cahill e col., 1995; Hamann e col., 1999; Cahill e col., 2001) e em modelos animais (Tomaz e col., 2003) relacionam a amígdala com os processos de modulação da memória, especificamente com a facilitação da memória produzida por um estado de ativação emocional. Isso porque a amígdala, e principalmente o núcleo basolateral, integra as informações sensoriais com as nociceptivas, além de coordenar sistemas neuro-humorais que facilitam ou inibem o aprendizado, através de suas conexões com outras áreas cerebrais.

1.2. Noradrenalina e a modulação da memória

É consenso que acontecimentos com forte carga afetiva são mais bem lembrados do que os emocionalmente neutros. Isso porque um evento emocional vivenciado desencadeia uma série de alterações fisiológicas, tais como a secreção periférica de hormônios e a ativação de sistemas neuromodulatórios (Ferry e col., 1999). A hipótese de que o sistema noradrenérgico desempenha um papel no aprendizado e memória emergiu algumas décadas atrás com estudos de Kety (1972), que sugeriam que processos cerebrais associados a estados afetivos, como por exemplo, a liberação de aminas biogênicas (adrenalina, histamina, noradrenalina,...), podem modular mecanismos sinápticos recentemente ativados. Ou seja, sinapses ativadas pelo aprendizado de eventos emocionalmente fortes, seriam fortalecidas pela liberação de determinadas substâncias. Em concordância, estudos mais recentes utilizando técnicas de microdiálise observaram um aumento nos níveis de diversos neuromoduladores durante o aprendizado emocional, tais como serotonina (Kawahara e col., 1993), dopamina (Hori e col., 1993) e noradrenalina (Tanaka e col., 1991).

O sistema noradrenérgico é um dos principais sistemas neuro-humorais envolvidos na modulação de funções cognitivo-comportamentais. Sua ativação facilita os processos de atenção, cognição e adaptação a mudanças ambientais (Sara e Segal, 1991; Sara, 2005). Neurônios noradrenérgicos localizados no *Locus Coeruleus* enviam fibras eferentes para diferentes áreas, dentre elas o hipocampo e os núcleos central e basolateral da amígdala, onde acentuam a transmissão glutamatérgica, essencial para a formação da memória (Roosendaal e col., 2008).

Pesquisas desenvolvidas por Gold e van Buskirk (1978) mostraram que o treino na esquila inibitória diminui os níveis de noradrenalina (NA) sobre condições que resultam em boa retenção, sugerindo um aumento na liberação deste neuromodulador durante o treino. Além disso, Haycock *e col.*, (1977) demonstraram que a infusão intracerebroventricular de NA imediatamente após o treino, facilita a retenção promovendo, assim, evidências de que a NA central modula funções da memória. Outros estudos vão adiante, sugerindo que o efeito da NA sobre a memória se deve à ativação de receptores β -adrenérgicos na amígdala (Gallagher *e col.*, 1977; Hatfield *e col.*, 1999).

O papel da NA na consolidação da memória emocional já está bem estabelecido através de diversos estudos utilizando agonistas e antagonistas dos receptores noradrenérgicos. Porém, pouco se sabe sobre o papel deste neuromodulador na reconsolidação da memória.

1.3. O Processo de Reconsolidação

Já dizia Frederic Barlett no início do século XX que “a evocação não é simplesmente uma reprodução automática da informação armazenada. Ao contrário, é essencialmente um processo criativo de reconstrução”.

Nesta linha de pensamento, muitos autores defendem que as memórias não são adquiridas na sua forma definitiva, sendo alteradas pela evocação (Izquierdo, 1989; Izquierdo e McGaugh, 2000). Nesse processo, também chamado de reativação, recordação, lembrança ou recuperação (Izquierdo, 2002), memórias já consolidadas retornam ao estado vulnerável, durante o qual estão novamente susceptíveis a interrupções e, para persistirem, precisam passar por um novo processo de estabilização (Sara, 2000; Nader *e col.*, 2000a; Gainutdinova *e col.*, 2005).

Está bem descrito que os eventos bioquímicos envolvidos na consolidação de uma memória incluem a ativação de receptores glutamatérgicos e de proteínas quinases que, em última instância, ativam fatores de transcrição no núcleo, desencadeando a síntese de novos genes e posterior síntese protéica (Squire e Kandel, 2003). A possibilidade de que essa cascata bioquímica ocorra novamente, durante a reativação de uma memória já consolidada foi primeiramente levantada por Misanin *e col.* (1968). Nesse estudo, verificou-se que a administração de um

choque elétrico de alta intensidade durante a reativação era capaz de piorar a memória apenas quando o estímulo condicionado (EC) estivesse presente. Este fenômeno ficou então chamado “amnésia dependente de dica” (Misanin *e col.*, 1968). Estudos posteriores reafirmaram a existência deste processo (Gordon, 1977; Lewis, 1979) e hoje ele recebe o nome de reconsolidação (Sara, 2000; Nader, 2003).

Muito tem se especulado acerca da existência real de processos pós-evocacionais que desestabilizem e reestabilizem uma memória previamente consolidada. Morris *e col.* (2006), por exemplo, afirmam que a reconsolidação de uma memória só ocorre quando uma nova informação é somada àquela já armazenada, enquanto que outros pesquisadores defendem a idéia de que o processo de reativação já é suficiente para induzir a reconsolidação do traço mnemônico (Duvarci *e Nader*, 2004; Tronel *e col.*, 2005). Outros estudos, ainda, descartam a hipótese da reconsolidação, sugerindo explicações alternativas para os resultados encontrados (Biedenkapp *e Rudy*, 2004; Power *e col.*, 2006). Porém, desde trabalhos de Nader *e col.* (2000), demonstrando que a infusão intra-amígdala de um inibidor da síntese protéica imediatamente após a evocação de uma resposta de medo condicionado induz amnésia persistente, muitos outros pesquisadores têm comprovado a existência do processo reconsolidatório, utilizando diferentes agentes amnésicos bem como outros paradigmas de aprendizado e espécies animais (Debiec *e col.*, 2002; Lee *e col.*, 2004; Merlo *e col.*, 2005).

A idéia de que após sua evocação a memória seja “reorganizada” parece ter uma função óbvia, já que uma vez armazenada, a memória pode atualizar-se e adaptar-se à nova situação ambiental ou fisiológica. Ou seja, através de critérios ainda não estabelecidos, o cérebro é capaz de descartar informações que não são mais úteis para o indivíduo e incorporar novas informações àsquelas pré-existentes. Sendo assim, o processo de reconsolidação pode ser encarado como uma janela de oportunidades para a manutenção, o fortalecimento e atualização do traço mnemônico evocado (Nader *e col.*, 2000b; Rossato *e col.*, 2006, 2007).

Até o momento não existem estudos acerca das conseqüências da modulação da amígdala no que diz respeito à manutenção e persistência pós-evocação da memória emocional, no entanto, a existência da reativação representa uma possibilidade de intervenção na memória já existente e pouco se sabe sobre os mecanismos que ela desencadeia, principalmente relacionados à modulação

noradrenérgica. Para suprir esta lacuna e com o intuito de cumprir os objetivos a seguir, nós decidimos investigar se a reativação de uma memória para a tarefa de esquiva inibitória inicia um processo de reconsolidação e se o sistema noradrenérgico participa deste processo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar se a reativação de uma memória previamente adquirida para a tarefa de esquiva inibitória desencadeia o processo de reconsolidação analisando se este processo é dependente de síntese protéica e de ativação do sistema noradrenérgico no núcleo basolateral da amígdala.

2.2. Objetivos Específicos

1. Verificar se a administração intra-núcleo basolateral da amígdala dos inibidores de síntese protéica, anisomicina e emetina, imediatamente e 6 horas após a reativação interferem com o processo de reconsolidação da memória, na tarefa de esquiva inibitória, de maneira dependente da intensidade do estímulo.

2. Analisar se o possível efeito da anisomicina e emetina se deve ao bloqueio real da reconsolidação ou a piora na evocação da memória, na tarefa de esquiva inibitória.

3. Estudar o envolvimento dos receptores β -adrenérgicos no processo de reconsolidação, através da administração de timolol ou noradrenalina (antagonista ou agonista, respectivamente destes receptores) na região basolateral da amígdala, imediatamente e 6 horas após a reativação da memória, na tarefa de esquiva inibitória, de maneira dependente da intensidade do estímulo.

3. METODOLOGIA

3.1. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo experimental randomizado cego, que objetiva realizar análises comportamental e farmacológica de processos envolvidos na reativação da memória de medo para a tarefa de esQUIVA inibitória.

3.2. Animais Experimentais

Para todos os experimentos comportamentais nós utilizamos ratos Wistar machos, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h (luz a partir das 7h e escuro a partir das 19h), com água e ração à vontade e uma temperatura ambiente constante de 23°C. As devidas precauções foram tomadas para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos realizados estão de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

3.3. Processo Cirúrgico

Para infusão dos fármacos utilizados neste estudo os animais passaram por uma cirurgia estereotáxica para a implantação bilateral de cânulas na região basolateral da amígdala. A cirurgia consiste de implante com cânulas-guia de 27-gauge de 0.9 mm, posicionadas 1.0 mm acima da região basolateral da amígdala, de acordo com as coordenadas obtidas do Atlas de Paxinos e Watson (1986), sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 2,4 mm; Médio Lateral (MD) = ± 5,1 mm; Dorso Ventral (DV) = - 3,1 mm; Inclinação Latero Lateral (INCL LL) = 0° (Paxinos e Watson, 1986) (Figura 2).

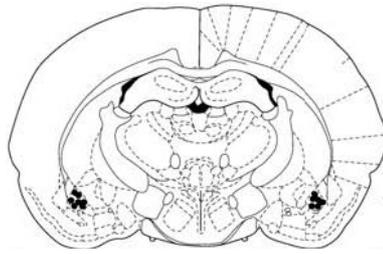


Figura 2. Local de implantação das cânulas de infusão no núcleo basolateral da amígdala. (Paxinos e Watson, 1986).

O procedimento de implantação das cânulas 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 (Figura 2).

Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia, e permaneceram em recuperação durante 4 dias antes de serem submetidos a qualquer procedimento.



Figura 3. Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão no núcleo basolateral da amígdala. No detalhe, vista geral do equipamento estereotáxico.

3.4. Análises Comportamentais

3.4.1. *Esquiva Inibitória*

A esquiva inibitória (EI) é o modelo de condicionamento ao medo mais utilizado em estudos comportamentais que têm por objetivo a investigação dos processos envolvidos nas diferentes fases da memória, já que exige apenas uma sessão de treino. Nesta tarefa o animal aprende a associar sua descida da plataforma onde foi colocado (estímulo condicionado) a um choque elétrico que recebe nas patas quando isso acontece (estímulo incondicionado). Assim, em uma nova exposição à caixa de esquiva, o animal evitará descer da plataforma (resposta condicionada).

O aparato da EI (figura 2) consiste em uma caixa com a parte frontal confeccionada em acrílico transparente, medindo 50 x 25 x 25 cm. O assoalho é uma grade de barras de bronze paralelas de 3 mm de diâmetros, separadas entre si por 1 cm, conectadas a um estimulador elétrico. Na parte esquerda, fixa sobre a grade, há uma plataforma de fórmica com 7 cm de largura e 5 cm de altura.



Figura 4. Fotografia do aparato para o procedimento de esquiva inibitória.

Quatro dias após o procedimento cirúrgico os animais foram transferidos para a sala de treino e manuseados por dois minutos, uma vez ao dia, por dois dias. Vinte e quatro horas após a última sessão de manipulação, os animais foram treinados na tarefa de esquiva inibitória. Cada animal foi colocado cuidadosamente sobre a plataforma permitindo que a explorasse. Ao descer com as quatro patas sobre o assoalho, o animal recebeu um choque elétrico por dois segundos, de diferentes intensidades (0.2 - 0.4 - 0.6 ou 0.8 mA), de acordo com cada grupo experimental.

Vinte e quatro horas após o treino os animais passaram pela sessão de reativação, a qual consistiu em reexpor o animal ao contexto onde recebeu o choque. Os animais foram novamente colocados sobre a plataforma onde permaneceram por quarenta segundos e, então, retirados não sendo permitida a descida da plataforma. Vinte e quatro horas ou sete dias após a reativação, os animais passaram pela sessão de teste, onde o tempo que o animal levou para descer da plataforma com as quatro patas foi avaliado, sendo esse um indicativo de memória. O tempo limite de permanência na plataforma foi de 300 ou de 600 segundos de acordo com o experimento realizado, após o qual o animal retornou à sua caixa moradia.

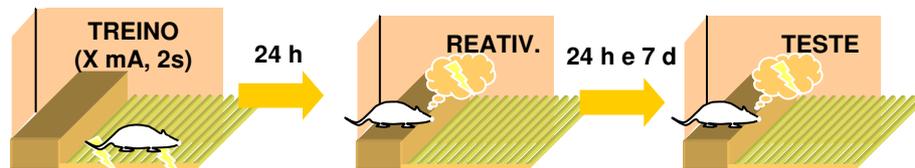


Figura 5. Esquema de execução do experimento utilizando a tarefa de esquiva inibitória.

3.4.2. Campo Aberto

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais utilizou-se um paradigma conhecido como campo aberto. O aparelho empregado para tal fim consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. Durante o experimento, o animal foi gentilmente colocado na arena do campo aberto, a qual lhe pode explorar livremente por 5 min. Neste tempo foram registrados o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras (em inglês *rearings*), comportamentos que nos roedores denotam exploração (Bonini e *col.*, 2006; da Silva e *col.*, 2006) (Figura 6).

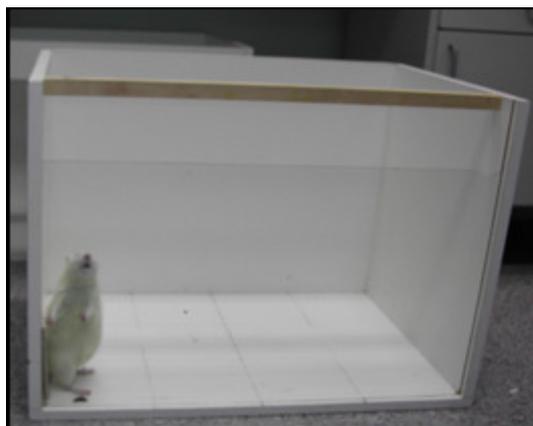


Figura 6. Fotografia de um rato explorando o Campo Aberto. Observe-se o comportamento de elevação sobre as patas traseiras (“rearing”).

3.4.3. Labirinto em Cruz Elevado

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais, utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura; dois braços contra laterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. Os animais foram colocados no centro do labirinto e deixados livres para explorá-lo por 5 minutos. Registrou-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados e o número de entradas nestes braços (Bevilaqua *e col.*, 2003; da Silva *e col.*, 2006) (Figura 7).



Figura 7. Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.

3.5. Tratamentos farmacológicos

Os compostos farmacológicos e os veículos utilizados para a diluição dos mesmos foram infundidos bilateralmente na região de interesse imediatamente ou 6 horas após a reativação da memória ou ainda 24 horas antes do treino nas tarefas de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, com auxílio de uma micro-seringa Hamilton acoplada a uma bomba de infusão (Figura 8). O volume administrado foi de 0,5 μ l/lado e as cânulas de infusão foram mantidas dentro das cânulas-guia por pelo menos 60 segundos após o fim da administração da droga, a fim de evitar o refluxo de líquido.

As doses utilizadas de anisomicina (160 μ g/ μ l), emetina (100 μ g/ μ l), noradrenalina (2 μ g/ μ l) e timolol (2 μ g/ μ l), foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios de nosso laboratório que mostraram o efeito destes fármacos sobre o aprendizado e a memória de ratos. Todos os fármacos foram dissolvidos em solução salina 0,9% e mantidos em ambiente de baixa luminosidade a -20°C até o uso. Os compostos utilizados foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

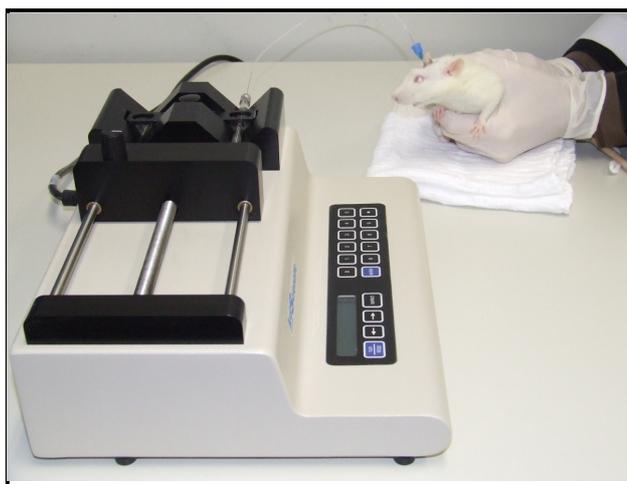


Figura 8. Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia estereotaxicamente implantadas.

3.6. Análise Histológica

Duas a quatro horas após o último teste comportamental, os animais foram infundidos com 0,5 μ l de azul de metileno 4% e sacrificados através de decapitação 30 minutos após, para a difusão da droga ou veículo administrado. Os cérebros foram retirados e colocados em formol 10% em um volume de 1:3, onde permaneceram durante 4 dias. Após este período, foram fatiados e a posição das cânulas-guia avaliada. Apenas dados de animais com as cânulas implantadas corretamente na região basolateral da amígdala foram incluídos nas análises estatísticas.

3.7. Análise Estatística

Os dados obtidos na tarefa de esquiva inibitória, campo aberto e labirinto em cruz elevado foram analisados mediante a utilização do teste *t* de Student. O número de animais por grupo foi calculado com base em estudos prévios do nosso grupo (Cammarota *et al.*, 2004).

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Prism Graph-Pad 5.1. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

A infusão do inibidor da síntese de proteínas, Anisomicina, imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.

Em primeiro lugar, decidimos investigar se a síntese protéica na amígdala é requerida para a manutenção da memória associada à tarefa da Esquiva Inibitória (EI), se este tipo de memória passa por um processo de reconsolidação desencadeado pela reativação e se este fenômeno ocorre independentemente da intensidade do traço mnemônico. Para tal, animais foram treinados na EI com distintas intensidades de choque e foram novamente expostos ao aparato 24 horas após o treino, sendo esta a sessão de reativação da memória (R). Imediatamente após, foram infundidos bilateralmente com anisomicina - ANI (160 µg/0.5 µl/lado), inibidor da síntese protéica ou veículo (Veh) no núcleo basolateral da amígdala. A retenção da memória foi avaliada 24 horas após a reativação (teste 1 - T1). Na figura 8 pode-se observar que os animais que receberam infusão de veículo tiveram tempo maior de permanência na plataforma o que está relacionado com a intensidade de choque utilizada no treino, demonstrando que a retenção da memória aversiva depende da intensidade do estímulo durante o aprendizado. Entretanto, a infusão de ANI imediatamente após a reativação causou prejuízo na memória nos animais que receberam choque de média e alta intensidades (0.6 e 08 mA, respectivamente; Fig. 9).

Em contrapartida aos diversos estudos que sugerem que inibidores da síntese protéica bloqueiam a reconsolidação, muitos pesquisadores defendem que a piora da memória produzida por tratamentos pós-evocacionais é temporária, com a recuperação da memória ocorrendo dentro de horas ou dias (Vianna *et al.*, 2001; Lattal e Abel, 2004). Para verificar, então, se o efeito da ANI se deve a um bloqueio real no processo de reconsolidação, nós decidimos realizar um teste 7 dias após a sessão de reativação (teste 2 - T2). Como pode ser observado na figura 8, o prejuízo na memória causado pela administração de ANI mantém-se durante 7 dias, sugerindo que estes compostos afetam de maneira permanente o processo reconsolidatório.

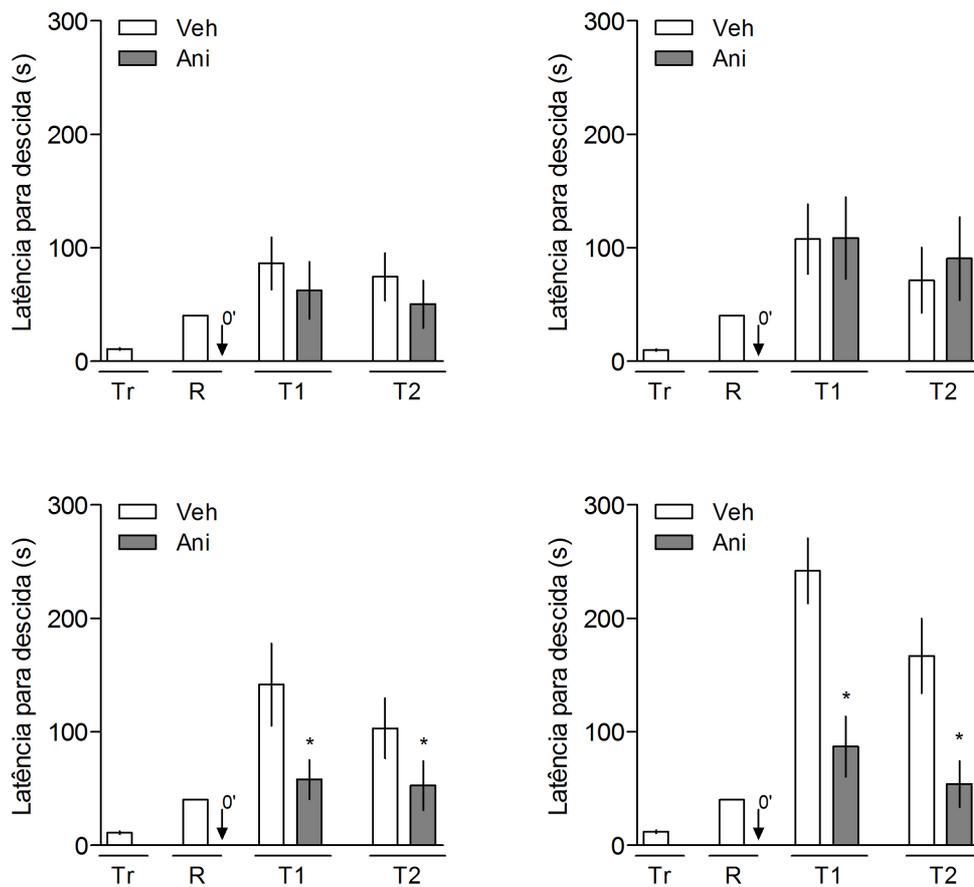


Figura 9. A infusão do inibidor da síntese de proteínas, Anisomicina, imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr) os ratos foram expostos a choque de diferentes intensidades (A 0.2 mA; B 0.4 mA; C 0.6 mA e D 0.8 mA); 24 horas após foram reativados (R) (40 seg) e infundidos com ANI (160 µg/0.5 µl/lado) ou VEH (salina 0,9%) no núcleo basolateral da amígdala. Os animais foram testados 24 horas (T1) ou 7 dias (T2) após a sessão de reativação. A) animais que receberam choque de 0,2 mA no dia do treino; B) animais que receberam choque de 0,4 mA no treino; C) animais que receberam choque de 0,6 mA no treino e; D) animais que receberam choque de 0,8 mA no treino. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como latência de descida da plataforma em segundos. * $p < 0,05$ em teste *t* de Student. (n=11 por grupo).

A infusão de Emetina imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.

Para comprovar e corroborar que o efeito amnésico da anisomicina foi realmente devido ao bloqueio da síntese protéica, necessário para a reconsolidação, e não a outros possíveis mecanismos que podem ser desencadeados por este fármaco (Aberini, 2008), nós utilizamos outro inibidor de síntese protéica, emetina - EME. Animais foram treinados exatamente como descrito acima, com distintas intensidades de choque e, imediatamente após a reativação (R) receberam infusões bilaterais de VEH (0,9 % - 0.5 µl/lado) ou EME (100 µg/0.5 µl/lado). Como se pode observar na figura 9 a EME infundida após os treinos com choques de intensidade

média (0.4 e 0.6 mA) causou prejuízo na reconsolidação da memória, porém não teve efeito nos animais treinados com choque de baixa e alta intensidade (0.2 e 0.8 mA, respectivamente; Fig. 10). Estes resultados reafirmam a existência do processo reconsolidatório e sua dependência da síntese de novas proteínas na região basolateral da amígdala.

Para verificar ainda, se o efeito da EME se deve a um bloqueio real no processo de reconsolidação, nós decidimos realizar um teste 7 dias após a sessão de reativação (teste 2 - T2). Como pode ser observado na figura 8, o prejuízo na memória causado pela administração de EME mantém-se durante 7 dias, sugerindo que estes compostos afetam de maneira permanente o processo reconsolidatório.

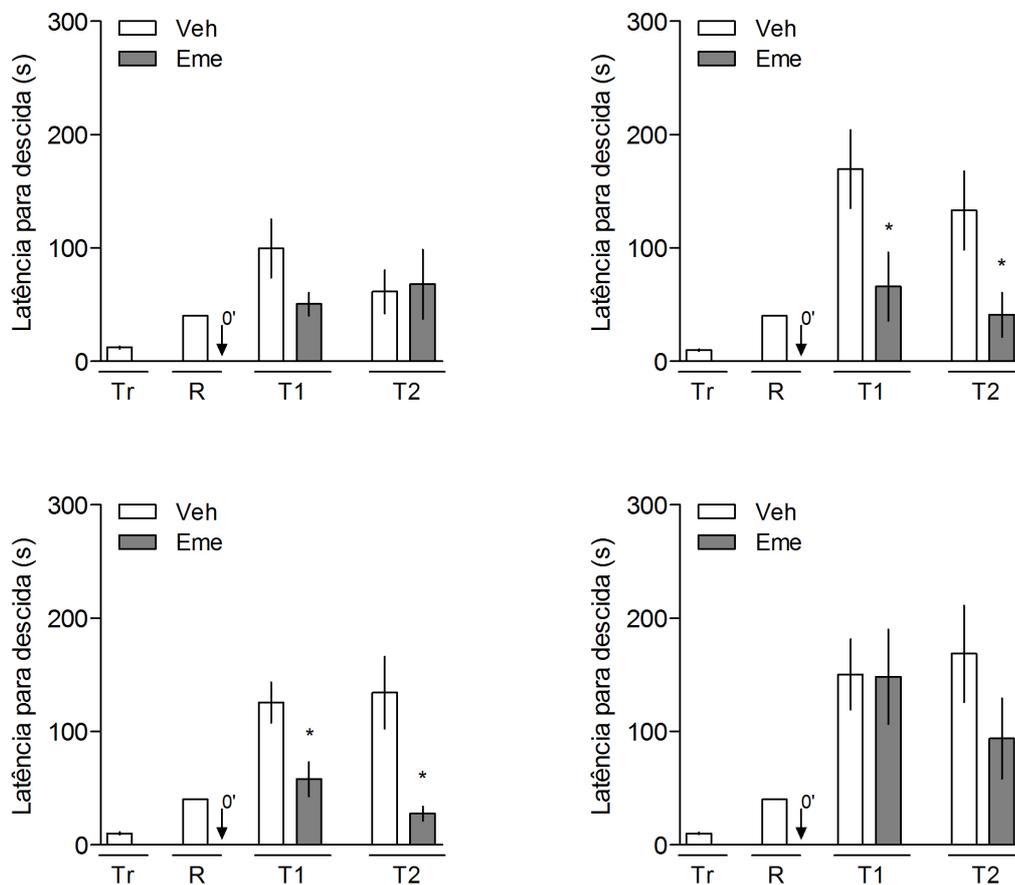


Figura 10. A infusão de Emetina imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr) os ratos foram expostos a choque de diferentes intensidades (A 0.2 mA; B 0.4 mA; C 0.6 mA e D 0.8 mA); 24 horas após foram reativados (R) (40 seg) e infundidos com EME (100 µg/0.5 µl/lado) ou VEH (salina 0,9%) no núcleo basolateral da amígdala. Os animais foram testados 24 horas (T1) ou 7 dias (T2) após a sessão de reativação. A) animais que receberam choque de 0,2 mA no dia do treino; B) animais que receberam choque de 0,4 mA no treino; C) animais que receberam choque de 0,6 mA no treino e; D) animais que receberam choque de 0,8 mA no treino. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como latência de descida da plataforma em segundos. * $p < 0,05$ em teste *t* de Student. (n=11 por grupo).

A infusão de ANI ou de EME 6 h após a sessão de reativação não tem efeito sobre a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.

Inibidores da síntese de proteínas prejudicam a consolidação de novas memórias quando administrados durante uma janela estrita de tempo após o aprendizado (que varia de minutos a poucas horas), não tendo efeito quando administrados com intervalos de tempo maiores após o treino (Camarota *e col.*, 2004). Com o intuito de determinar a extensão da janela temporal de sensibilidade do traço reativado para ANI ou EME, repetimos os experimentos apresentados nas Figuras 9 e 10, mas infundindo ANI ou EME na amígdala basolateral 6 h após uma sessão de reativação. A figura 11 mostra que tanto os animais que receberam infusão de ANI, quanto os que receberam EME 6 horas após a reativação, tiveram o mesmo desempenho dos animais tratados com VEH, independente da intensidade do estímulo administrado. Sendo assim, estes resultados demonstram que o processo reconsolidatório, assim como a consolidação, apresenta uma janela de tempo dentro da qual a síntese protéica é requerida para que a memória persista.

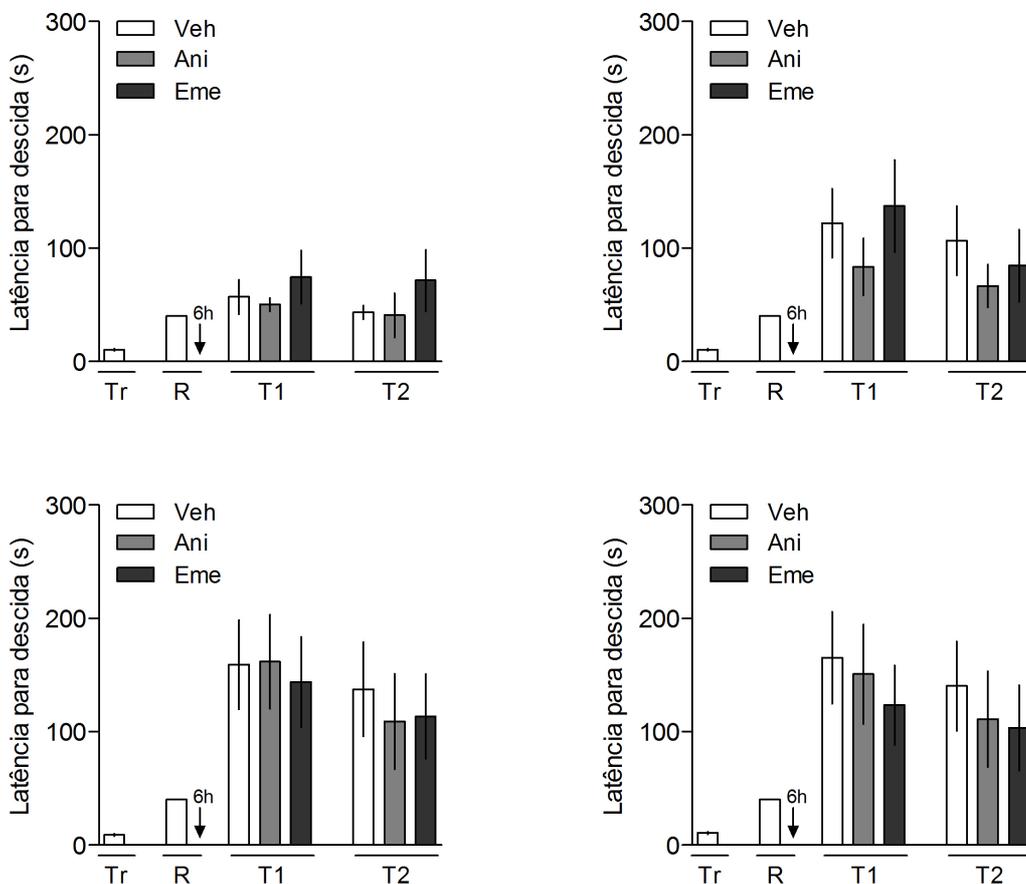


Figura 11. A infusão de ANI ou de EME 6 h após a sessão de reativação não tem efeito sobre a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr) os ratos foram expostos a choque de diferentes intensidades (A – 0.2 mA; B – 0.4 mA; C – 0.6 mA e D – 0.8 mA); 24 horas após o treino passaram por uma sessão de reativação (R) (40 seg) e 6 horas após esta sessão foram submetidos a infusão bilateral de ANI (160 µg/0.5 µl/lado), EME (100 µg/0.5 µl/lado), ou VEH (salina 0,9%). Os animais foram testados 24 horas (T1) ou 7 dias (T2) após a sessão de reativação. A) animais que receberam choque de 0,2 mA no dia do treino; B) animais que receberam choque de 0,4 mA no treino; C) animais que receberam choque de 0,6 mA no treino e; D) animais que receberam choque de 0,8 mA no treino. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como latência de descida da plataforma em segundos. * $p < 0,05$ em teste t de Student. (n=9-10 por grupo).

A administração de NA no núcleo basolateral da amígdala, imediatamente após a reativação facilita a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.

Experiências emocionais induzem distintas alterações fisiológicas, tais como, ativação de vias noradrenérgicas, provenientes do tronco cerebral, as quais enviam fibras eferentes para várias regiões do cérebro, como hipocampo e amígdala (Gordon e van Buskirk, 1978; Roozendaal e *col.*, 2008). Por isso, várias pesquisas têm focado nesta via para a modulação do armazenamento de memórias emocionalmente exacerbadas (Hatfield e McGaugh, 1999; McGaugh e *col.*, 2002). Assim, nós fomos investigar se a noradrenalina (NA) participa do processo de reconsolidação de memórias aversivas, na região basolateral da amígdala. Como podemos observar na figura 12, a infusão de NA (2 µg/0.5 µl/lado) imediatamente após a reativação facilita a reconsolidação da memória de maneira dependente da intensidade do estímulo. Animais que receberam estímulos elétricos de média intensidade (0,4 ou 0,6 mA) apresentaram melhora na memória, quando testados 24 horas e 7 dias após a reativação.

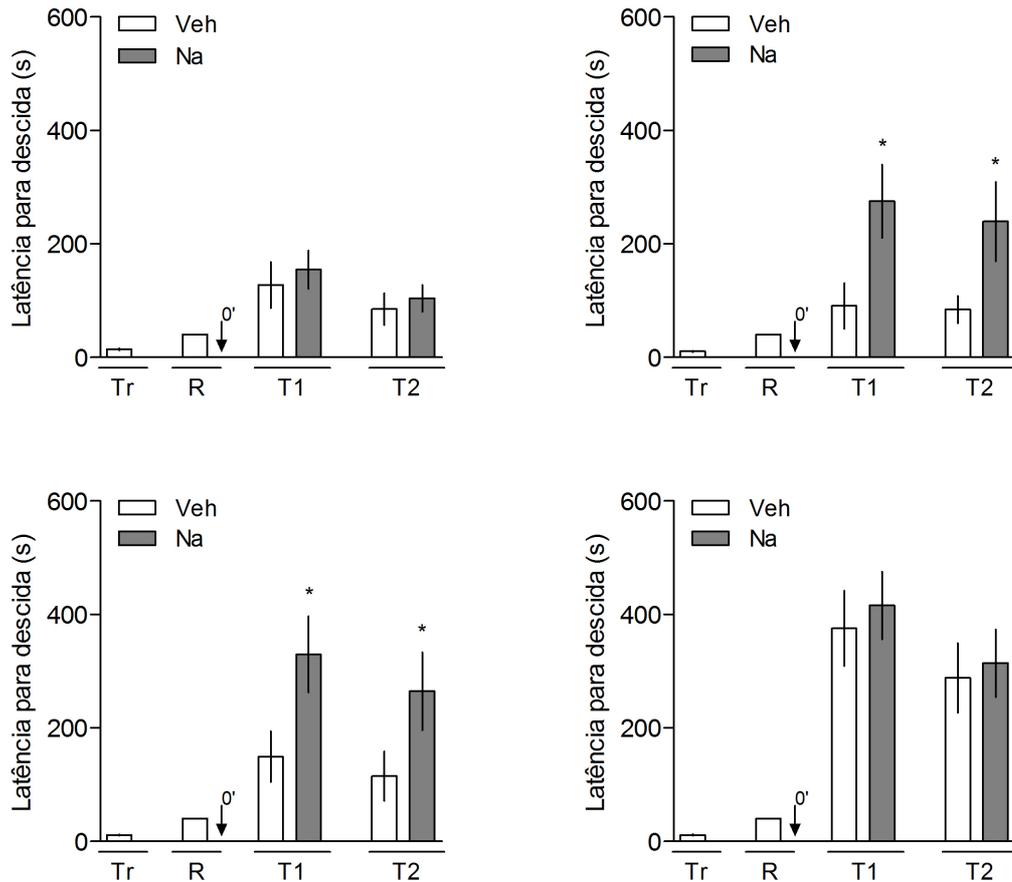


Figura 12. A administração de NA no núcleo basolateral da amígdala, imediatamente após a reativação facilita a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr) os ratos foram expostos a choque de diferentes intensidades (A – 0.2 mA; B – 0.4 mA; C – 0.6 mA e D – 0.8 mA); 24 horas após o treino passaram por uma sessão de reativação (R) (40 seg), após esta sessão foram submetidos a infusão bilateral de NA (2 μ g/0.5 μ l/lado) ou VEH (salina 0,9%); os animais foram testados 24 horas (T1) ou 7 dias (T2) após a sessão de reativação. A) animais que receberam choque de 0,2 mA no dia do treino; B) animais que receberam choque de 0,4 mA no treino; C) animais que receberam choque de 0,6 mA no treino e; D) animais que receberam choque de 0,8 mA no treino. Os dados estão expressos como (média \pm erro padrão) e são representados como latência de descida da plataforma em segundos. * $p < 0,05$ em teste *t* de Student. (n=10-11 por grupo).

A infusão de Timolol imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.

Muitos estudos sugerem que os efeitos da noradrenalina sobre a consolidação da memória se devem à ativação de receptores do tipo β -adrenérgicos na amígdala (Gallagher *e col.*, 1977; Ferry *e col.*, 1999a). Para verificarmos a ação desses receptores na reconsolidação da memória, administramos timolol (2 μ g/0.5 μ l/lado), um bloqueador dos receptores β -adrenérgicos, na região basolateral da amígdala. Como se pode observar na figura 13, a infusão deste composto prejudicou a retenção da memória de EI após sua reativação, tanto no teste 24 horas (T1)

quanto 7 dias (T2) após a sessão de reativação, em treinos de estímulo intermediário, 0.4 mA e forte, 0.8 mA. Este resultado somado ao anterior onde observamos o efeito positivo da NA após a sessão de reativação, indica que os receptores β -adrenérgicos do núcleo basolateral da amígdala participam da reconsolidação da memória de esquiva inibitória.

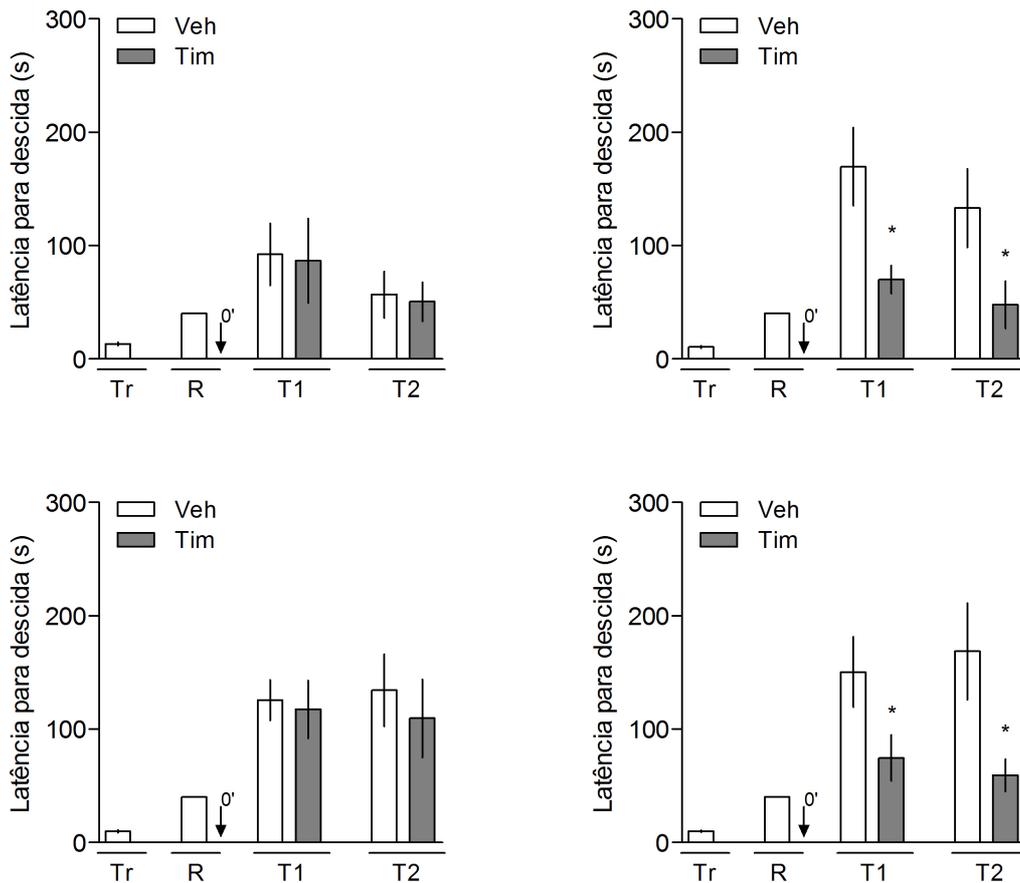


Figura 13. A infusão de Timolol imediatamente após a reativação bloqueia a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr) os ratos foram expostos a choque de diferentes intensidades (A – 0.2 mA; B – 0.4 mA; C – 0.6 mA e D – 0.8 mA); 24 horas após o treino passaram por uma sessão de reativação (R) (40 seg), após esta sessão foram submetidos a infusão bilateral de TIM (2 μ g/0.5 μ l/lado) ou VEH (salina 0,9%); os animais foram testados 24 horas (T1) ou 7 dias (T2) após a sessão de reativação. A) animais que receberam choque de 0,2 mA no dia do treino; B) animais que receberam choque de 0,4 mA no treino; C) animais que receberam choque de 0,6 mA no treino e; D) animais que receberam choque de 0,8 mA no treino. Os dados estão expressos como (média \pm erro padrão) e são representados como latência de descida da plataforma em segundos. * $p < 0,05$ em teste t de Student. (n=10-11 por grupo).

A infusão de NA ou de TIM 6 h após a sessão de reativação não tem efeito sobre a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória.

Alguns autores têm mostrado que certas memórias (Grecksch e Matthies, 1980; Freeman et al., 1995) apresentam duas fases de sensibilidade à ação de inibidores da síntese protéica e outros fármacos devidamente conhecidos por sua ação amnésica, uma imediatamente em seguida do treino e outra entre 3 a 6 horas após. Devido a isto, após verificar que a síntese protéica é necessária logo após mas não 6 horas após a reativação da memória da EI decidimos investigar se o efeito da ativação e inibição dos receptores β -adrenérgicos também obedece este mesmo período temporal. Com o intuito de determinar a extensão da janela temporal de sensibilidade do traço reativado para NA ou TIM, repetimos os experimentos apresentados nas Figuras 12 e 13, mas infundindo NA e TIM na amígdal basolateral 6 h após uma sessão de reativação. A figura 14 mostra que tantos os animais que receberam infusão de NA, quanto os que receberam TIM 6 horas após a reativação, tiveram o mesmo desempenho dos animais tratados com VEH, independente da intensidade do estímulo administrado. Sendo assim, estes resultados demonstram que o processo reconsolidatório, assim como a consolidação, apresenta uma janela de tempo dentro da qual a síntese protéica e a atividade de receptores β -adrenérgicos é requerida para que a memória persista.

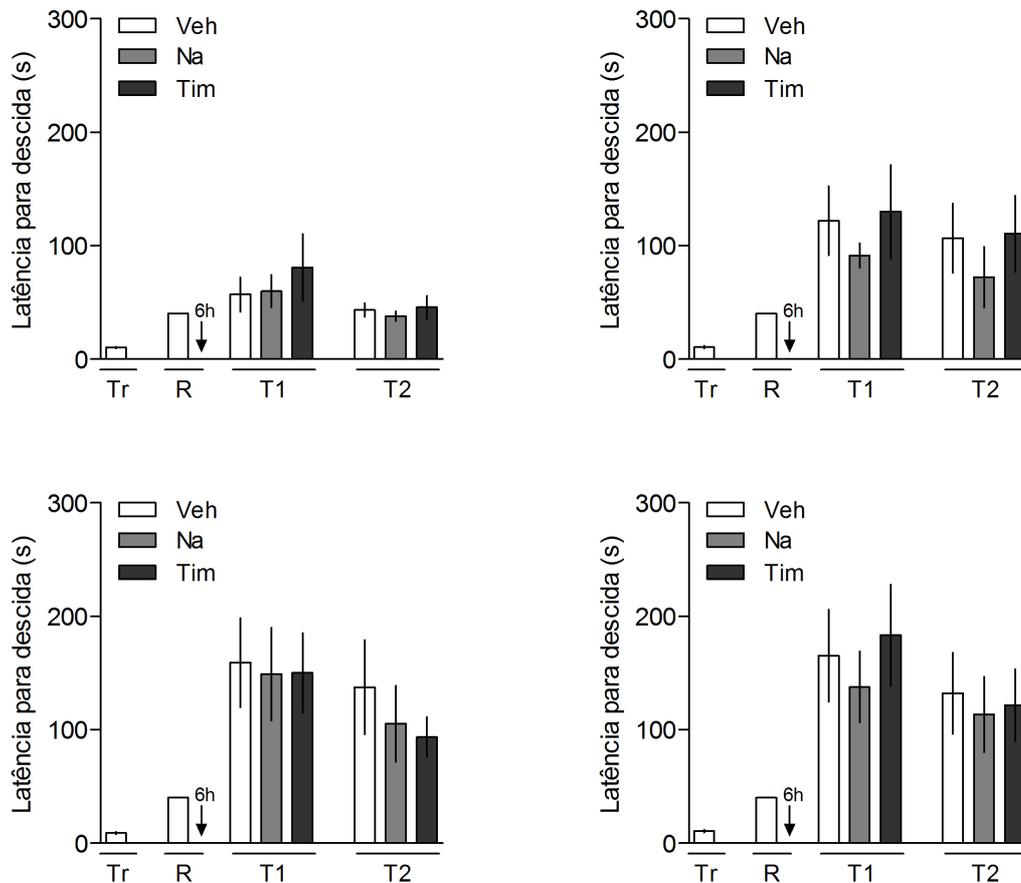


Figura 14. A infusão de NA ou de TIM 6 h após a sessão de reativação não tem efeito sobre a reconsolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr) os ratos foram expostos a choque de diferentes intensidades (A – 0.2 mA; B – 0.4 mA; C – 0.6 mA e D – 0.8 mA); 24 horas após o treino passaram por uma sessão de reativação (R) (40 seg) e 6 horas após esta sessão foram submetidos a infusão bilateral de NA (2 µg/0.5 µl/lado), TIM (2 µg/0.5 µl/lado), ou VEH (salina 0,9%). Os animais foram testados 24 horas (T1) ou 7 dias (T2) após a sessão de reativação. A) animais que receberam choque de 0,2 mA no dia do treino; B) animais que receberam choque de 0,4 mA no treino; C) animais que receberam choque de 0,6 mA no treino e; D) animais que receberam choque de 0,8 mA no treino. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como latência de descida da plataforma em segundos. * $p < 0,05$ em teste t de Student. (n=9-10 por grupo).

A administração de ANI, EME, NA ou TIM 24 horas após o treino, na ausência da reativação não tem efeito sobre a memória na tarefa de Esquiva Inibitória.

Como se pode observar na Figura 15, por si só, a infusão intra-amígdala de ANI, EME, NA ou TIM não produz qualquer alteração na retenção do traço mnemônico independentemente período transcorrido entre esta e o teste, teste 1 ou teste 2. Os fármacos ANI, EME, NA ou TIM quando infundidos na amígdala

basolateral na ausência de um estímulo comportamental relevante, isto é, a reativação, não afetam a persistência da memória em questão, tanto em um teste realizado 24 horas (T1) quanto em um teste realizado 7 dias (T2) após a infusão dos fármacos.

Os resultados deste conjunto de experimentos demonstram que, quando infundidos na amígdala basolateral na ausência de reativação (estímulo comportamental relevante), os fármacos não afetam a retenção da memória avaliada, demonstrando mais uma vez que o efeito observado destes compostos se deve a interferência no processo reconsolidatório e não sobre outro parâmetro não avaliado.

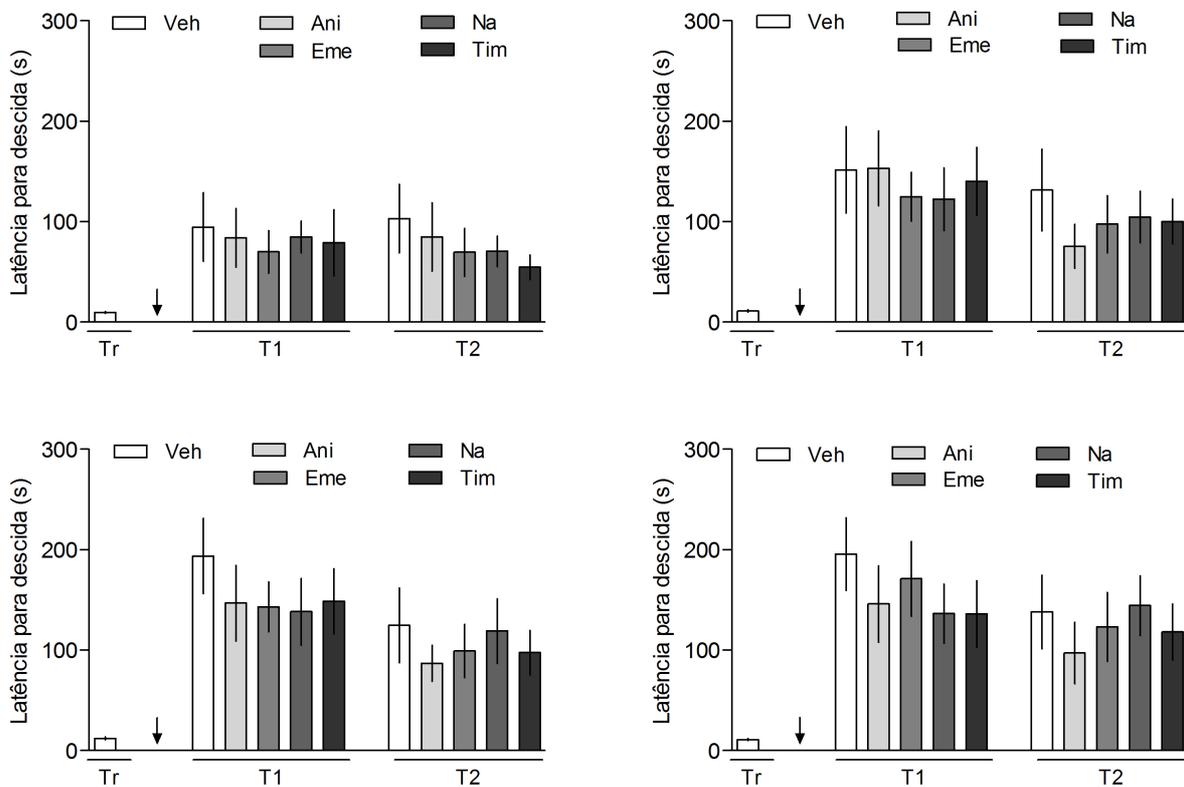


Figura 15. A administração de ANI, EME, NA ou TIM 24 horas após o treino, na ausência da reativação não tem efeito sobre a memória na tarefa de Esquiva Inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região basolateral da amígdala foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr) os ratos foram expostos a choque de diferentes intensidades (A – 0,2 mA; B – 0,4 mA; C – 0,6 mA e D – 0,8 mA); 24 horas após foram submetidos a infusão bilateral de ANI (160 µg/0,5 µl/lado); EME (100 µg/0,5 µl/lado); NA (2 µg/0,5 µl/lado); TIM (2 µg/0,5 µl/lado), ou VEH (salina 0,9%). Os animais foram testados 24 horas (T1) ou 7 dias (T2) após infusão. A) animais que receberam choque de 0,2 mA no dia do treino; B) animais que receberam choque de 0,4 mA no treino; C) animais que receberam choque de 0,6 mA no treino e; D) animais que receberam choque de 0,8 mA no treino. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como latência de descida da plataforma em segundos. * $p < 0,05$ em teste t de Student. (n=9-10 por grupo).

A infusão de ANI, EME, NA ou TIM no núcleo basolateral da amígdala não exercem efeito sobre as atividades locomotora e exploratória ou o estado de ansiedade.

Para averiguar se a infusão intra-amígdala de ANI, EME, NA ou TIM exerceria alguma ação tardia no estado de ansiedade ou na atividade exploratória dos animais que pudesse mascarar a evocação da memória da EI e para analisar se o efeito observado após administração destes fármacos devia-se a ação sobre o processo de reconsolidação da memória, animais foram submetidos a infusão bilateral intra-amígdala dos fármacos acima citados nas doses utilizadas no desenvolvimento deste trabalho e 24 horas após as infusões os mesmos foram expostos ao Labirinto em Cruz Elevado e ao Campo Aberto.

Observando-se a tabela 1 podemos verificar que nenhuma das drogas testadas causou alterações no número total de entradas, no número de entradas nos braços abertos ou na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos durante sessão de 5 min no Labirinto em Cruz Elevado, parâmetros que indicam o estado de ansiedade de um animal. Da mesma forma, estes compostos também não afetaram o número total de cruzamentos e de elevações em uma sessão de exploração livre com duração de 5 min no Campo Aberto, parâmetros que indicam capacidade exploratória destes animais (Tabela 1).

	VEH	ANI	EME	NA	TIM
Entradas Braços Abertos	6,42 ± 0,65	4,83 ± 1,06	5,58 ± 0,74	7,17 ± 1,03	5,54 ± 0,98
% Tempo Braços Abertos	50,92± 4,39	40,64± 6,97	51,30± 4,18	53,28± 3,65	48,08 ± 4,83
Cruzamentos	85,17 ± 7,73	76,17 ± 7,53	73,25 ± 9,46	80,75 ± 5,69	67,50 ± 5,21
Elevações	25,75 ± 3,06	26,08 ± 2,44	21,33 ± 2,91	25,83 ± 2,00	18,33 ± 2,12

Tabela 1. Infusão de ANI, EME, NA ou TIM no núcleo basolateral da amígdala não exercem efeito sobre as atividades locomotora e exploratória ou o estado de ansiedade. Veh (salina 0,9%), Anisomicina (ANI; 160 µg/lado), Emetina (EME; 100 µg/lado), Noradrenalina (NA; 2 µg/lado) ou Timolol (TIM; 2 µg/lado) foram infundidos no núcleo basolateral da amígdala 24 h antes de uma sessão de Campo Aberto ou Labirinto em Cruz Elevado. Dados são expressos como média (± erro padrão) do número de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos (Labirinto em Cruz; n=11 por grupo) e número total de cruzamentos e elevações (Campo Aberto; n=11 por grupo). VEH = veículo. Um grupo distinto de animais foi utilizado para cada paradigma comportamental.

5. DISCUSSÃO

A hipótese da reconsolidação sugere que, quando evocada, a memória retorna a um estado vulnerável, durante o qual está novamente susceptível a interrupções e, para persistir, precisa passar por uma nova estabilização ou consolidação (Sara, 2000; Nader *et al.*, 2000). Este processo permitiria, então, que interferências durante a reativação fortalecessem ou bloqueassem uma memória. Desde 1960 até hoje, muito tem se especulado a cerca da existência da reconsolidação em diferentes modelos de aprendizado com a utilização de agentes amnésicos distintos. (Debiec *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Merlo *et al.*, 2005). Com base nisso, nós buscamos investigar se a reativação da memória de esquila inibitória após treinos com distintas intensidades desencadeia o processo de reconsolidação do traço.

Os resultados aqui apresentados mostram que a inibição da síntese de proteínas no núcleo basolateral da amígdala independentemente do fármaco utilizado, anisomicina – ANI, um inibidor de síntese protéica amplamente utilizado no meio científico, ou emetina - EME, outro inibidor que age por distintos mecanismos, bloqueia a reconsolidação da memória de maneira dependente da intensidade da estimulação. Animais que receberam choques de média e alta intensidade durante o treino, apresentaram déficit na memória quando tratados com ANI ou EME imediatamente após a sessão de reativação. Estes resultados foram observados tanto no teste 24 horas quanto no teste 7 dias após a reativação do traço em questão, demonstrando, assim, que no momento da evocação a memória é labilizada e necessita de síntese de novas proteínas para ser reconsolidada, ou seja para se manter disponível e acessível. Além disso, os resultados obtidos no teste de 7 dias nos mostram que o prejuízo na memória causado pela infusão desses fármacos no núcleo basolateral da amígdala é duradouro, sugerindo que este efeito não se deve a uma possível interferência na evocação, mas sim a um bloqueio permanente sobre a memória reativada. Estes resultados estão em concordância com estudos anteriores que verificam que o prejuízo na memória causado pela anisomicina se mantém 45 dias após a reativação (Debiec *et al.*, 2002).

O fato de que o bloqueio da reconsolidação somente tenha sido observado com a administração de estímulos fortes (choques de 0,4, 0,6 e 0,8 mA) sugere que apenas memórias emocionalmente relevantes ou de alguma forma úteis para o

indivíduo sejam reconsolidadas. Esta hipótese parece interessante, já que o armazenamento de memórias com forte carga emocional é facilitado por uma série de alterações fisiológicas, como a secreção periférica de hormônios que, em última instância, ativam vias neuromodulatórias em regiões cerebrais distintas (Liang *e col.*, 1986). Em concordância, estudos de Ferry *e col.* (1999a) demonstraram que a liberação de neuromoduladores, como a noradrenalina, dentro da amígdala, é maior com choques de alta intensidade, se comparado a choques de baixa intensidade. Este aumento nos níveis de NA, então, ativariam a transmissão glutamatérgica, essencial para a formação de novas proteínas e para o armazenamento da memória (Roozendaal *e col.*, 2008).

Um outro ponto interessante dos nossos resultados refere-se à desigualdade de efeito da ANI e EME nas diferentes intensidades de estímulo utilizadas. A ANI bloqueou a reconsolidação em animais que receberam choques de 0,6 e 0,8 mA, enquanto que a EME teve o mesmo efeito nos choques de 0,4 e 0,6 mA. Embora os dois compostos sejam igualmente eficientes na inibição da síntese de proteínas, eles atuam por mecanismos distintos. A anisomicina é um antibiótico produzido pela *Streptomyces griseolus* que inibe reversivelmente o processo de tradução ao se ligar na subunidade 60S dos ribossomos e impedir a ligação entre os peptídeos. Já a emetina é produzida pela *Streptomyces alboniger* e bloqueia irreversivelmente a tradução por inibir o movimento dos ribossomos sobre o RNA mensageiro. Além disso, estes dois compostos apresentam efeitos secundários distintos, tais como a diminuição nos níveis das catecolaminas, exercida pela ANI (Flexner e Goodman, 1975), que podem contribuir para seus efeitos amnésicos distintos (Rudy *e col.*, 2006).

Ainda, a administração de inibidores da síntese protéica 6 horas após a reativação não teve efeito sobre a memória na tarefa de esquiva inibitória, experimentos realizados por Nader *e col.* (2000b) confirmam estes resultados, indicando que a reconsolidação parece ser sensível ao bloqueio por um a janela de tempo restrita de menos de 6 horas. Alberini (2008) encontrou que a infusão de inibidores da síntese protéica uma hora após o treino bloqueia a síntese de novas proteínas em 70%, enquanto que a administração dos mesmos 6 horas após, bloqueia apenas em 20%. Pegos juntos, os resultados sugerem que assim como a consolidação, o processo reconsolidatório também apresenta uma janela de tempo dentro da qual a síntese protéica é requerida para que a memória persista.

Mais ainda, nem a ANI e EME tem qualquer efeito amnésico sobre a permanência do traço quando infundidas na ausência de um estímulo comportamental relevante, no nosso caso a reativação de uma memória de medo, indicando realmente que o efeito dos fármacos utilizados é sobre a reconsolidação e não sobre outro parâmetro não avaliado que poderia interferir no comportamento analisado.

Muitos pesquisadores esforçam-se na busca de mecanismos que possam ser regulados durante a formação de memórias emocionalmente exacerbadas. Estudos consistentes têm focado no sistema noradrenérgico como um possível candidato para a modulação dessas memórias indesejáveis. Sabe-se que a excitação emocional leva a liberação de NA dentro da amígdala, o que fortalece o armazenamento da informação em diversos paradigmas de aprendizado e memória (Hatfield e McGaugh, 1999; McGaugh *e col.*, 2002). Sendo assim, como pode ser observado em vários estudos, o efeito da emoção na memória depende da integridade funcional da amígdala e da neurotransmissão noradrenérgica dentro dela, que ocorre de minutos a poucas horas após o aprendizado (Ferry *e col.*, 1999b). Se as memórias são fortalecidas pela modulação noradrenérgica na amígdala, então interferências neste processo podem resultar em diminuição ou facilitação da retenção do traço, que ocasionam em distúrbios no processo de reconsolidação.

Em nossos resultados observamos que a administração de NA intra-núcleo basolateral da amígdala, imediatamente após a reativação facilita, de forma duradoura, a retenção da memória em animais que receberam estímulos de média intensidade (choques de 0,4 e 0,6 mA). Experimentos em roedores, utilizando técnicas de microdiálise, demonstraram que a simples administração de um choque elétrico, equivalente ao utilizado durante o treino na tarefa de EI, induz a liberação de NA na amígdala. Ainda, este aumento é diretamente proporcional à intensidade do choque, alcançando níveis 97% maiores de liberação, se comparados ao nível basal, quando um choque de alta intensidade é aplicado (Quirarte *e col.*, 1998). Estes estudos poderiam explicar a ausência de efeito da NA nos animais que receberam choque de alta intensidade em nossos experimentos. Pois aplicação externa de NA não poderia aumentar o que já estaria muito aumentado (a alta liberação de NA induzida pelo treino).

O envolvimento de receptores adrenérgicos no processo de consolidação foi primeiramente sugerido por estudos que demonstraram que a infusão de antagonistas do subtipo β destes receptores, na amígdala, após o treino na esQUIVA inibitória - EI causa déficit na memória e que a administração concomitante de NA reverte esse efeito (Gallagher *e col.*, 1977). Estudos posteriores focando no processo de reconsolidação verificaram que o prejuízo da memória induzido pelo bloqueio de receptores β -adrenérgicos é maior quando seus antagonistas são administrados imediatamente após a reativação, do que quando infundidos imediatamente após a aquisição (Nader *e col.*, 2000a). Neste trabalho, demonstramos que a infusão intra-núcleo basolateral da amígdala de timolol, um antagonista não-seletivo dos receptores β -adrenérgicos, imediatamente, mas não 6 horas após a sessão de reativação, prejudica a retenção da memória da tarefa de EI, em animais que receberam choques de média e alta intensidades. Baseado nestes resultados e considerando-se a literatura apresentada, podemos sugerir que o sistema noradrenérgico facilita a reconsolidação da memória aversiva através da ativação de receptores β -adrenérgicos no núcleo basolateral da amígdala.

Sendo assim, podemos concluir que a evocação da memória inicia um processo de reestabilização, o qual requer síntese de novas proteínas e ativação da via noradrenérgica para persistir.

6. CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a reativação da memória da esquiva inibitória desencadeia um processo de reconsolidação que depende da síntese de novas proteínas e da ativação de vias neuromodulatórias, como a via noradrenérgica, no núcleo basolateral da amígdala.

Esta conclusão baseia-se nas seguintes observações:

- A infusão de inibidores da síntese proteica, anisomicina - ANI e emetina - EME, na região basolateral da amígdala imediatamente, mas não 6 horas após a reativação na tarefa de esquiva inibitória, bloqueia a reconsolidação da memória de maneira dependente da intensidade do estímulo.

- O prejuízo na memória causado pela infusão de ANI e EME imediatamente após a reativação, no núcleo basolateral da amígdala, não é temporário, mantendo-se 7 dias após a reativação, na tarefa de esquiva inibitória.

- A infusão de noradrenalina no núcleo basolateral da amígdala, imediatamente, mas não 6 horas após a reativação na tarefa de esquiva inibitória, facilita a reconsolidação da memória de maneira dependente da intensidade do estímulo.

- A infusão de timolol, um antagonista dos receptores β -adrenérgicos não-seletivo, no núcleo basolateral da amígdala, imediatamente, mas não 6 horas após a reativação na tarefa de esquiva inibitória, bloqueia a reconsolidação da memória de maneira dependente da intensidade do estímulo.

- Tanto a modulação positiva induzida pela noradrenalina - NA quanto a negativa induzida por timolol - Tim dos receptores β -adrenérgicos não é temporária, mantendo-se 7 dias após a reativação, na tarefa de esquiva inibitória.

- A infusão de anisomicina, emetina, noradrenalina ou timolol no núcleo basolateral da amígdala, 24 horas após a sessão de treino, na ausência de reativação, não tem efeito sobre a memória, na tarefa de esquiva inibitória.

7. REFERÊNCIAS

ABERINI, C. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. **Neurobiology of Learning and Memory**, 89(3):234-46, 2008.

BADDELEY, A.D. Memória Humana. Teoria e Prática. **Mc. Graw Hill Editora Madrid**, 1999.

BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. **Behavioural pharmacology**, 14 (8): 649-52, 2003.

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

CAHILL, L.; BABINSKY, R.; MARKOWITSCH, H.J.; MCGAUGH, J.L. The amygdala and emotional memory. **Nature**, 377: 295-296, 1995.

CAHILL, L. Neurobiological mechanisms of emotionally influenced, long-term memory. **Prog Brain Research**, 126:29-37, 2000.

CAMMAROTA, M; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learning and Memory**, 11(5):572-578, 2004.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, 86: 100-6, 2006.

DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton J, editor. **The Amygdala**. New York: **Wiley-Liss**, Inc, 255-306, 1992.

DEBIEC J, LEDOUX JE, NADER K (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron** 36:527-538.

DUVARCI, S.; NADER, K. Characterization of fear memory reconsolidation. **Journal of Neuroscience**, 24(42):9269-75, 2004.

FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. **Journal of Neuroscience**, 19:5119–5123, 1999.

FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Involvement of alpha1-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. **European Journal of Pharmacology**, 372:9–16, 1999a.

FLEXNER, L.B.; GOODMAN, R.H. Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. **Proc Natl Academic Science**, 72(11):4660-4663, 1975.

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 and Memory**, 12:620-625, 2005.

GALLAGHER, M.; KAPP, B.S.; MUSTY, R.E.; DRISCOLL, P.A. Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. **Science**, 198:423–425, 1977.

GOLD, P.E.; VAN BUSKIRK, R. Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. **Behavioral Biology**, 23(4):509-520, 1978.

GORDON, W.C. Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon. **Physiol Behav**, 18(1):95-99, 1977.

HAMANN, S.B.; ELY, T.D.; GRAFTON, S.T.; KILTS, C.D. Amygdala activity related to enhanced memory for pleasant and aversive stimuli. **Nature Neuroscience**, 2(3):289-293, 1999.

HATFIELD, T.; MCGAUGH, J.L. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. **Neurobiology of Learning and Memory**, 71:232–239, 1999.

HAYCOCK, J.W.; VAN BUSKIRK, R.; RYAN, J.R.; MCGAUGH, J.L. Enhancement of retention with centrally administered catecholamines. **Experimental Neurology**, 54(2):199-208, 1977.

HORI, K.; TANAKA, J.; NOMURA, M. Effects of discrimination learning on the rat amygdala dopamine release: a microdialysis study. **Brain Research**, 621(2):296-300, 1993.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behaviour Pharmacology**, 11(7-8):517-534, 2000.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre, RS: ArtMed. 2002.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behav Neural Biol**, 51(2):171-202, 1989.

KAWAHARA, H.; YOSHIDA, M.; YOKOO, H.; NISHI, M.; TANAKA, M. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. **Neuroscience Letters**, 162(1-2):81-84, 1993.

KETY S.S. Toward hypotheses for a biochemical component in the vulnerability to schizophrenia. **Semin Psychiatry**, 4(3):233-283, 1972.

KLÜVER, H.; BUCY, P.C. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. **American Journal of Physiology**, 119, 352-353, 1937.

LABAR, K.S.; CABEZA, R. Cognitive neuroscience of emotional memory. **Nature Review Neuroscience**, 7:54-64, 2006.

LATTAL, K.M.; ABEL, T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. **Proc Natl Acad Science**, 101(13):4667-4672, 2004.

LEDOUX, J. Emotional networks and motor control: a fearful view. **Progress Brain Research**, 107:437-446, 1996.

LEE, J.L.; EVERITT, B.J.; THOMAS, K.L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, 304:839-843, 2004.

LEWIS, D.J. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychol Bull**, 86(5):1054-1083, 1979.

LIANG, K.C.; JULER, R.G.; MCGAUGH, J.L. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. **Brain Research**, 368(1):125-133, 1986.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Review Neuroscience**, 24:897-931, 2001.

MCGAUGH JL, MCINTYRE CK, POWER AE. Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. **Neurobiology of Learning and Memory**, 78(3):539-552, 2002.

MERLO, E.; FREUDENTHAL, R.; MALDONADO, H.; ROMANO, A. Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. **Learning and Memory**, 12(1):23-29, 2005.

MISANIN, J.R.; MILLER, R.R.; LEWIS, D.J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, 160: 554-555, 1968.

MORRIS, R.G.; INGLIS, J.; AINGE, J.A.; OLVERMAN, H.J.; TULLOCH, J.; DUDAI, Y.; KELLY, P.A. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. **Neuron**, 50(3):479-89, 2006.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends in Neuroscience**, 26(2):65-72, 2003.

NADER, K.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406:722-726, 2000a.

NADER, K.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. The labile nature of consolidation theory. **Nature Review Neuroscience**, 1:216-219, 2000b.

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

POWER, A.E.; BERLAU, D.J.; MCGAUGH, J.L.; STEWARD, O. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of reexposure duration. **Learning and Memory**, 13:27-34, 2006.

QUIRARTE, G.L.; GALVEZ, R.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. **Brain Research**, 808(2):134-140, 1998.

ROOZENDAAL, B.; CASTELLO, N.A.; VEDANA, G.; BARSEGYAN, A.; MCGAUGH, J.L. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 90(3): 573-579, 2008.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning and Memory**, 14(1):36-46, 2007.

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**, 13:431-440, 2006.

RUDY, J.W.; BIEDENKAPP, J.C.; MOINEAU, J.; BOLDING, K. Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. **Learning and Memory**, 13(1):1-3, 2006.

SARA, S.J. Noradrenergic-cholinergic interaction: its possible role in memory dysfunction associated with senile dementia. **Arch Gerontol Geriatr Suppl**, 1:99-108, 1989.

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

SARA, S.J.; SEGAL, M. Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition. **Prog Brain Research**, 88: 571-585, 1991.

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

TANAKA, T.; YOKOO, H.; MIZOGUCHI, K.; YOSHIDA, M.; TSUDA, A.; TANAKA, M. Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. **Brain Research**, 544(1):174-176, 1991.

TOMAZ, C.; EDITH FRANK, J. Lateralized impairment of the emotional enhancement of verbal memory in patients with amygdala-hippocampus lesion. **Brain Cognition**, 52(2):223-230, 2003.

TRONEL, S.; MILEKIC, M.H.; ALBERINI, C.M. Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. **PLoS Biol**, 3(9):e293, 2005.

VIANNA, M.R.; SZAPIRO, G.; MCGAUGH, J.L.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proc Natl Acad Science**, 98(21):12251-12254, 2001.