

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

DAGIELI MARIA SARTOR PELISSARI

**O DESLOCAMENTO DA MEMÓRIA AVERSIVA AO LONGO DO TEMPO E AS
ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NESTE PERCURSO**

Porto Alegre

2011

DAGIELI MARIA SARTOR PELISSARI

**O DESLOCAMENTO DA MEMÓRIA AVERSIVA AO LONGO DO TEMPO E AS
ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NESTE PERCURSO**

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

Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre

2011

DAGIELI MARIA SARTOR PELISSARI

**O DESLOCAMENTO DA MEMÓRIA AVERSIVA AO LONGO DO TEMPO E AS
ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NESTE PERCURSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em ____ de _____ de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Iván Izquierdo - PUCRS

Dr. Jorge Medina – UBA

Dra. Janine Inez Rossato - PUCRS

Porto Alegre

2011

Dedico esta dissertação a minha
motivadora mãe, Anízia e ao meu
dedicado e amado marido Everton.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a minha mãe, que sempre me estimulou a investir na minha profissão e me acompanhou nos momentos de dificuldade, não deixando que eu desistisse nunca. Também, agradecer os conselhos que recebi do meu pai José e dos meus irmãos Diógenes e Diomar, que tiveram muita relevância na minha formação como pessoa.

Agradeço aos mestres Iván Izquierdo e Martín Cammarota pela oportunidade de me inserir em seu grupo de pesquisa, principalmente ao professor Martín, pela confiança demonstrada, no momento em que me acolheu como orientanda.

Aos colegas e amigos do Centro de Memória, obrigada a todos. Obrigada pelo companheirismo e pela persistência que tiveram ao me ensinar a rotina do laboratório. Adorei passar horas sentada operando animais ao lado de vocês na bancada, uma recordação que levo comigo.

Aos meus amigos.

Ao meu marido, Everton, pela compreensão, carinho, amizade e amor.

Muito Obrigada
Dagieli M.Sartor Pelissari

RESUMO

As memórias remotas têm fascinado os clínicos e experimentalistas, sendo um tema amplamente reconhecido por ter implicações na estruturação e organização da memória. É sabido que o aprendizado é dependente de mudanças nas estruturas sinápticas e na plasticidade hipocampal, mudanças estas dependentes de síntese protéica. No entanto estas memórias não são armazenadas permanentemente no hipocampo. Em humanos e animais, danos no hipocampo interrompem preferencialmente memórias recentes, poupando as memórias adquiridas há mais tempo. Estes efeitos indicam que as memórias remotas se tornam independentes do hipocampo. Neste trabalho, investigamos a participação serial do hipocampo e dos córtices entorrinal, retrosplenial e pré-frontal medial na expressão do traço mnemônico aversivo para a tarefa da esQUIVA inibitória, distintos dias após o treino. Para tanto, utilizamos infusões localizadas nas regiões alvo de muscimol, agonista GABA_A. Nossos resultados indicam e confirmam que o armazenamento e a evocação de memórias recentes dependem do hipocampo enquanto que, em estágios posteriores, o hipocampo interage com regiões neocorticais, onde as conexões cortico-corticais se desenvolvem progressivamente e, direcionam a estocagem e a lembrança das memórias remotas.

PALAVRAS-CHAVE: memória remota. memória recente. hipocampo. córtex entorrinal. córtex retrosplenial. córtex pré-frontal medial.

ABSTRACT

Remote memories have historically raised the interest of physicians and researchers, because of their importance in structural organization of mnemonic processes. Learning relies on protein synthesis-dependent modifications in synaptic efficacy. Consolidated memories, however, are not permanently stored in the hippocampus. Both in animals and in humans, hippocampal damage hampers recent memories without affecting older ones, which suggests that remote memories are hippocampus-independent. Here, we investigated the involvement of the hippocampus and of the entorhinal, retrosplenial and prefrontal cortices in the expression and long-term storage of inhibitory avoidance memory. Microinfusions of the GABA_A antagonist muscimol were given into specific brain structures of male Wistar rats. Our results indicate that the storage and retrieval of recently acquired memories depend on hippocampal integrity whereas, at later stages in mnemonic processing, the hippocampus interacts with other neocortical areas, stimulating connections between different cortical subareas, which then take control of memory storage.

KEYWORDS: remote memory. recent memory. hippocampus. entorhinal cortex. retrosplenial cortex. medial frontal cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Foto de um animal sendo submetido à cirurgia estereotáctica	22
Figura 2 Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória.....	23
Figura 3 Campo Aberto..	24
Figura 4 Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.	25
Figura 5 Representação esquemática de cortes histológicos	26
Figura 6 Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos	27
Figura 7 A expressão da memória aversiva requer a participação da região CA1 do Hipocampo Dorsal	30
Figura 8 A expressão da memória aversiva requer a participação do ENTO	32
Figura 9 A expressão da memória aversiva não requer a participação do RETRO.	33
Figura 10 A expressão da memória aversiva requer a participação do CPFm.....	34
Figura 11 A infusão de muscimol 15 min antes de uma sessão comportamental não afeta a atividade locomotora e exploratória	35
Figura 12 A infusão de muscimol 15 min antes de uma sessão comportamental não afeta o estado de ansiedade.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram.....	13
Tabela 2 Classificação das MLD de acordo com o conteúdo.	14
Tabela 3 A infusão de muscimol na região CA1 do hipocampo dorsal ou nos córtices entorrinal, retoesplénial e pré-frontal medial.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

VEH - animais veículos

MUS – muscimol

EI – Esquiva inibitória

GABA – ácido gama- amino butírico

GABA_A – receptor gabaérgico do tipo A

CPFm – córtex pré frontal medial

CA1 - Corno de Amon 1

ENTO - Córtex Entorrinal

MLD - Memória de Longa Duração

µl - Microlitro

RETRO – Retroesplenial

LTP - Potenciação de Longa Duração

LDP – Depressão de longa Duração

CR – Resposta Condicionada

CCA- Córtex Cingulado Anterior

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Amostra	21
3.2	Animais Experimentais	21
3.2.1	Cirurgia Estereotáxica.....	21
3.2.2	Manipulação	22
3.3	Protocolos experimentais.....	23
3.3.1	Esquiva inibitória.....	23
3.3.2	Campo Aberto.....	24
3.3.3	Labirinto em Cruz Elevado.....	24
3.3.4	Análise histológica	25
3.4	Tratamento farmacológico	26
3.5	Análise Estatística	28
4	RESULTADOS	29
4.1	A infusão intra-hipocampal de MUS 15 minutos antes do teste de 2 e 14 dias após o treino na tarefa da esquiva inibitória impede a expressão da memória aversiva.	29
4.2	A infusão intra-córtex entorrinal de MUS 15 minutos antes do teste de 2, 14 e 28 dias após o treino na tarefa da esquiva inibitória impede a expressão da memória aversiva.	30
4.3	A infusão intra-RETRO de MUS 15 minutos antes do teste na tarefa da esquiva inibitória não impede a expressão da memória aversiva.	32
4.4	A infusão intra-CPFm de MUS 15 minutos antes do teste na tarefa da esquiva inibitória impede a expressão da memória aversiva.....	33
4.5	A infusão de muscimol na região CA1 do hipocampo dorsal ou nos córtices entorrinal, retrosplenial e pré-frontal medial, 15 minutos antes do teste não afeta a atividade exploratória e locomotora ou o estado de ansiedade.	35
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de recordar experiências e demonstrar emoções através da fala, dos movimentos corporais e por meio de atitudes, torna o homem superior as outras espécies. No entanto, os animais também se comunicam de formas distintas por não disporem da capacidade de falar. Esta forma de comunicação que visualizamos no comportamento do animal, levou o homem ao encontro do entendimento de muitos conceitos referentes ao cérebro, como a formação e o processamento da memória.

Os processos básicos que estão envolvidos na formação da memória são caracterizados pela aquisição, formação, conservação e evocação de informações. Este conjunto de mecanismos ocorre para que as lembranças conscientes e inconscientes façam de cada indivíduo um ser único, constituído pelas suas experiências de vida que determinam o que chamamos de personalidade (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003).

O conceito “personalidade” diz unicamente do ser humano, que como bem sabemos, consegue demonstrar através da conduta e da linguagem seu aprendizado adquirido ao longo do seu desenvolvimento, o que permite que ele seja aquilo que recorda, conhece (Izquierdo, 2002).

As memórias são formadas a partir de experiências diárias, sendo estas fundamentais para a construção da personalidade individual, ou seja, o que nos torna seres humanos é exatamente a soma do que queremos lembrar com aquilo que queremos esquecer (Izquierdo, 2004).

Ao longo da vida, recebemos uma avalanche de informações que precisam ser processadas pelo sistema nervoso. Estas informações sofrem interferências como do estresse ou são filtradas por mecanismos atencionais e emocionais. Dentre aquelas que são relevantes, apenas algumas são consolidadas como memórias de longa duração, e mesmo dentre estas, muitas são esquecidas (Izquierdo, 2002).

Quanto ao tempo que permanecem armazenadas, as memórias são ditas de curta duração, com duração de poucas horas; de longa duração, com permanência de horas ou dias; ou ainda memórias remotas, que são as memórias de longa duração que persistem por muitos meses ou anos. As memórias de longa duração

necessitam de síntese de proteína, o que não ocorre na memória de curta duração. (Tabela 1).

Quanto ao seu conteúdo, consideramos dois tipos de memória. Aquela adquirida com intervenção da consciência é chamada memória declarativa ou memória explícita, se refere a fatos, eventos ou conhecimentos que possam ser contados ou relatados pelo indivíduo. O segundo tipo de memória relacionado ao conteúdo é a memória não-declarativa ou implícita, que diz das capacidades e habilidades motoras do indivíduo, as quais são difíceis de serem descritas ou faladas por ele (Tabela 2). Nadar, dirigir um automóvel e digitar são exemplos de memórias procedimentais.

Tabela 1 Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram

	Tempo de permanência	Características
Memórias Sensoriais	Poucos segundos.	Retêm a breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido, ou seja, depois que o sistema sensorial correspondente deixa de enviar informação ao cérebro.
Memórias de Curta Duração (MCD)	Menos de 3 horas.	Permite manter “na mente” e em um estado ativo e facilmente acessível, uma pequena quantidade de informação.
Memórias de Longa Duração (MLD)	Dias, meses, anos, a vida toda.	Contêm itens informacionais de diversas índoles altamente interconectados entre si os quais se encontram armazenados de maneira mais ou menos permanente constituindo um sistema de arquivo dinâmico.

Tabela 2 Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo.

Características		Subdivisões e características	
Explícitas/ Declarativas	Informações que usualmente sabemos que possuímos e a qual temos acesso consciente.	<i>Episódicas</i>	Guardam informações acerca de nossa própria vida.
		<i>Semânticas</i>	Armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
Implícitas/ Não-declarativas	Informações às quais não temos acesso consciente, tal como a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles derivados pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.	<i>Representação perceptual</i>	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente (priming).
		<i>Procedimentos</i>	Hábitos, habilidades, regras.
		<i>Associativa</i>	Associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante).
		<i>Não associativa</i>	Atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.

As memórias declarativas podem ser subdivididas em episódicas ou semânticas. As episódicas são as nossas memórias autobiográficas, aquelas referentes a eventos aos quais assistimos, participamos, ou seja, vivenciamos ao longo de nossas vidas. Já as memórias semânticas, carregam informações que são de conhecimento geral, como o conhecimento em psicologia, língua portuguesa ou contos populares. Todas as memórias, independente do tipo, não são adquiridas na sua forma definitiva, e durante os primeiros minutos ou horas são suscetíveis a interferências geradas por novas situações que venham a ocorrer, assim como por outras experiências, drogas ou tratamentos (McGaugh, 2000; Izquierdo *et al.*, 2002).

A formação desses dois tipos de memórias, assim como de outros, depende de diversos processos bioquímicos e metabólicos que são desencadeados em distintas estruturas cerebrais. Enquanto as memórias explícitas requerem a integridade do lobo temporal medial, que compreende o hipocampo, o giro denteado e o complexo subicular, juntamente com os córtices entorrinal (ENTO), perirrinal e para-hipocampal; as memórias implícitas envolvem diferentes estruturas como a amígdala, os gânglios da base e o cerebelo (Albright *et al.*, 2000; Lees e Jones, 2000; Izquierdo, 2002; Squire *et al.*, 2007).

Os mecanismos neurofisiológicos e neuroquímicos que desencadeiam os processos mnemônicos são um dos temas mais fascinantes da neurociência e objeto de diversos estudos há muito tempo. A formação de memórias envolve alterações na representação neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre neurônios (Dudai, 1989), sendo que, eventos plásticos podem incluir alterações na estrutura, na distribuição e no número de sinapses (Rusakov *et al.*, 1997; Woolf, 1998; Geinisman, 2000).

No processo pelo qual as informações são armazenadas, chamado consolidação da memória, ocorrem diferentes eventos moleculares, como a transcrição e tradução gênica, conseqüentemente à síntese de novas proteínas necessárias para modificações funcionais e estruturais (Izquierdo *et al.*, 2006). Postula-se que estes requisitos moleculares decorrentes do processo de consolidação da memória são apenas os passos iniciais de uma série de eventos que evoluem por um período prolongado, em diferentes regiões do cérebro (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006).

Uma das perguntas fundamentais das neurociências e que ainda não tem uma resposta refere-se a onde e de que maneira se armazenam nossas memórias.

A falta de uma resposta satisfatória para esta pergunta deve-se, em parte, ao fato de que durante décadas a formação de memórias tem sido entendida (e estudada) como um fenômeno seqüencial, no qual a informação torna-se progressivamente mais resistente na medida em que passa pelos sucessivos estágios de um processo de consolidação contínuo que, uma vez concluído, resulta em um traço mnemônico imutável e imune a ação de agentes amnésicos, denominado memória de longa duração (MLD; McGaugh, 1966). Ainda que indubitavelmente frutífera (Izquierdo e Medina 1997; McGaugh, 2000) e extremamente útil na hora de explicar os mecanismos bioquímicos envolvidos no processamento inicial da informação adquirida (Izquierdo *et al.*, 2006), a noção de que a formação de memórias é produto de um mecanismo seqüencial e unidirecional, levou à suposição de que ela é vulnerável ao valor da experiência que lhe deu origem ou de alterações no estado neuro-humoral (naturais ou farmacologicamente induzidas) do sujeito.

A formação da memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais, processos que compreendem diversas fases e que requerem entre três e oito horas de duração. Enquanto esses processos não estiverem concluídos, a memória estará sujeita a alterações.

O hipocampo é uma estrutura cerebral 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 (Izquierdo *et al.*, 1998a), 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.*, 1998b), entre elas os córtices ENTO, perirrinal e pré-frontal medial (CPFm).

As informações que chegam ao hipocampo percorrem a subárea CA1, após escalas no ENTO, giro denteado e subárea CA3. A subárea CA1 projeta, por sua vez, para o subículo, e este para o ENTO. O ENTO recebe fibras de, e emite fibras para todas as demais regiões do córtex. Diversos estudos correlacionaram lesões no hipocampo ou de suas conexões extrínsecas, com o prejuízo em tarefas de memória espacial (Izquierdo e Medina, 1997; Muir, 2001). O hipocampo pode armazenar a memória de longo prazo durante horas ou dias, transferindo-a gradativamente para regiões específicas do córtex cerebral. Suas conexões via ENTO possibilitam a comparação entre as condições de uma experiência atual com outras similares mais

antigas. Com dano parcial no hipocampo, são produzidos vários graus de amnésia e, quando totalmente destruído, nada mais é gravado e pouco pode ser recordado. Porém memórias mais antigas permanecem inalteradas, corroborando com a hipótese que o local final de armazenamento das memórias se desloca do hipocampo para outras estruturas (Bevilaqua *et al.*, 1997; Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 1997, 1998).

Uma das teorias da consolidação da memória postula que o armazenamento e a evocação de memórias recentes dependem do hipocampo enquanto que, em estágios posteriores, o hipocampo interage com regiões neocorticais, onde as conexões corticocorticais se desenvolvem progressivamente e, direcionam a estocagem e a lembrança das memórias remotas (Squire e Alvarez, 1995; Squire *et al.*, 2004; Frankland e Bontempi, 2005; Squire e Bayley, 2007).

Evidências experimentais utilizando imagens, sugerem que existe uma ativação seqüencial do hipocampo e do CPFm (Bontempi *et al.*, 1999). Mais ainda, outros estudos mostraram que a indução de genes imediatos, e a expressão de proteínas no crescimento axonal (Routtenberg *et al.*, 2000; Frankland *et al.*, 2004; Maviel *et al.*, 2004; Frankland e Bontempi, 2005) sustentam a idéia de que estruturas extra hipocampais são requeridas na consolidação de memórias remotas (Teng e Squire, 1999; Rosenbaum *et al.*, 2000) e que a transformação de um traço originalmente débil em resistente envolve também a ativação coordenada do hipocampo e áreas corticais, incluindo o CPFm, CCA e retroesplial (RETRO).

As memórias, no entanto, parecem não ser literalmente transferidas do hipocampo para o neocórtex conforme consolidadas ao longo do tempo. Vários modelos propõem que o hipocampo tem um papel privilegiado em organizar a estocagem das memórias remotas que pode consistir em modificar dinamicamente as conectividades nas redes corticais (McClelland *et al.*, 1995; Squire e Alvarez, 1995). Este papel sugere intuitivamente que ocorrem mudanças na morfologia dos neurônios corticais ou hipocampais durante a formação de memórias recentes ou remotas (Leuner *et al.*, 2003; Knafo *et al.*, 2004; Restivo *et al.*, 2006).

A consolidação de memórias em uma forma estável e de longa duração é um tópico de investigação científica teórico e empírico (McGaugh, 2000; Squire *et al.*, 2004; Frankland e Bontempi, 2005; Wiltgen *et al.*, 2005a). Independente dos circuitos cerebrais em que se baseiam diferentes formas de memórias, a contribuição específica de uma região pode depender da idade daquela memória

(Ribot, 1882; Squire, 1992; Knowlton e Fanselow, 1998; Frankland e Bontempi, 2005). A teoria da consolidação sugere que as memórias são gradualmente reorganizadas assim como as regiões cerebrais responsáveis pelo armazenamento e evocação das memórias se modificam (Marr, 1971; McClelland *et al.*, 1995; Squire e Alvarez, 1995). As primeiras evidências disto advêm de modelos de amnésia retrógrada graduados temporalmente em pacientes que sofreram dano no lobo temporal (Scoville e Milner, 1957). Padrões similares são observados em animais usando manipulações no hipocampo via uma variedade de procedimentos, incluindo discriminação de objetos (Zola-Morgan e Squire, 1990), medo condicionado ao contexto (Kim e Fanselow, 1992; Anagnostaras *et al.*, 1999), condicionamento ao piscar de olhos (Kim *et al.*, 1995; Takehara *et al.*, 2002) e, preferência ao sabor (Clark *et al.*, 2002).

Nos últimos anos ocorreram mudanças na direção da identificação das regiões extra hipocampais que mantêm as memórias de longa duração e, uma das regiões implicadas é o CPFm. O hipocampo e o CPFm estão funcionalmente inter-relacionados através de padrões de atividade correlacionados que podem ser importantes para a consolidação da memória (Jay e Witter 1991; Siapas e Wilson 1998; Sutherland e McNaughton 2000; Siapas *et al.*, 2005). Bontempi e colaboradores (1999) mostraram que a atividade metabólica no CPFm aumenta com longos intervalos de retenção, e que existe um gradiente temporal para ativação de Zif-268 e Fos no CPFm após o treino na tarefa de medo condicionado ao contexto (Frankland *et al.*, 2004).

Experimentos que buscam avaliar a localização das memórias remotas, mostram que lesões no CPFm prejudicam severamente a resposta condicionada (CR) adquirida há mais tempo, porém tem pequeno efeito sobre CR recentes (Squire e Bayley, 2007)

Outra estrutura que participa dos aspectos envolvidos com a memória, fazendo conexões com o hipocampo é o ENTO (Izquierdo, 2002), assim como intermediando os sinais da formação hipocampal e o neocórtex associativo (Bear, Connors e Paradino, 1995; Zilles e Wree, 1995; Martin, 1996) é o córtex cingulado. Esta última estrutura está dividida em região anterior e região posterior, sendo que a região esta última também é chamada de RETRO (Zilles e Wree, 1995), onde a LTP e LDP tem sido descritas (Hedberg e Stanton, 1995). Pouco se sabe a respeito da ligação do RETRO com a memória. No rato, o RETRO é dominado por recíprocas

conexões com o núcleo anterior dorsal e o núcleo lateral dorsal do tálamo, assim como com o hipocampo. O núcleo anterior do tálamo, RETRO e o hipocampo dependem um do outro no aprendizado espacial. O RETRO faz ainda, recíprocas ligações com o córtex pré- frontal dorsolateral, porém não se sabe se existe e qual seria a única contribuição mnemônica dele (Vann *et al.*, 2009).

A formação de novas memórias envolve mudanças na estrutura sináptica e na plasticidade hipocampal, mudanças estas dependentes de síntese protéica. No entanto estas memórias não são armazenadas permanentemente no hipocampo. Em humanos e animais, danos no hipocampo interrompem preferencialmente memórias recentes, poupando as memórias adquiridas há mais tempo. Estes efeitos indicam que as memórias remotas tornam-se independentes do hipocampo, por isso a importância de estar buscando as outras estruturas que as memórias percorrem ao longo do cérebro durante o processo de armazenamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a participação serial ou paralela de diferentes estruturas cerebrais na expressão do traço mnemônico aversivo com distintas idades.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar o papel do hipocampo para a expressão da memória aversiva com distintas idades.

Elucidar o envolvimento do córtex entorrinal para a expressão da memória aversiva com distintas idades.

Avaliar a importância do córtex retrosplenial para a expressão da memória aversiva com distintas idades.

Estudar a importância do CPFm para a expressão da memória aversiva com distintas idades.

Investigar se a participação destas diferentes estruturas (hipocampo e córtices entorrinal, retrosplenial e pré-frontal medial) é seqüencial conforme avança a idade do traço mnemônico.

Estudar que estruturas estão envolvidas com o deslocamento da informação com o passar do tempo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra

A amostra foi constituída por ratos Wistar machos adultos, com aproximadamente 3 meses de idade, com um peso médio de 330 a 400 gramas. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, como será descrito a seguir.

3.2 Animais Experimentais

Os animais selecionados para os experimentos permaneceram alojados em caixas-moradia, agrupados em 5 animais por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23° C), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, 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. Foram tomadas precauções com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

3.2.1 Cirurgia Estereotáxica

Para fim de experimentação farmacológica, os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica (Figura 1) para implantação bilateral de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas na região CA1 do hipocampo dorsal (AP - 4,2; LL ± 3,0; DV - 2,0) e nos córtices pré-frontal medial (AP + 3,2; LL ± 0,8; DV -

3,0), retrosplenial (AP - 3,9; LL \pm 0,4; DV - 1,8) e entorrinal (AP - 6,7; LL \pm 3,8; DV - 9,2; INCL 10°) segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1986).

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina, juntamente com Xilazina, que tem efeito sedativo, miorelaxante e analgésico, administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Uma vez recuperados da anestesia, os animais eram recolocados em suas caixas-moradia. Os mesmos ficaram em recuperação durante quatro dias antes de serem submetidos a qualquer procedimento.



Figura 1 Foto de um animal sendo submetido à cirurgia estereotáctica.

3.2.2 Manipulação

No quinto dia após a cirurgia, os animais foram submetidos a duas sessões de manipulação. Durante cada sessão, os animais eram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 3 minutos.

3.3 Protocolos experimentais

3.3.1 Esquiva inibitória

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

O aparato utilizado na tarefa de esquiva inibitória consiste em uma caixa nas dimensões 50 x 25 x 25 cm (L x A x C), com uma plataforma do lado esquerdo, medindo 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm de comprimento (Figura 2). O assoalho desta caixa é constituído por barras metálicas que conduzem corrente elétrica. A sessão de treino consistiu em colocar gentilmente o animal sobre a plataforma. Quando o animal descia da plataforma com as quatro patas no assoalho metálico, recebia um choque elétrico de 0,8 mA por 2 segundos, sendo retirado imediatamente da caixa. A retenção da memória na esquiva inibitória foi avaliada em uma sessão de teste realizada 2, 14, 28 ou 42 dias após o treino. Nesta sessão o animal foi novamente colocado sobre a plataforma e foi contabilizado o tempo que o mesmo levava para descer com as quatro patas na grade, nesta sessão de teste o animal não recebe choque.



Figura 2 Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória. Note o animal sobre a plataforma.

3.3.2 Campo Aberto

A fim de verificar se a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais não estavam alterados devido aos tratamentos farmacológicos, utilizou-se a tarefa denominada de campo aberto. O aparelho utilizado nesta tarefa consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente, sendo o assoalho da caixa dividido em 12 quadrantes iguais (Figura 3). A tarefa consiste em colocar gentilmente o animal na arena do campo aberto para explorar a caixa livremente por 5 minutos. Foram registrados o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras (em inglês *rearings*), que são tomados como indicadores de locomoção e atividade exploratória respectivamente (Bonini *et al.*, 2006).



Figura 3 Campo Aberto. Foto do aparato utilizado para avaliação da atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais.

3.3.3 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado constitui um modelo comportamental utilizado em estudos para a compreensão de processos neurobiológicos associados à ansiedade

(Da Silva *et al.*, 2006). O aparato consiste de dois braços abertos, medindo 50 x 10 cm, dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes laterais desprovidas de teto, medindo 50 x 10 x 40 cm. O labirinto fica elevado a uma altura de 1 metro do chão (Figura 4).

Os animais foram individualmente colocados no centro do labirinto em cruz elevado e ficavam livres para explorá-lo durante uma sessão de 5 minutos. Foram registrados o número total de entradas nos quatro braços, bem como o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (Bevilaqua *et al.*, 2003; Kerr *et al.*, 2005).



Figura 4 Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.

3.3.4 Análise histológica

Após o término do experimento comportamental, infundimos azul de metileno 4% no mesmo volume utilizado para a infusão dos fármacos de acordo com cada região estudada. Os animais foram sacrificados através de decapitação 15 minutos após a infusão, tempo de difusão do corante. O encéfalo foi retirado e colocado em formol 10% por pelo menos 4 dias, com um volume de formol 3 vezes maior que o volume do encéfalo. Após esse período o encéfalo era fatiado e corado pra a análise da região atingida (Figura 5). Apenas dados de animais com as cânulas implantadas corretamente foram incluídos nas análises estatísticas.

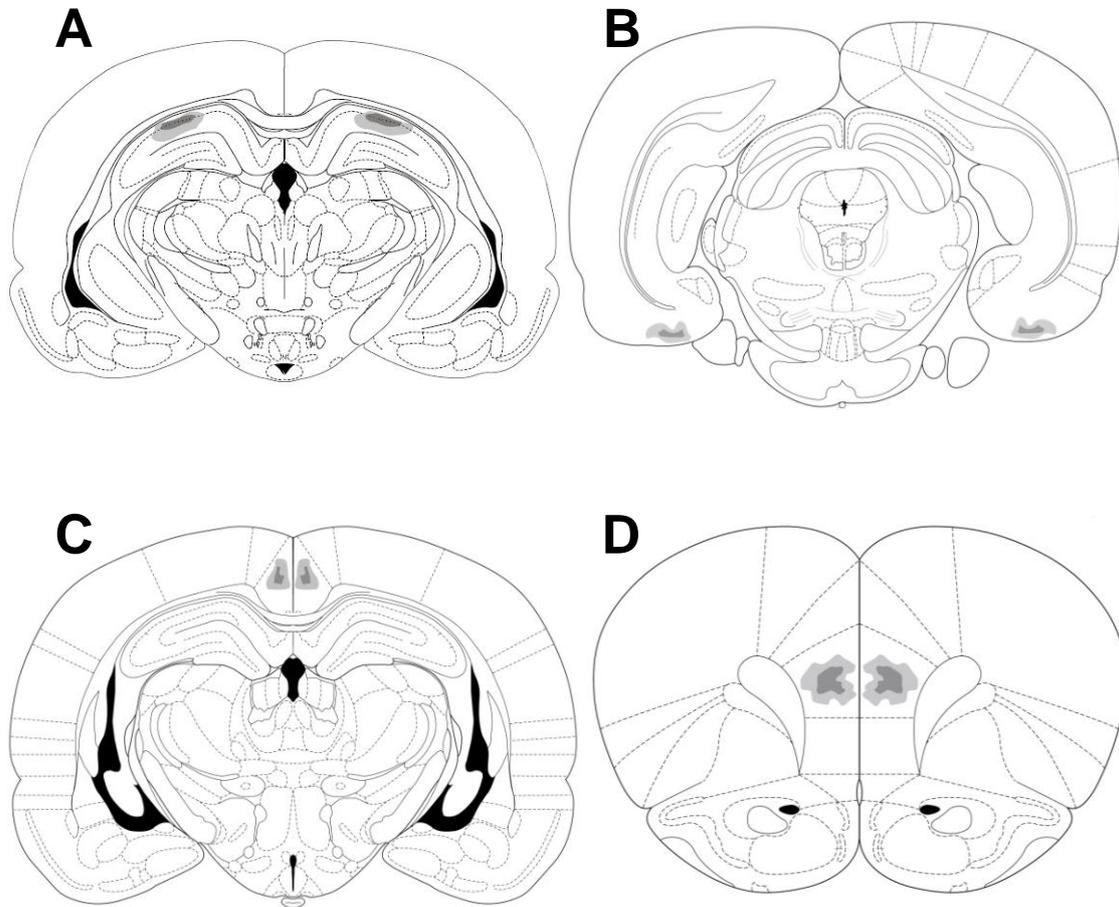


Figura 5 Representação esquemática de cortes histológicos de hemisfério cerebral. A parte grifada mostra a área alvo das infusões realizadas nos experimentos apresentados nesta dissertação; em **A** região CA1 do hipocampo dorsal (AP - 4,2; LL \pm 3,0; DV - 2,0), em **B** ENTO (AP - 6,7; LL \pm 3,8; DV - 9,2; INCL 10°), em **C** RETRO (AP - 3,9; LL \pm 0,4; DV - 1,8) e em **D** CPFm (AP + 3,2; LL \pm 0,8; DV - 3,0). Animais nos quais a infusão de azul de metileno, realizada durante a verificação de posicionamento das cânulas, estava fora da área indicada acima não foram considerados durante a análise dos dados.

3.4 Tratamento farmacológico

Utilizamos neste estudo o Muscimol (MUS). Esta droga é um agonista dos receptores GABA_A. Com a ligação de seu agonista, o receptor GABA_A apresenta um efeito inibidor instantâneo e reversível, causando uma imediata supressão da atividade celular da área atingida pela infusão, motivo pelo qual foi objeto de escolha neste trabalho. Através da infusão de MUS pode-se inibir temporariamente uma região específica sem afetar outras regiões que estão no entorno.

A dose utilizada ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) dissolvida em solução salina ($10\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi determinada baseada em experimentos pilotos e/ou estudos prévios mostrando o efeito do composto sobre o aprendizado ou desempenho comportamental.

Para a realização do tratamento farmacológico utilizou-se uma micro-seringa Hamilton, acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão ($0,05 \text{ mm}$ de diâmetro). O volume de infusão variou de acordo com a região estudada. Assim na região CA1 do hipocampo dorsal e nos CPFm e RETRO infundimos $1,0 \mu\text{l}/\text{lado}$ e no ENTO infundimos $0,5 \mu\text{l}/\text{lado}$. A infusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão (KDSscientific) a uma velocidade de $0,5 \mu\text{l}/\text{min}$. Ao término, a agulha de infusão era deixada no local por 60 segundos adicionais para evitar refluxo (Figura 6). Nos animais controles, realizou-se o mesmo procedimento, no entanto, fazendo uso de solução salina 0,9%.

A infusão do fármaco foi realizada 15 minutos antes de cada teste, o animal previamente treinado recebia a infusão de MUS na região CA1 do hipocampo dorsal ou nos córtices ENTO, RETRO e CPFm e 15 minutos mais tarde era novamente colocado sobre a plataforma para a avaliação da latência de descida. O procedimento utilizado na sessão de teste era idêntico ao empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque.

Nos experimentos comportamentais complementares os animais receberam infusão de MUS 15 minutos antes de serem treinados no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado.



Figura 6 Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia estereotaxicamente implantadas.

3.5 Análise Estatística

Para a análise dos dados obtidos na tarefa de esquiva inibitória foram utilizados testes de estatística paramétrica, sendo eles: ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. Para a análise dos dados das tarefas de Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado foi utilizado teste *t de Student*. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

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

4 RESULTADOS

4.1 A infusão intra-hipocampal de MUS 15 minutos antes do teste de 2 e 14 dias após o treino na tarefa da esquiva inibitória impede a expressão da memória aversiva.

O estudo da consolidação da memória em sua forma perdurável e estável ao longo do tempo é um tópico de considerável especulação científica tanto teórica e prática (McGaugh, 2000; Squire *et al.*, 2004; Frankland e Bontempi, 2005; Wiltgen *et al.*, 2005a). Independente dos circuitos cerebrais em que se baseiam os distintos tipos de memória e, dentro de um particular tipo de memória, a contribuição de uma região específica pode depender da idade desta memória (Ribot, 1882; Squire, 1992; Knowlton e Fanselow, 1998; Frankland e Bontempi, 2005).

Uma influente teoria da consolidação da memória postula que a armazenagem e a evocação de memórias recentes dependem do hipocampo e que, em estágios tardios, o hipocampo interage com regiões neocorticais onde as conexões cortico-corticais se desenvolvem e passam a governar a estocagem e a evocação das memórias remotas (Squire e Alvarez, 1995; Squire *et al.*, 2004; Frankland e Bontempi, 2005; Squire e Bayley, 2007).

Neste trabalho decidimos investigar em primeiro lugar se a inibição da região CA1 do hipocampo dorsal 15 min antes do teste na tarefa da esquiva inibitória (EI) impede a expressão da memória relacionada a esta tarefa. Para tal, treinamos animais na EI como descrito na metodologia e dividimos estes animais em 4 grupos distintos que foram testados 2, 14, 28 ou 42 dias após o treino. Quinze minutos antes do teste os animais receberam infusão bilateral de veículo (VEH) ou MUS (1 μ l/lado – 0,1 μ g/ μ l), um agonista dos receptores gabaérgicos, na região CA1 do hipocampo dorsal. Como se pode observar na Figura 7, a administração de MUS na região CA1 15 min antes do teste de 2 e 14 dias bloqueou a expressão da memória aversiva (representada aqui pela latência de descida da plataforma) se comparada ao respectivo grupo controle. No entanto este efeito amnésico não é observado nos animais que receberam a infusão de MUS 15 min antes do teste realizado 28 ou 42 dias após o treino.

Além disso, podemos observar no gráfico um declínio da latência de descida da plataforma de acordo com o tempo e este decaimento é estatisticamente significativo. No entanto, nos testes de 28 e 42 dias, onde as medias das latências são menores, ainda podemos observar que os animais apresentam memória se comparados às latências registradas no dia do treino.

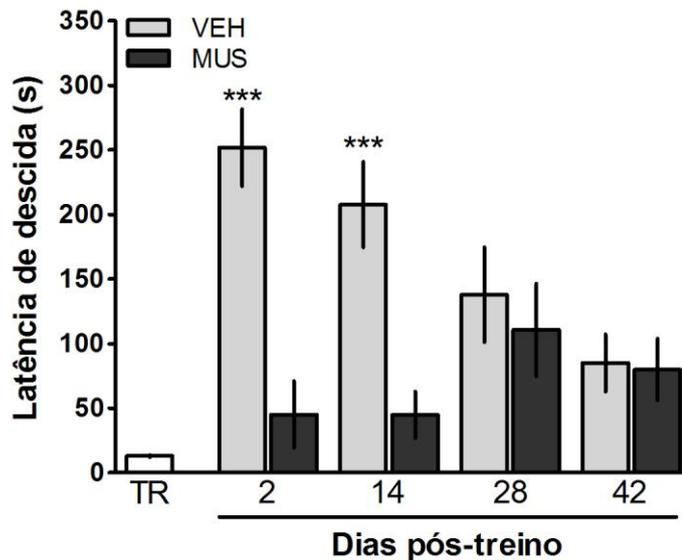


Figura 7 A expressão da memória aversiva requer a participação da região CA1 do Hipocampo Dorsal 2 e 14 dias após o treino. Animais foram treinados na tarefa de EI e divididos em 4 distintos grupos que foram testados 2, 14, 28 ou 42 dias mais tarde. Quinze minutos antes do teste estes animais receberam infusão bilateral na região CA1 do hipocampo dorsal de veículo (VEH; solução salina 0,9 %) ou muscimol (MUS – 0,1 µg/µl; 1 µl/lado). As barras representam média ± erro padrão das latências de descida durante o treino (TR) e durante os testes de retenção realizados 2, 14, 28 ou 42 dias pós-treino. Foram utilizados 12 animais por grupo.

4.2 A infusão intra-córtex entorrinal de MUS 15 minutos antes do teste de 2, 14 e 28 dias após o treino na tarefa da esQUIVA inibitória impede a expressão da memória aversiva.

A teoria da consolidação sugere que as memórias são gradualmente reorganizadas fazendo com que as regiões cerebrais responsáveis pelo armazenamento e evocação do traço mnemônico sejam modificadas ao longo do tempo (Marr, 1971; McClelland *et al.*, 1995; Squire e Alvarez, 1995). As memórias, no entanto, não parecem ser literalmente transferidas do hipocampo para o neocórtex como elas foram consolidadas. Vários modelos propuseram que o

hipocampo desempenha um papel privilegiado na organização da estocagem das memórias remotas que consiste em modificar dinamicamente a conectividade e distribuição pra as redes corticais (McClelland *et al.*, 1995; Squire e Alvarez,1995). Apesar disto, vários estudos indicam que as memórias mais velhas tornam-se independentes do hipocampo.

Após termos verificado que o MUS impede a expressão da memória aversiva quando infundido no hipocampo antes do teste de 2 e 14 dias decidimos investigar se a inibição do ENTO interfere na expressão da memória aversiva. Para isso, treinamos animais como descrito na metodologia e dividimos estes animais em 4 grupos diferentes, que foram testados 2, 14, 28 e 42 dias após o treino. Quinze minutos antes do teste os animais receberam infusão bilateral de VEH ou MUS (0,1 μ l/lado – 0,1 μ g/ μ l), um agonista dos receptores gabaérgicos, no ENTO. Como se pode observar na Figura 8, a administração de MUS no ENTO 15 min antes do teste bloqueou a expressão da memória aversiva (representada aqui pela latência de descida da plataforma) tanto do teste de 2 e 14 quanto de 28 dias, se comparada ao respectivo grupo controle. No entanto este efeito amnésico não é observado nos animais que receberam a infusão de MUS 15 min antes do teste de 42 dias após o treino.

Além disso, podemos observar no gráfico um declínio da latência de descida da plataforma de acordo com o tempo e este decaimento é estatisticamente significativo. No entanto, no teste 42 dias, onde a media da latência é menor, ainda podemos observar que os animais apresentam memória se comparados às latências dos animais treinados.

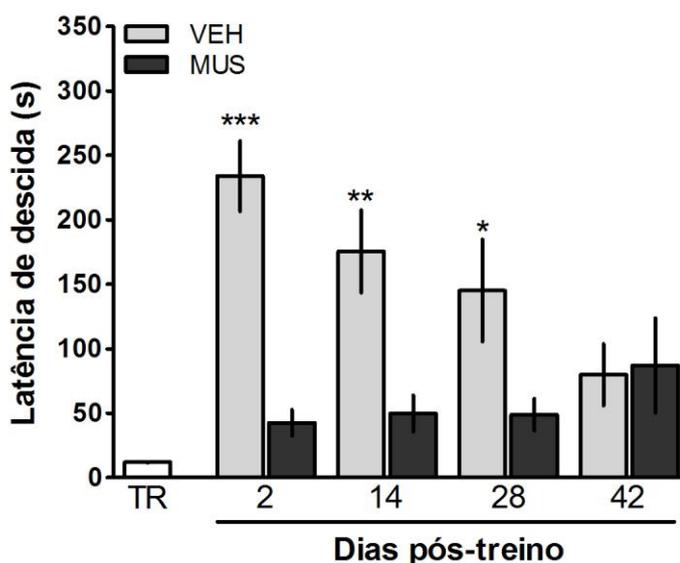


Figura 8 A expressão da memória aversiva requer a participação do ENTO 2, 14 e 28 dias após o treino. Animais foram treinados na tarefa de EI e divididos em 4 distintos grupos que foram testados 2, 14, 28 ou 42 dias mais tarde. Quinze minutos antes do teste estes animais receberam infusão bilateral no ENTO de veículo (VEH; solução salina 0,9 %) ou muscimol (MUS – 0,1 µg/µl; 0,1 µl/lado). As barras representam média ± erro padrão das latências de descida durante o treino (TR) e durante os testes de retenção realizados 2, 14, 28 ou 42 dias pós-treino. Foram utilizados 12 animais por grupo.

4.3 A infusão intra-retroesplênica de MUS 15 minutos antes do teste na tarefa da esQUIVA inibitória não impede a expressão da memória aversiva.

Na tentativa de investigar outro possível sítio de armazenamento de memórias remotas e após termos verificado que o MUS impede a expressão da memória aversiva quando infundido no hipocampo antes do teste de 2 e 14 dias e no ENTO quando infundido antes do teste de 2, 14 e 28 dias decidimos investigar se a inibição do RETRO interfere na expressão da memória aversiva. Para isso, treinamos animais como descrito na metodologia e dividimos estes animais em 4 grupos diferentes, que foram testados 2, 14, 28 e 42 dias após o treino. Quinze minutos antes do teste os animais receberam infusão bilateral de veículo (VEH) ou MUS (1,0 µl/lado – 0,1 µg/µl), um agonista dos receptores gabaérgicos, no RETRO. Como se pode observar na Figura 9, a administração de MUS no RETRO 15 min antes de qualquer um dos testes realizados não bloqueou a expressão da memória aversiva (representada aqui pela latência de descida da plataforma).

Além disso, podemos observar no gráfico um declínio da latência de descida da plataforma de acordo com o tempo e este decaimento é estatisticamente significativo. No entanto, no teste de 42 dias, onde a média da latência é menor, ainda podemos observar que os animais apresentam memória se comparados às latências dos animais treinados.

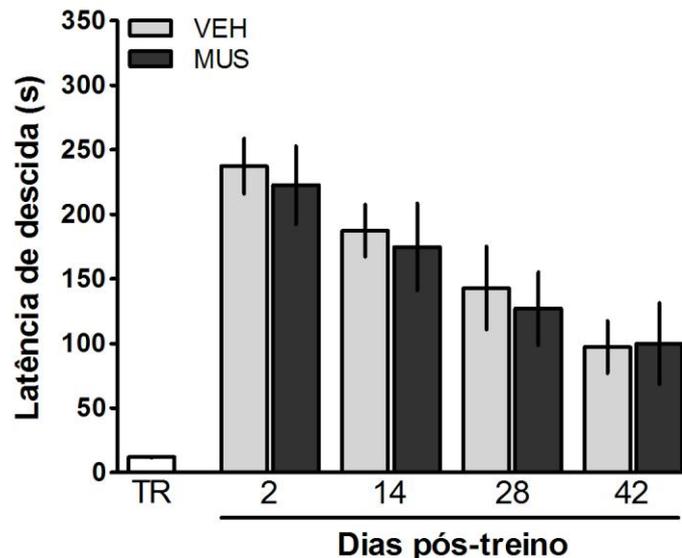


Figura 9 A expressão da memória aversiva não requer a participação do RETRO. Animais foram treinados na tarefa de EI e divididos em 4 distintos grupos que foram testados 2, 14, 28 ou 42 dias mais tarde. Quinze minutos antes do teste estes animais receberam infusão bilateral no RETRO de veículo (VEH; solução salina 0,9 %) ou muscimol (MUS – 0,1 µg/µl; 1 µl/lado). As barras representam média ± erro padrão das latências de descida durante o treino (TR) e durante os testes de retenção realizados 2, 14, 28 ou 42 dias pós-treino. Foram utilizados 12 animais por grupo.

4.4 A infusão intra-córtex pré-frontal medial de MUS 15 minutos antes do teste na tarefa da esQUIVA inibitória impede a expressão da memória aversiva.

Nos últimos anos, ocorreram mudanças na tentativa de identificar as regiões extrahipocampais que mantêm as memórias de longa duração e o CPFm tem sido implicado diretamente. O hipocampo e o CPFm estão funcionalmente inter-relacionados em atividades arroladas à consolidação de memórias (Jay e Witter, 1991; Siapas e Wilson, 1998; Sutherland e McNaughton, 2000; Siapas *et al.*, 2005). Devido a isso, após termos verificado que o MUS impede a expressão da memória aversiva quando infundido no hipocampo antes do teste de 2 e 14 dias e no ENTO

antes dos testes de 2, 14 e 28 dias e, não havendo encontrado nenhuma inibição no RETRO, decidimos investigar se a inibição do CPFm interfere na expressão da memória aversiva. Para isso, treinamos animais como descrito na metodologia e dividimos estes animais em 4 grupos diferentes, que foram testados 2, 14, 28 e 42 dias após o treino. Quinze minutos antes do teste os animais receberam infusão bilateral de veículo (VEH) ou MUS (1,0 $\mu\text{l/lado}$ – 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), um agonista dos receptores gabaérgicos, no córtex pré-frontal. Como se pode observar na Figura 10, a administração de MUS nesta estrutura 15 min antes do teste bloqueou a expressão da memória aversiva (representada aqui pela latência de descida da plataforma) em todos os testes realizados (2, 14, 28 e 42 dias), se comparada ao respectivo grupo controle.

Além disso, podemos observar no gráfico um declínio da latência de descida da plataforma de acordo com o tempo e este decaimento é estatisticamente significativo. No entanto, no teste de 42 dias, onde a media da latência é menor, ainda podemos observar que os animais apresentam memória se comparados às latências dos animais treinados.

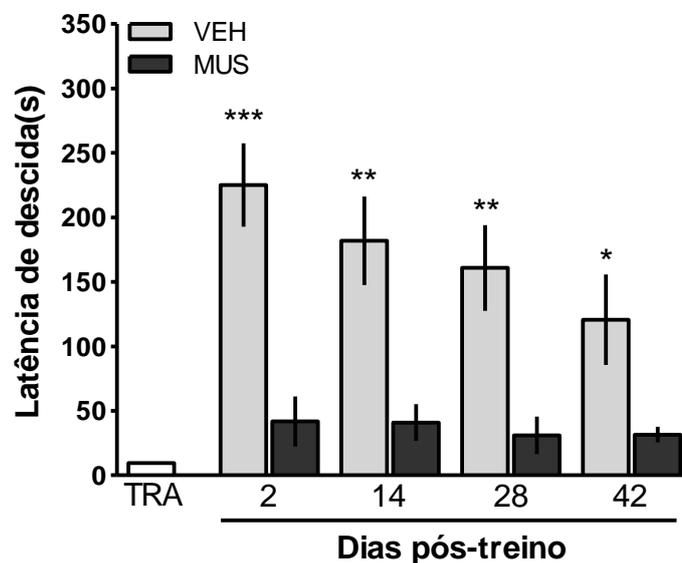


Figura 10 A expressão da memória aversiva requer a participação do CPFm 14, 28 e 42 dias após o treino. Animais foram treinados na tarefa de EI e divididos em 4 distintos grupos que foram testados 2, 14, 28 ou 42 dias mais tarde. Quinze minutos antes do teste estes animais receberam infusão bilateral no CPFm de veículo (VEH; solução salina 0,9 %) ou muscimol (MUS – 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 1 $\mu\text{l/lado}$). As barras representam média \pm erro padrão das latências de descida durante o treino (TR) e durante os testes de retenção realizados 2, 14, 28 ou 42 dias pós-treino. Foram utilizados 12 animais por grupo.

4.5 A infusão de muscimol na região CA1 do hipocampo dorsal ou nos córtices entorrinal, retroesplênica e pré-frontal medial, 15 minutos antes do teste não afeta a atividade exploratória e locomotora ou o estado de ansiedade.

Para averiguar se a infusão intra-hipocampal e intra-córtices ENTO, RETRO e CPFm de MUS exerceria alguma ação no estado de ansiedade ou na atividade exploratória dos animais que pudesse mascarar a evocação da memória de longa duração estudada, infundimos bilateralmente VEH ou MUS e submetemos os animais à uma sessão comportamental no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado 15 min após a infusão. Como se pode observar na figura 11 A e B o MUS não alterou nem o número de cruzamentos nem o número de elevações durante uma sessão comportamental de 5 min de duração num campo aberto. Similarmente, a infusão de MUS não afetou o número de entradas totais, o número de entradas nos braços abertos nem o tempo total gasto nos braços abertos durante uma sessão de 5 min no labirinto em cruz elevado (Figura 12 A, B e C). Em conjunto estes resultados indicam que quando infundido em qualquer das estruturas estudadas 15 min antes da avaliação comportamental MUS não modifica nem a atividade motora nem o estado de ansiedade dos animais.

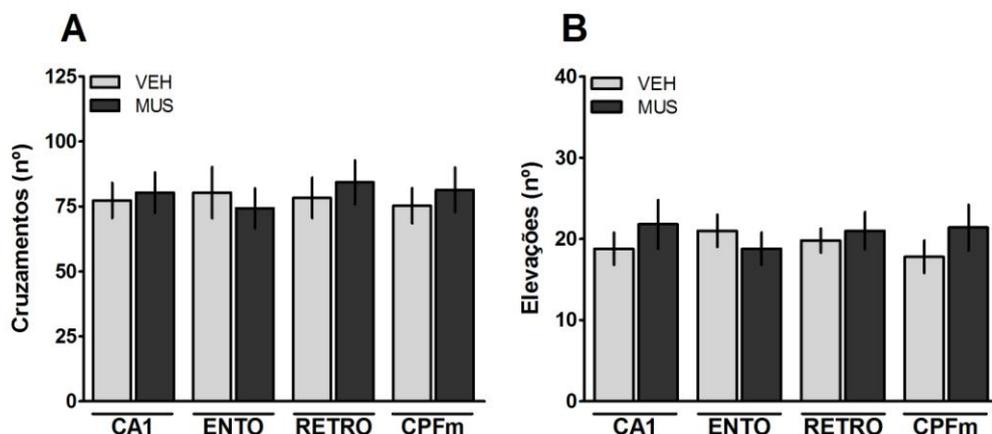


Figura 11 A infusão de muscimol 15 minutos antes de uma sessão comportamental não afeta a atividade locomotora e exploratória. Animais com cânulas estereotaxicamente implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal e nos córtices entorrinal (ENTO), retroesplênica (RETRO) e pré-frontal medial (CPFm) receberam infusões bilaterais de veículo (VEH; solução salina 0,9 %) ou muscimol (MUS – 0,1 µg/µl; 1 µl/lado) 15 min antes de uma sessão comportamental de campo aberto.

Em A as barras representam média \pm erro padrão do número de cruzamentos e em B do número de elevações contabilizados durante a sessão de teste. Foram utilizados 10 animais por grupo.

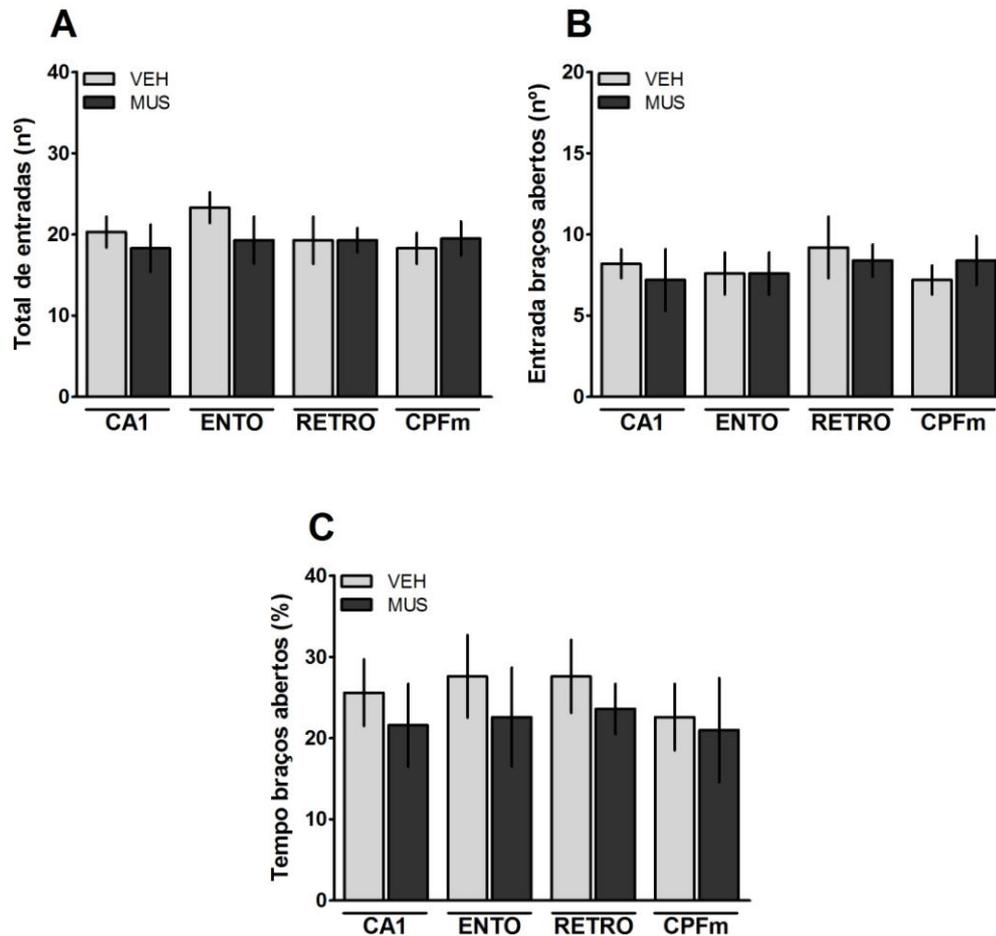


Figura 12 A infusão de muscimol 15 minutos antes de uma sessão comportamental não afeta o estado de ansiedade. Animais com cânulas estereotaxicamente implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal (CA1) e nos córtices entorrinal (ENTO), retroesplenial (RETRO) e pré-frontal medial (CPFm) receberam infusões bilaterais de veículo (VEH; solução salina 0,9 %) ou muscimol (MUS – 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 1 $\mu\text{l}/\text{lado}$) 15 min antes de uma sessão comportamental de labirinto em cruz elevado. Em A as barras representam média \pm erro padrão do número total de entradas nos braços abertos e fechados, em B do número de entradas nos braços abertos e em C da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. Foram utilizados 10 animais por grupo.

Estes resultados complementares também estão expressos sob a forma de tabela (Tabela 3).

Tabela 3 A infusão de muscimol na região CA1 do hipocampo dorsal ou nos córtices entorrinal, retrosplenial e pré-frontal medial, 15 minutos antes do teste não afeta a atividade exploratória e locomotora ou o estado de ansiedade.

	CA1		ENTO		RETRO		CPFm	
	VEH	MUS	VEH	MUS	VEH	MUS	VEH	MUS
Total de entradas	20.3 ± 1.9	18.3 ± 2.9	23.3 ± 2.9	19.3 ± 1.9	19.3 ± 2.9	19.3 ± 1.5	18.3 ± 1.9	19.5 ± 2.1
Entrada nos braços abertos	8.2 ± 0.9	7.2 ± 1.9	8.2 ± 1.3	7.6 ± 1.3	9.2 ± 1.9	7.4 ± 1.0	7.2 ± 0.9	9.4 ± 1.5
% Tempo nos braços abertos	25.6 ± 4.1	21.6 ± 5.1	27.6 ± 5.1	22.6 ± 6.1	24.6 ± 4.5	23.6 ± 3.1	22.6 ± 4.1	21.0 ± 6.4
Cruzamentos	77.3 ± 6.8	80.3 ± 7.8	80.3 ± 9.9	74.3 ± 7.7	78.3 ± 7.8	84.3 ± 8.5	75.3 ± 6.8	81.4 ± 8.6
Elevações	18.8 ± 2.0	21.8 ± 3.0	21.0 ± 2.0	16.8 ± 2.0	19.8 ± 1.5	21.0 ± 2.3	17.8 ± 2.0	21.4 ± 2.8

Muscimol (MUS – 0,1 µg/µl; 1 µl/lado) foi infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (CA1), nos córtices entorrinal (ENTO), retrosplenial (RETRO) e pré-frontal medial (CPFm), 15 min antes de uma sessão comportamental de Campo Aberto ou Labirinto em Cruz Elevado. Os dados estão expressos como média (± erro padrão) do número total de entradas, número de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos (Labirinto em Cruz Elevado; n= 10 por grupo) e número de total de cruzamentos e elevações (Campo Aberto; n= 10 por grupo). VEH = veículo. Um grupo distinto de animais foi utilizado para cada paradigma comportamental.

5 DISCUSSÃO

O medo é considerado um mecanismo defensivo que representa uma adaptação evolutiva em proteger-se do perigo. Enquanto que alguns tipos de medo são inatos (como por exemplo, barulhos altos evocam medo em crianças recém nascidas), outros tipos se caracterizam por ser rapidamente adquiridos e permanecer por muito tempo. Entre estes está o medo a diferentes estímulos, o que permite que os animais possam responder adaptivamente às mudanças ambientais. Em situações experimentais, o condicionamento clássico pavloviano e suas variações como, por exemplo, a tarefa da esquiva inibitória (EI), tornou-se uma excelente escolha para o estudo das bases moleculares, celulares e anatômicas da formação e retenção das memórias.

A teoria da consolidação da memória sugere que as memórias sejam gradualmente re-organizadas assim como as regiões cerebrais responsáveis pelo seu armazenamento e evocação (Marr, 1971; McClelland *et al.*, 1995; Squire e Alvarez, 1995). Esta teoria diz que o traço mnemônico não é definitivamente fixado ao mesmo tempo em que é codificado, mas passa por um processo gradual de estabilização e consolidação (Dudai, 2004; Squire *et al.*, 2004).

Como colocado anteriormente, o processo de armazenamento da memória depende de uma série de eventos que evoluem com o tempo em diferentes regiões do cérebro (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2006). Sendo que, a formação da memória de longa duração, necessita destes eventos – processos metabólicos – que ocorrem no hipocampo (Izquierdo *et al.*, 1998a), assim como em outras regiões como o ENTO e o CPFm (Izquierdo *et al.*, 1998b).

Acredita-se que memórias recentes sejam inicialmente dependentes de modificações nas conexões sinápticas hipocampais (Squire e Alvarez, 1995; Squire *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2004; Frankland e Bontempi, 2005; Squire e Bayley, 2007). Sua armazenagem nesta região cerebral é, no entanto, limitada pelo tempo, já que danos ao lobo temporal, que inclui o hipocampo, interrompem a evocação de memórias recentes deixando as memórias remotas inalteradas (Zola-Morgan e Squire, 1990; Kim e Fanselow, 1992; Martin e Clark, 2007; Squire e Bayley, 2007).

Consistente com os dados relatados acima, os experimentos apresentados nesta dissertação oferecem evidências diretas de que mudanças dependentes do

tempo ocorrem no hipocampo e em regiões corticais durante formação de memórias recentes e remotas, uma vez que a inibição da região CA1 do hipocampo dorsal 15 minutos antes do teste, só foi capaz de bloquear a expressão do traço de 2 e 14 dias.

O hipocampo parece estar transientemente envolvido na armazenagem de memórias de medo (Phillips e LeDoux, 1992). Mais ainda, dados demonstraram que o ENTO, que é reciprocamente conectado ao hipocampo, pode estar envolvido, assim como o próprio hipocampo na consolidação e evocação das memórias recentes. Estudos relatam que lesões no córtex perirrinal, que é intimamente ligado ao ENTO, produzem déficits 1, mas não 28 dias após o treino (Bucci *et al.*, 2000).

Nossos resultados mostram que o ENTO participa da reativação da memória recente assim como da memória remota, sendo uma estrutura necessária para que os animais possam evocar a memória aversiva. Os grupos dos diferentes dias de teste que receberam a infusão do MUS 15 minutos antes do teste, não conseguiram ativar o aprendizado nos dias 2, 14 e 28 dias, o que confirma achados anteriores sobre a participação desta região da consolidação e evocação das memórias.

Acredita-se que o hipocampo interage com regiões neocorticais, onde as conexões cortico-corticais se desenvolvem progressivamente e, direcionam a estocagem e a lembrança das memórias remotas.

O CPFm desempenha um papel crítico no comportamento que requer um alto nível de integração mental devido ao fato de regular a preferência (Dias *et al.*, 1996), representação, (Fuster e Alexander, 1971), monitoramento (Everling *et al.*, 2002), e interpretação (Dolan e Fletcher, 1997; Schoenbaum *et al.*, 1998) dos estímulos multimodais.

Além disso, o CPFm participa na associação de eventos separados temporalmente (Fuster *et al.*, 2000). Danos a esta estrutura representam inabilidade em selecionar, manter e associar estímulos desconectados temporalmente (Harlow, 1948; Dias *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1997). Embora estas disfunções sejam relacionadas à inabilidade de aprender, elas também podem resultar de uma deficiência na armazenagem realizada pelo CPFm. Apesar de inúmeros estudos demonstrarem a participação do CPF na formação da memória, ainda não está clara a sua participação no armazenamento desta informação (Kronforst-Collins e Disterhoft, 1998; McLaughlin *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados aqui demonstram que a armazenagem da memória de longa duração ocorre no CPFm, mais ou menos, ao mesmo tempo em que ocorre no hipocampo, mais ainda, nossos experimentos evidenciam que a armazenagem das memórias de longa duração tem início no hipocampo e depois são transferidas para distintas regiões corticais, entre elas o ENTO e o CPFm. O CPFm desempenha ainda a importante função de participar do processamento mnemônico tanto das memórias remotas quanto das recentes. Isto pode ser explicado pelo princípio central da teoria da consolidação que diz que o recrutamento das redes corticais no armazenamento das memórias remotas requer ativação inicial dos circuitos hipocampo-CPFm. De acordo com este ponto de vista, lesões hipocámpais realizadas logo após o condicionamento podem prevenir o aumento de espinhos dendríticos no CCA e prejudicar a memória remota. Estudos testaram diretamente esta predição lesionando o hipocampo após o aprendizado e analisando a morfologia cortical 36 dias mais tarde. Os resultados demonstraram que não somente a memória remota foi prejudicada como esperado, mas que estas lesões impediram o crescimento dos espinhos dendríticos no CCA que se mostram presentes na memória remota (Frankland *et al.*, 2004).

Estes e outros resultados em conjunto, mostram que a formação e a expressão de memórias perduráveis envolvem plasticidade estrutural no CCA e requer a integridade hipocámpal somente nos estágios iniciais da formação da memória. No entanto, como o hipocampo atua para ativar o que é relevante e enviar às regiões corticais é ainda uma questão a ser respondida. Distintos estudos sugerem a existência de um papel central das conexões hipocampo-córtices na consolidação da memória. Interações entre o hipocampo e o córtex seguidas do aprendizado direcionam as memórias a um gradual estabelecimento de memórias perduráveis distribuídas em redes corticais independentes do hipocampo.

Coletivamente, nossos dados mostram que ocorre um remodelamento dentro dos circuitos hipocampo-corticais durante a consolidação da memória aversiva. No entanto, vários aspectos desta reorganização estrutural necessitam ser clarificados, como por exemplo: quais os mecanismos que controlam o desacoplamento do hipocampo na armazenagem e evocação das memórias com o passar do tempo; uma vez estabelecidas no córtex, às memórias consolidadas permanecem na sua forma original e retém sua precisão?

As pesquisas que objetivam a identificação das estruturas corticais que estão envolvidas na representação das memórias de longa duração estão nos estágios iniciais. No entanto, as evidências disponíveis, somadas aos resultados aqui apresentados, sugerem que o CPFm e o ENTO, estão entre os envolvidos.

Nossos dados mostram que o processamento da memória aversiva envolve a associação de múltiplas regiões corticais, o que é consistente com a proposta de que memórias duradouras são armazenadas nestas mesmas regiões. A ativação cortical é muito maior após testes de memória remota do que memória recente. Acredita-se que durante o processo de codificação da memória, o CCA desempenhe um papel integrativo em controlar diversos processos cognitivos como atenção, variabilidade e supervisão. Contudo, ainda não sabemos onde é o local do armazenamento da memória e se este local medeia processos análogos responsáveis por integrar múltiplas representações em que estão baseadas as memórias remotas.

Assim, os resultados nos levam a supor que as estruturas investigadas apresentam participação na expressão do traço mnemônico aversivo, com exceção do RETRO, conforme demonstrado na figura 9 do item resultados. As regiões do ENTO e CPFm apresentam uma participação paralela ao hipocampo na armazenagem da memória, sendo que o CPFm envia e recebe conexões durante todo o processo de armazenamento com o hipocampo e o ENTO. O que nossos dados demonstram, são os percursos seguidos pela memória ao longo dos dias de teste, o que nos permite concluir que o processamento da memória aversiva, a memória escolhida para a nossa pesquisa, envolve a associação de múltiplas estruturas, assim como as memórias de longa duração, porém não possuímos dados suficientes para dizer qual seria o local responsável por integrar as múltiplas representações em que estão baseadas as memórias remotas. O hipocampo apresenta um envolvimento transitório no armazenamento da memória aversiva, sendo que nossos resultados confirmam que ele participa inicialmente e posteriormente transfere as informações para regiões corticais independentes dele, fase que a memória pode ser considerada remota, já o ENTO, que é reciprocamente conectado ao hipocampo, pode estar envolvido, assim como o próprio hipocampo na consolidação e evocação das memórias recentes. Quanto ao CPFm, nossos resultados demonstram que a armazenagem da memória de longa duração ocorre no CPFm, mais ou menos, ao mesmo tempo em que ocorre no hipocampo, mais

ainda, nossos experimentos evidenciam que a armazenagem das memórias de longa duração tem início no hipocampo e depois é transferida para distintas regiões corticais, entre elas o ENTO e o CPFm. O CPFm desempenha ainda a importante função de participar do processamento mnemônico tanto das memórias remotas quanto das recentes.

6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

A expressão da memória aversiva requer a participação da região CA1 do hipocampo dorsal 2 e 14 dias após o treino.

A expressão da memória aversiva requer a participação do ENTO 2, 14 e 28 dias após o treino.

A expressão da memória aversiva não requer a participação do RETRO.

A expressão da memória aversiva requer a participação do CPFm 2, 14, 28 e 42 dias após o treino.

REFERÊNCIAS

- ALBRIGHT, T.D.; KANDEL, E.R.; POSNER, M.I. Cognitive neuroscience. **Curr Opin Neurobiol.**, 10(5):612-24, 2000.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. **J Neurosci.**, 19(3):1106-14, 1999.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neuroscience: Exploring the brain**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1995.
- BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L.M.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**. 53(2):261-77, 2007.
- BEVILAQUA L, ARDENGHI P, SCHRÖDER N, BROMBERG E, QUEVEDO J, SCHMITZ PK, BIANCHIN M, WALZ R, SCHAEFFER E, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Agents that affect AMPc levels or protein kinase A activity modulate memory consolidation when injected into rat hippocampus but not amygdala. **Braz J Med Biol Res.**;30:967-70, 1997.
- BONTEMPI, B.; LAURENT-DEMIR, C.; DESTRADE, C.; JAFFARD, R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. **Nature**. 12;400(6745):671-5, 1999.
- BUCCI, D.J.; PHILLIPS, R.G.; BURWELL, R.D.; Contributions of postrhinal and perirhinal cortex to contextual information processing. **Behav Neurosci.**, 114(5):882-94, 2000.
- CLARK, R.E.; BROADBENT, N.J.; ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R. Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. **J Neurosci.**, 22(11):4663-9, 2002.
- DIAS, R.; ROBBINS, T.W.; ROBERTS, A.C. Dissociable forms of inhibitory control within prefrontal cortex with an analog of the Wisconsin Card Sort Test: restriction to novel situations and independence from "on-line" processing. **J Neurosci.**, 17(23):9285-97, 1997.
- DIAS, R.; ROBBINS, T.W.; ROBERTS, A.C. Dissociation in prefrontal cortex of affective and attentional shifts. **Nature.**, 380(6569):69-72, 1996.
- DOLAN, R.J.; FLETCHER, P.C. Dissociating prefrontal and hippocampal function in episodic memory encoding. **Nature.**, 388(6642):582-5, 1997
- DUDAI, Y. **The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends**. Oxford University Press, Oxford, UK, 1989.

EVERLING, S.; TINSLEY, C.J.; GAFFAN, D.; DUNCAN, J. Filtering of neural signals by focused attention in the monkey prefrontal cortex. **Nat Neurosci.**, 5(7):671-6, 2002.

FRANKLAND, P.W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nat Rev Neurosci.**, 6(2):119-30, 2005.

FRANKLAND, P.W.; BONTEMPI, B.; TALTON, L.E.; KACZMAREK, L.; SILVA, A.J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science.**, 304(5672):881-3, 2004.

FUSTER, J.M.; ALEXANDER, G.E. Neuron activity related to short-term memory. **Science.**, 173(997):652-4, 1971.

FUSTER, J.M.; BODNER, M.; KROGER, J.K. Cross-modal and cross-temporal association in neurons of frontal cortex. **Nature.**, 405(6784):347-51, 2000.

GEINISMAN, Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. **Cereb Cortex.**, 10(10):952-62, 2000.

HARLOW, J.M. Passage of an iron rod through the head. 1848. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.**, 11(2):281-3, 1999.

HEDBERG, T.G.; STANTON, P.K. Long term potentiation and depression of synaptic transmission in rat posterior cingulate cortex. **Brain Research**, 670, 181-196, 1995.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M.K.; MADRUGA, M.; MEDINA, J.H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behav Pharmacol.**, 9:421-7, 1998b.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; MELLO E SOUZA, T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. **Neurobiol Learn Mem.** 69:219-24, 1998a.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. The biochemistry of memory and its regulation by modulatory systems. **Psychobiology**, v. 25, p. 1-9, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem.**, 68:285-316, 1997.

IZQUIERDO, I. **A arte de esquecer.** Vieira & Lent, Rio de Janeiro, 2004.

IZQUIERDO, I. **Memória.** Artmed, Porto Alegre, 2002.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.; ROSSATO, J.; BONNINI, J.; MEDINA, J.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain are in charge of memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 496-505, 2006.

JAY, T.M.; WITTER, M.P. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **J Comp Neurol.**, 313(4):574-86, 1991.

KIM, J.J.; CLARK, R.E.; THOMPSON, R.F. Hippocampectomy impairs the memory of recently, but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. **Behav Neurosci.**,109(2):195-203, 1995.

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science.**, 256(5057):675-7,1992.

KNAFO, S.; ARIAV, G.; BARKAI, E.; LIBERSAT, F. Olfactory learning-induced increase in spine density along the apical dendrites of CA1 hippocampal neurons. **Hippocampus**, 14(7):819-25, 2004.

KNOWLTON, B.J.; FANSELOW, M.S. The hippocampus, consolidation and on-line memory. **Curr Opin Neurobiol.**,8(2):293-6, 1998.

KRONFORST-COLLINS, M.A.; DISTERHOFT, J.F. Lesions of the caudal area of rabbit medial prefrontal cortex impair trace eyeblink conditioning. **Neurobiol Learn Mem.**,69(2):147-62, 1998.

LEES, G.V.; JONES, E.G.; KANDEL, E. Expressive genes record memories. **Neurobiol Dis.**, 7(5):533-6, 2000.

LEUNER, B.; FALDUTO, J.; SHORS, T.J. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. **J Neurosci.**, 15;23(2):659-65, 2003.

MARR, D. **Simple memory: a theory for archicortex.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 262(841):23-81, 1971.

MARTIN, J.H. **Neuroanatomy: Text and Atlas** (2nd ed., p475), Stamford: Appleton & Lange, 1996.

MAVIEL, T.; DURKIN, T.P.; MENZAGHI, F.; BONTEMPI, B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. **Science**, 305(5680):96-9, 2004.

MCCLELLAND, J.L.; MCNAUGHTON, B.L.; O'REILLY, R.C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. **Psychol Rev.**,102(3):419-57, 1995.

MCGAUGH, J.L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci.**, 21(6):208-10, 2000.

MCGAUGH, J.L. Memory – A century of consolidation. **Science**, 2000.

MCLAUGHLIN, J.; SKAGGS, H.; CHURCHWELL, J.; POWELL, D.A. Medial prefrontal cortex and pavlovian conditioning: trace versus delay conditioning. **Behav Neurosci.**, 116(1):37-47, 2002.

MORRIS, R.G.; FREY, U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**,352(1360):1489-503, 1997.

MUIR, G.M.; BILKEY, D.K. Instability in the place field location of hippocampal place cells after lesions centered on the perirhinal cortex. **J Neurosci.**;21:4016-25, 2001.

PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci.**,106(2):274-85, 1992.

RESTIVO, L.; ROMAN, F.S.; AMMASSARI-TEULE, M.; MARCHETTI, E. Simultaneous olfactory discrimination elicits a strain-specific increase in dendritic spines in the hippocampus of inbred mice. **Hippocampus**, 16(5):472-9, 2006.

ROSENBAUM, R.S.; PRISELAC, S.; KÖHLER, S.; BLACK, S.E.; GAO, F.; NADEL, L.; MOSCOVITCH, M. Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. **Nat Neurosci.**, 3(10):1044-8, 2000.

ROUTTENBERG, A.; CANTALLOPS, I.; ZAFFUTO, S.; SERRANO, P.; NAMGUNG, U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 97(13):7657-62, 2000.

RUSAKOV, D.A.; DAVIES, H.A.; HARRISON, E.; DIANA, G.; RICHTER-LEVIN, G.; BLISS, T.V.; STEWART, M.G. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. **Neuroscience**. 80:69-77, 1997.

SCHOENBAUM, G.; CHIBA, A.A.; GALLAGHER, M. Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. **Nat Neurosci.**, 1(2):155-9, 1998.

SCOVILLE, W.B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, 20(1):11-21, 1957.

SIAPAS, A.G.; LUBENOV, E.V.; WILSON, M.A. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. **Neuron.**, 46(1):141-51, 2005.

SIAPAS, A.G.; WILSON, M.A. Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. **Neuron.**, 21(5):1123-8, 1998.

SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychol Rev.**, 99(2):195-231, 1992.

SQUIRE, L.R.; ALVAREZ, P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. **Curr Opin Neurobiol.**, 5(2):169-77, 1995.

SQUIRE, L.R.; BAYLEY, P.J. The neuroscience of remote memory. **Curr Opin Neurobiol.**, 17(2):185-96, 2007.

SQUIRE, L.R.; STARK, C.E.; CLARK, R.E. The medial temporal lobe. **Annu Rev Neurosci.**; 27:279-306, 2004.

SQUIRE, L.R.; WIXTED, J.T.; CLARK, R.E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nat Rev Neurosci.**, 8(11):872-83, 2007.

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

SUTHERLAND, G.R.; MCNAUGHTON, B. Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. **Curr Opin Neurobiol.**,10(2):180-6, 2000.

TAKEHARA, K.; KAWAHARA, S.; TAKATSUKI, K.; KIRINO, Y. Time-limited role of the hippocampus in the memory for trace eyeblink conditioning in mice. **Brain Res.**, 951(2):183-90, 2002.

TENG, E.; SQUIRE, L.R. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. **Nature**, 400(6745):675-7, 1999.

VANN, S.D.; AGGLETON, J.P.; MAGUIRE, E.A. What does the retrosplenial cortex do? **Nat Rev Neurosci.**,10(11):792-802, 2009.

WITGEN, B.M.; LIFSHITZ, J.; SMITH, M.L.; SCHWARZBACH, E.; LIANG, S.L.; GRADY, M.S.; COHEN, A.S. Regional hippocampal alteration associated with cognitive deficit following experimental brain injury: a systems, network and cellular evaluation. **Neuroscience**,133(1):1-15, 2005.

WOOLF, N.J. A structural basis for memory storage in mammals.**Prog Neurobiol.**;55(1):59-77. 1998.

ZILLES, K.; WREE, A. **Córtex: Areal and laminar structure**. In G. Paxinos, (Ed), The rat nervous system. San Diego: Academic Press, 1995

ZOLA-MORGAN, S.M.; SQUIRE, L.R. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. **Science.**, 250(4978):288-90, 1990.