

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

**PARTICIPAÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA HIPOCAMPAL NOS  
MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PERSISTÊNCIA DO TRAÇO  
MNEMÔNICO APÓS SUA REATIVAÇÃO**

Tese de Doutorado

JANINE INEZ ROSSATO

Orientador

Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota

Porto Alegre, 2006

“Somos exatamente a soma daquilo que nos recordamos e também  
daquilo que não queremos lembrar”

Iván Izquierdo

## **Agradecimentos**

---

A minha escolha pela bioquímica aconteceu já na faculdade, apesar de não trabalhar no assunto, gostei desde o princípio. Mas minha vinda para este programa de pós-graduação foi influenciada pelo professor **Iván Izquierdo**, hoje nosso Mestre, que sem saber de nada, fez com que meus planos se dirigissem para Porto Alegre. Obrigada por ter me recebido de braços abertos no Centro de Memória e por contribuir e ajudar sempre no meu aprendizado, teu conhecimento científico e de mundo é incomparável!!

Ao **Martín**, por todo o empenho e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por ter me mostrado o verdadeiro sentido de se fazer ciência, pela paciência infinita nas conversas e conselhos, enfim um grande amigo e orientador. Muchas gracias Martín! Este trabalho reflete a tua presença no Centro de Memória!! Cuidando sempre do bem estar e do andamento de tudo e todos no laboratório. Tenho tanto a te agradecer, que talvez simples palavras não sejam o suficiente!

À **Lia** pelo entusiasmo e coragem de seguir em frente e nos mostrar sempre o caminho, obrigada por toda a ajuda e amizade. Obrigada pela tua presença e de tua família na minha vida!

A maravilhosa pessoa que é a **Ju** na minha vida, tenho tanto a agradecer a ti, a amizade, o carinho, a dedicação, a ajuda sempre que necessária; essas palavras não bastam para exprimir o tanto que eu tenho a te

agradecer, mas o eu vai dentro do coração é este imenso sentimento por ti!

A minha amiga **Elisa**, agradeço ter te conhecido e ser tua aminha até hoje e espero que sempre seja assim, que eu possa contar contigo assim como tu podes contar comigo sempre!!! Te adoro muito!!!!

Obrigada por ter colocado na minha vida outra pessoa maravilhosa que é a **Vanessinha**, que eu tenho um imenso carinho e que eu posso contar sempre!!!! Minha amiga querida de todas as horas!!!

Tenho muito a agradecer a tantas pessoas com quem iniciei meu trabalho em Porto Alegre, a **Grace** é uma dessas pessoas, um exemplo de vida fantástico, sempre pronta pra enfrentar as dificuldades, encara tudo de frente, simplesmente maravilhosa!

À **Tati** pela alegria de viver, pela felicidade constante, pelos conselhos, muito obrigada!

À **Jociane**, que nestes últimos tempos me ajudou muito na realização deste trabalho!

Ao pessoal do Centro de Memória, grandes amigos e que também merecem um agradecimento especial, participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho e da minha vida, por isso agradeço a eles: **Weber, Cristiano, Júlia, Cristiane, Ana Flávia, Cássio, Clarice pequena, Clarice, Thais, Geléia, Siomara, Fernando, Ramón, Pamela, Milene, Marta, Carolzinha**. Em algum momento, no início, ou mais para o final participaram ativamente da minha vida, agradeço pela

amizade, companhia, força e ajuda sem as quais a realização deste trabalho teria sido impossível ou pelo menos muito difícil. Tenho tanto a agradecer que as palavras fogem.

Ao pessoal do NeuroLab, agradeço por tudo, pelo apoio e ajuda no início deste novo período de vida.

Aos amigos de fora do laboratório, **Cristina, Luciana, Alexania, Taisa, Carol, Gio, Andréa, Adriana, Rossana** pela paciência, conversas de incentivo e força para continuar, por terem participado da minha vida neste período tão importante, espero que estejam sempre por perto mesmo que só em pensamento!

Ao **Sérgio**, por tudo o que me ensinaste no período que passamos juntos!

À **minha família**, por terem me apoiado sempre em minhas decisões e por acreditarem que é possível crescer e buscar sempre mais conhecimento, principalmente lutar e correr atrás do que se quer!

Ao departamento de Bioquímica pela oportunidade de ingressar neste curso de pós-graduação.

Aos professores do departamento, muito obrigada.

Aos funcionários do departamento pelo desprendimento em ajudar sempre que possível, principalmente a **Cléia e ao Valeri e sua equipe**.

Aos funcionários do IPB da PUCRS pela disponibilidade de ajudar sempre.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq pelo fornecimento da bolsa, permitindo a dedicação e execução deste trabalho.

## Sumário

---

Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vi
Resumo.....	vi
Abstract.....	vi
Parte I.....	1
I. Introdução.....	2
II. Objetivos.....	13
II.1 - Objetivo Geral.....	13
II.2 - Objetivos Específicos.....	13
Parte II.....	15
I. Metodologia.....	16
I.1 - Animais Experimentais.....	16
I.2 - Cirurgia Estereotáxica.....	16
I.3 - Manipulação.....	17
I.4 - Labirinto Aquático de Morris - LAM.....	18
I.4.1 - Aprendizado espacial no LAM.....	20
I.4.2 - Aprendizado não espacial no LAM.....	21
I.4.3 - Aprendizado Reverso.....	22
I.4.4 - Extinção da memória espacial associada ao LAM.....	23
I.4.5 - Reativação da memória espacial associada ao LAM.....	23
I.5 - Paradigma de reconhecimento de objetos.....	24
I.5.1 - Treino no paradigma de reconhecimento de objetos.....	25
I.5.2 - Protocolo de reativação da memória de reconhecimento.....	25
I.5.3 - Protocolo de atualização da memória de reconhecimento.....	26
I.6 - Esquiva Inibitória.....	27

I.7 - Campo Aberto.....	29
I.8 - Labirinto em Cruz Elevado.....	30
I.9 - Tratamentos farmacológicos.....	31
I.10 - Controle histológico da região estudada.....	32
I.11 - Análise estatística dos dados.....	33
II. Resultados.....	34
II.1 - A infusão intra-hipocampal de ANI após o treino no labirinto aquático de Morris bloqueia a consolidação da memória espacial.....	34
II.2 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina após uma única sessão de evocação não reforçada no labirinto aquático de Morris bloqueia a retenção da memória espacial.....	37
II.3 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina após uma série de testes consecutivos de evocação sem reforço, não afeta a extinção, mas bloqueia a recuperação espontânea da memória espacial no LAM.....	41
II.4 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina após o aprendizado reverso no LAM bloqueia tanto a retenção da preferência espacial reversa como da original.....	44
II.5 - A administração i.p. de D-cicloserina após uma sessão de evocação não reforçada no labirinto aquático de Morris melhora a retenção da memória espacial.....	47
II.6 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina bloqueia a memória de longa duração para o reconhecimento de objetos, mas não afeta a memória de curta duração.....	52
II.7 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina 24 horas antes do treino não altera o estado de ansiedade, a atividade exploratória e nem a formação de memórias dependentes do hipocampo.....	55

II.8 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina não afeta a retenção da memória para o reconhecimento de objetos quando a sessão de reativação é igual a de treino.....	58
II.9 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina bloqueia a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos quando a fase de reativação apresenta um componente de novidade.....	64
Parte III.....	71
I. Discussão.....	72
II. Conclusões.....	92
Parte IV.....	95
I. Referências.....	96



***Lista de Abreviaturas***

---

LAM - Labirinto aquático de Morris

PT - Teste na ausência da plataforma de escape

RT - Teste na presença da plataforma de escape

ANI - Anisomicina

VEH - Veículo

cSER - D-cicloserina

L - Largada

EI - Esquiva inibitória

FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

ORI - Quadrante Original

REV - Quadrante Reverso

NaOH - Hidróxido de sódio

QA - Quadrante Alvo

NMDA - N-metil-D-aspartato

INF - Infusão

STM - Memória de Curta Duração

LTM - Memória de Longa Duração

ERKs - Proteínas cinases reguladas por fatores extracelulares

MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógenos

TR - Treino

PKA - Proteína Cinase dependente de AMPc

**Lista de Figuras**

---

Figura 1. Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.....	16
Figura 2. Fotos do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do aparelho estereotáxico.....	17
Figura 3. Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.....	20
Figura 4. Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM.....	21
Figura 5. Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de reconhecimento de objetos.....	25
Figura 6. Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória. Note-se o animal sobre a plataforma.....	28
Figura 7. Fotografia de um rato explorando o campo aberto. Observe-se o comportamento de elevação sobre as patas traseiras (“rearing”).....	29
Figura 8. Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.....	30

Figura 9: Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão é introduzida na luz da cânula guia, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco seja infundido.....	32
Figura 10. A síntese protéica é requerida no hipocampo dorsal durante um breve período pós-treino para a consolidação da memória espacial no LAM.....	35
Figura 11. A inibição da síntese protéica hipocampal imediatamente após uma sessão de evocação não reforçada prejudica a perdurabilidade da memória espacial.....	38
Figura 12. A inibição da síntese protéica hipocampal 3 e 6 horas após uma sessão de evocação não reforçada não afeta a retenção da memória espacial.....	41
Figura 13. A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a extinção, mas bloqueia a recuperação espontânea da memória espacial.....	43
Figura 14. A inibição de síntese protéica hipocampal bloqueia o aprendizado reverso e impede a reinstalação da memória original.....	46
Figura 15. A D-cicloserina melhora a retenção da memória espacial quando administrada i.p. após um teste na ausência de plataforma de escape.....	49

Figura 16. A D-cicloserina melhora a retenção da memória espacial quando dada na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape.....	51
Figura 17. A síntese protéica hipocampal é requerida durante uma restrita janela de tempo após o treino para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.....	53
Figura 18. A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a memória de reconhecimento de curta duração.....	55
Figura 19. A inibição da síntese protéica hipocampal 24 horas antes do treino não afeta a aquisição nem a retenção de memórias dependentes do hipocampo.....	57
Figura 20. A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a objetos familiares não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento.....	60
Figura 21. A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação breve envolvendo exposição a objetos familiares não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento.....	62
Figura 22. A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a objetos familiares realizada cinco dias após o treino não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento.....	63

- Figura 23. A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a um objeto novo e um familiar prejudica a memória desses objetos sem afetar a memória de outro objeto familiar não apresentado durante a sessão de reativação..... 66
- Figura 24. O tempo transcorrido entre a sessão de reativação e a sessão de teste não tem efeito sobre a amnésia causada pela infusão de ANI na região CA1 do hipocampo após a reativação do traço mnemônico..... 67
- Figura 25. A inibição da síntese protéica hipocampal 24 horas após o treino na ausência de eventos comportamentalmente relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos..... 69
- Figura 24. A inibição da síntese protéica hipocampal após exposição ao contexto da caixa de treino ou uma sessão de pseudoreativação envolvendo exposição a dois objetos novos não afeta a memória de reconhecimento original..... 70

***Lista de Tabelas***

---

Tabela 1. Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram.....	4
Tabela 2. Classificação das memórias de longa duração de acordo com seu conteúdo.....	5
Tabela 3. A infusão de anisomicina na região CA1 do hipocampo dorsal não afeta a atividade exploratória e locomotora ou o estado de ansiedade.....	56

## **Resumo**

---

Após a evocação as memórias já consolidadas tornam-se novamente vulneráveis à ação de inibidores de síntese protéica. Isto leva a hipótese de que as memórias são reconsolidadas após sua evocação, e que este processo depende de síntese protéica. Muitas evidências indicam que o hipocampo tem um papel chave na consolidação e na reconsolidação de diferentes memórias. A evocação não reforçada pode causar extinção e/ou reconsolidação, dois processos que afetam a retenção da memória em vias opostas. Usando a tarefa do labirinto aquático de Morris nós demonstramos que a anisomicina, um inibidor de síntese protéica, infundida na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, mas não 3 e 6 horas após o treino prejudica a consolidação da memória espacial associada ao LAM. Além disso, demonstramos que a expressão repetida e não reforçada da memória espacial causa extinção que não é afetada pela inibição de síntese protéica na região CA1. No entanto, se o número de testes de evocação não reforçados é insuficiente para induzir extinção, ocorre o processo de reconsolidação dependente de síntese protéica hipocampal que recupera a memória original. A inibição da síntese protéica hipocampal após o aprendizado reverso prejudica a retenção da preferência espacial reversa e bloqueia a persistência da memória inicial, sugerindo que o aprendizado reverso envolve antes reconsolidação do que extinção do traço original. Além disso, a D-cicloserina, um parcial agonista do sítio da glicina no receptor NMDA, quando administrada sistemicamente ou na região CA1 após uma sessão de evocação não reforçada, melhora a retenção da memória. Nossos resultados no LAM sugerem a existência de um processo reconsolidatório dependente de síntese protéica hipocampal que opera recuperando e modernizando o traço enfraquecido pela evocação e sugere que, semelhante ao processo de consolidação, o de reconsolidação pode não ser somente bloqueado, mas melhorado por tratamentos farmacológicos apropriados. Até o presente não existem estudos a respeito das conseqüências da inibição da síntese protéica hipocampal no armazenamento e persistência pós-evocação da memória de reconhecimento de objetos. Neste trabalho nós reportamos que a infusão de anisomicina na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente ou 180 min, mas não 6 horas após o treino prejudica a consolidação da memória de reconhecimento de longa duração sem afetar a memória de curta duração, o comportamento exploratório e o estado de ansiedade ou a funcionalidade hipocampal. A anisomicina quando administrada na região CA1 após a reativação da memória na presença de objetos familiares não afeta a posterior retenção do traço mnemônico. No entanto, quando administrada na região CA1 imediatamente após a exposição dos animais a um objeto novo e um familiar, prejudica a retenção da memória de ambos os objetos. O efeito amnésico da anisomicina não ocorreu após a exposição a dois objetos novos ou a exploração ao contexto na ausência de estímulos específicos, sugerindo que é dependente da reativação do traço consolidado na presença de um comportamento relevante e saliente. Os resultados obtidos a partir da tarefa de reconhecimento de objetos indicam que o hipocampo é engajado durante a reconsolidação deste traço, talvez adicionando novas informações à memória original.

**Abstract**

---

Upon retrieval, consolidated memories are rendered again vulnerable to the action of metabolic blockers, notably protein synthesis inhibitors. This has led to the hypothesis that memories are reconsolidated at the time of retrieval, and that this depends on protein synthesis. Ample evidence indicates that the hippocampus plays a key role both in the consolidation and reconsolidation of different memories. Non-reinforced retrieval can cause extinction and/or reconsolidation, two processes that affect subsequent retrieval in opposite ways. Using the Morris water maze task we show that in the rat repeated non-reinforced expression of spatial memory causes extinction which is unaffected by inhibition of protein synthesis within the CA1 region of the dorsal hippocampus. However, if the number of non-reinforced retrieval trials is insufficient to induce long-lasting extinction, then a hippocampal protein synthesis-dependent reconsolidation process recovers the original memory. Inhibition of hippocampal protein synthesis after reversal learning sessions impairs retention of the reversed preference and blocks persistence of the original one suggesting that reversal learning involves reconsolidation rather than extinction of the original memory. In addition, when given systemically or into the CA1 region after non-reinforced retrieval, the partial NMDAR agonist D-cycloserine improves subsequent memory retention. Our results suggest the existence of a hippocampal protein synthesis dependent reconsolidation process that operates to recover or update retrieval-weakened memories from incomplete extinction and suggest that, like consolidation, reconsolidation can be not only blocked but also enhanced by appropriate pharmacological treatments. At present there are no studies about the consequences of hippocampal protein synthesis inhibition in the storage and post-retrieval persistence of object recognition memory. Here we report that infusion of the protein synthesis inhibitor anisomycin in the dorsal CA1 region immediately or 180 min but not 360 min after training impairs consolidation of long-term object recognition memory without affecting short-term memory, exploratory behavior and anxiety state, or hippocampal functionality. When given into CA1 after memory reactivation in the presence of familiar objects ANI did not affect further retention. However, when administered into CA1 immediately after exposing animals to a novel and a familiar object ANI impaired memory of both objects. The amnesic effect of ANI was long-lasting, did not happen either after exposure to two novel objects or following exploration of the context alone or in the absence of specific stimuli suggesting that it was not reversible and contingent on the reactivation of the consolidated trace in the presence of a salient, behavioral relevant novel cue. Our results indicate that hippocampal protein synthesis is required during a limited post training time for consolidation of object recognition memory and show that the hippocampus is engaged during reconsolidation of this type of memory, maybe accruing new information into the original trace.



***PARTE I***

## ***I. Introdução***

---

Ainda que corriqueiramente os termos aprendizado e memória sejam utilizados de forma intercambiável e, muitas vezes, entendidos como sinônimos, é importante destacar que as duas palavras descrevem conceitos que apesar de estar intimamente relacionados, não são equivalentes. Assim, podemos definir aprendizado como uma alteração relativamente permanente no comportamento real ou potencial que ocorre como consequência da prática ou da experiência. Desta definição operacional de aprendizado fica claro que o mesmo envolve a aquisição de nova informação bem como o estabelecimento de novas relações, associativas ou não, entre informações pré-existentes (Squire e Kandel, 2003).

É importante salientar que segundo esta definição o aprendizado é um processo resultante da interação do sujeito com o meio ou, ao menos no caso dos seres humanos e talvez alguns outros primatas, também da introspecção. Como todo processo biológico, o aprendizado também tem um produto. Porém, a diferença do resto dos processos biológicos conhecidos, o produto do aprendizado não é materialmente tangível senão que constitui uma unidade informacional de existência real ainda que meramente psíquica dita de memória. Se bem utilizamos uma única palavra para nomear todas elas, é obvio que não todas as memórias são iguais. Têm aquelas que perduram apenas o tempo suficiente para que

possamos utilizá-las, mas também existem aquelas outras que persistem, por bem ou por mal, pelo resto de nossas vidas. Há memórias que nos dizem quem somos de onde viemos e nos permitem predizer para onde vamos, mas também formamos memórias que, ainda que nada nos digam sobre nossa vida pessoal, nos permitem realizar tarefas, às vezes gratas e úteis, como andar de bicicleta ou até escrever no computador esta tese. Atendendo estas diferenças, as memórias podem classificar-se de acordo com o tempo que sobrevivem (ver Tabela 1). Assim, temos memórias sensoriais, memórias de curta duração e memórias de longa duração. As memórias sensoriais são aquelas que 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. Em primatas este sistema processa tipicamente informação visual, mas existem registros mnemônicos deste tipo para todas as modalidades sensoriais. As memórias sensoriais possuem uma grande capacidade de registro, mas, para que esta informação seja de alguma utilidade prospectiva, deve ser rapidamente recodificada como um tipo mais perdurável de memória.

As memórias de curta duração, também conhecidas como memórias ativas ou primárias, podem ser definidas como aquele tipo de memórias que nos permitem manter “na mente” e em um estado ativo e facilmente acessível, uma pequena quantidade de informação. Esta informação pode ter sido adquirida recentemente e proceder então, dos sistemas

encarregados de processar a memória sensorial, pode resultar da evocação consciente ou inconsciente de uma memória de longa duração (ver embaixo) ou bem, ser o resultado do processamento de informação, caso no qual recebe o nome de memória de trabalho (Izquierdo et al., 1999; 2004).

	<b>Tempo de permanência</b>	<b>Características</b>
<b>Memórias Sensoriais</b>	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.
<b>Memórias de Curta Duração (STM)</b>	Menos de 3 horas	Permite manter “na mente” e em um estado ativo e facilmente acessível, uma pequena quantidade de informação.
<b>Memórias de Longa Duração (LTM)</b>	Dias, meses, anos, a vida toda	Contêm itens informacionais de diversa índole altamente interconectados entre si os quais se encontram armazenados de maneira mais ou menos permanente constituindo um sistema de arquivo dinâmico.

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

Já as memórias de longa duração são aquelas as quais normalmente nos referimos quando coloquialmente falamos de “memória”. Estas memórias contêm itens informacionais de diversa índole (ver embaixo) altamente interconectados entre si os quais se encontram armazenados de maneira mais ou menos permanente constituindo um sistema de arquivo dinâmico. Atendendo a seu conteúdo as memórias de longa duração podem ser classificadas como explícitas e implícitas (ver Tabela 2). As memórias

ditas de explícitas contêm informações que usualmente sabemos que possuímos e as quais temos acesso consciente. Este tipo de memória inclui o conhecimento sobre nossa história pessoal e sobre o mundo que nos rodeia e ainda podem ser divididas em duas subclasses: as memórias episódicas e as memórias semânticas (Izquierdo e McGaugh, 2000; Squire e Zola, 1996)

<b>Características</b>		<b>Subdivisões e características</b>	
<b>Explícitas/ Declarativas</b>	Contêm informação que usualmente sabemos que possuímos e a qual temos acesso consciente.	<i>Episódicas</i>	Guardam informação acerca de nossas próprias vidas e eventos.
		<i>Semânticas</i>	Armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
<b>Implícitas/ Não-declarativas</b>	Contêm informação à qual não temos acesso consciente, tal como o conhecimento procedimental e a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles produzidos pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.		

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

As memórias episódicas guardam informação acerca de nossas próprias vidas e eventos a ela relacionados como, por exemplo, minha festa de

aniversário de 15 anos ou o dia que conheci o meu namorado. Ao contrário, as memórias semânticas armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos. Já as memórias implícitas (também chamadas de não-declarativas) contêm informação à qual não temos acesso consciente, tal como o conhecimento procedimental e a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles produzidos pelo treino em tarefas de condicionamento e habituação.

Independentemente de sua natureza e da validade das classificações que pretendem refletir-la, sabe-se que as memórias de longa duração não são adquiridas na sua forma definitiva. Pelo contrário, após o aprendizado o novo traço mnemônico sofre um processo de filtro e seleção progressivo denominado consolidação que envolve a ativação ordenada e seqüencial de uma série de cascatas de sinalização intracelular e a síntese “de novo” de diversas proteínas em distintas áreas do cérebro. Modulando a eficácia neuronal e promovendo o estabelecimento de novas conexões sinápticas e o fortalecimento de algumas das preexistentes, este processo converte um traço inicialmente frágil e susceptível à ação de distintos agentes amnésicos em uma memória de longa duração estável, persistente, e resistente a eventos traumáticos ou a tratamentos farmacológicos (McGaugh, 1966; 2000). Durante muito tempo se acreditou que o processo de consolidação acontecia uma única vez para cada traço mnemônico e, conseqüentemente, se assumia que após consolidadas as

memórias de longa duração se tornavam incapazes de serem modificadas. Porém, nunca existiram provas conclusivas desta hipótese e a muitos resultava óbvio que um processo de armazenamento de informação que operasse dessa maneira não oferecia muitas vantagens adaptativas. De fato, já na década de 1960 Misanin e colaboradores (Misanin et al., 1968) apresentaram evidência experimental sugerindo que, como consequência de serem reativadas durante a sua expressão, as memórias de longa duração voltavam a serem susceptíveis à ação amnésica de diversos tratamentos, incluindo o eletro choque e o trauma craniano. Apesar de serem inicialmente descartadas pela ortodoxia dominante, as observações de Misanin foram recentemente resgatadas. Principalmente a partir do trabalho pioneiro de Susan Sara e seu grupo de colaboradores (Przybylski e Sara, 1997; Przybylski et al., 1999; Sara, 2000), uma considerável quantidade de evidência experimental tem-se acumulado indicando que, efetivamente, após sua evocação na ausência de reforço, as memórias de longa duração voltam a serem lábeis outra vez e, para persistir, devem atravessar um processo dependente da síntese protéica que recebe o nome de reconsolidação (Nader et al., 2000; Nader, 2003; Eisenberg e Dudai, 2004).

A importância conceitual desta proposição não pode ser subestimada. A possibilidade de que a reativação de uma memória ponha a mesma em posição de ser modificada ou até descartada apresenta importantes implicações tanto de índole filosófica como terapêutica. De índole

filosófica, já que põe em dúvida a possibilidade mesma de conhecimento, ao sugerir que as memórias mais confiáveis são aquelas pouco ou nunca utilizadas. De índole terapêutica, já que a existência de um processo reconsolidatório permite especular acerca da possibilidade de eliminar seletivamente uma memória administrando agentes amnésicos no momento da sua evocação.

De particular importância resultaram os achados reportados por Nader e colaboradores (Nader et al., 2000a;b) demonstrando que, em ratos, a infusão intra-amígdala de um inibidor da síntese protéica imediatamente após a evocação de uma resposta condicionada ao medo, induz amnésia persistente. O fato de inibidores da síntese protéica não afetarem o traço mnemônico em questão quando administrados na ausência de expressão sugere que, ao ser reativada, uma memória já consolidada entra outra vez num estado lábil e que, para persistir, requer passar novamente por um processo dependente da síntese protéica. Após sua publicação, os resultados de Nader e colaboradores foram replicados utilizando diferentes agentes amnésicos, diversos paradigmas de aprendizado e distintas espécies animais (Debiec et al., 2002; Kida et al., 2002; Sangha et al., 2003; Pedreira et al., 2002; Lee et al., 2004; Eisenberg et al., 2003; Stollhoff et al., 2005; Inda et al., 2005; Gainutdinova et al., 2005; Merlo et al., 2005). Apesar de tudo isto, a hipótese da reconsolidação não é unanimemente aceita, e vários laboratórios falharam em detectar este processo em paradigmas comportamentais bem conhecidos (Dawson e



McGaugh, 1969; Squire et al., 1976; Biedenkapp e Rudy, 2004; Cammarota et al., 2004; Hernandez e Kelley, 2004; Lattal e Abel, 2004; Mileusnic et al., 2005; Power et al., 2006). Em particular três pontos são ainda objetos de intenso debate. Primeiro, o efeito inibitório de agentes exógenos não é suficiente para asseverar a existência de um processo reconsolidatório. A inibição comportamental pode dever-se a um efeito inespecífico mais ou menos duradouro. Da mesma forma que a hipótese tradicional da consolidação só foi aceita após a comprovação da existência de drogas promnésicas, a corroboração conclusiva da existência de um processo reconsolidatório requer a demonstração de que o mesmo pode ser modulado positivamente por agentes farmacológicos. Segundo, desde os estudos pioneiros de Pavlov (1927) sabe-se que a expressão repetida da memória na ausência de reforço conduz a sua extinção, processo este caracterizado pelo declínio na intensidade ou frequência da resposta aprendida e que é bloqueado por inibidores da síntese protéica administrados no momento da evocação (Berman e Dudai, 2001; Bahar et al., 2004; Cammarota et al., 2003; Cammarota et al., 2004; Santini et al., 2004; Inda et al., 2005). Já que o objetivo da reconsolidação seria o de manter comportamentalmente disponível uma memória desvalorizada pela experiência (quer dizer, o contrário da extinção), resulta necessário explicar como ambos processos poderiam ser desencadeados pelo mesmo evento e utilizando vias metabólicas semelhantes nas mesmas regiões do cérebro. Terceiro,

muitos grupos de pesquisa reportaram que a amnésia induzida por agentes administrados após a reativação é reversível, e que a memória original pode se recuperar espontaneamente horas ou dias após o tratamento amnésico (Lattal e Abel, 2004; Hernandez e Kelley, 2004; Power et al., 2006). A menos que se possa corroborar que a amnésia induzida pelo bloqueio da reconsolidação é duradoura, ou que seja demonstrado inequivocamente que a mesma se deve a um processo dependente do tempo e de uma região cerebral particular será impossível afirmar conclusivamente que o bloqueio da reconsolidação produz o desaparecimento efetivo do traço mnemônico.

A versão espacial da tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM) juntamente com a tarefa de reconhecimento de objetos, talvez sejam os paradigmas comportamentais mais utilizados para analisar a participação do lobo temporal na codificação, armazenamento e expressão de memórias declarativas em roedores (Logothetis e Sheinberg, 1996; Bures et al., 1997; Riesenhuber e Poggio, 2002; Redish e Touretzky, 1998; De Hoz et al., 2004; Schimanski e Nguyen, 2004). Tem sido demonstrado que a infusão intra-cerebroventricular de anisomicina, um inibidor de síntese protéica, bloqueia a aquisição da memória associada ao LAM (Meire e Rosenblum, 1998) e que, em camundongos a injeção intraperitoneal (Suzuki et al., 2004), mas não subcutânea (Lattal e Abel, 2001; Lattal et al., 2004) deste fármaco, prejudica a reconsolidação e a extinção deste traço.

A memória de reconhecimento caracteriza-se principalmente por conferir a habilidade de discriminar entre uma característica familiar e uma nova, uma capacidade obviamente significativa no que diz respeito à probabilidade de sobrevivência. No entanto, apesar da importância adaptativa da aquisição e retenção deste tipo de memória, ainda não está claro quais estruturas cerebrais estão diretamente envolvidas na consolidação e evocação do traço de reconhecimento. Ainda que se saiba que o lobo temporal está envolvido, o papel do hipocampo nestes processos é ainda controverso. Estudos têm mostrado que lesões hipocámpais não afetam a memória de reconhecimento de ratos na tarefa denominada de *delayed non-matching-to-sample* (Mumby, 2001), embora outros estudos utilizando paradigmas comportamentais que envolvem a avaliação direta de uma novidade (Ennaceur e Delacour, 1988) indicam que o dano na formação hipocámpal pode sim prejudicar este tipo de memória. A causa destas discrepâncias não é clara, mas talvez a principal desvantagem dos estudos mencionados acima é que eles resultaram do uso de lesões irreversíveis, induzidas antes ou após o treino e, portanto não podem discriminar entre as diferentes fases do processamento da memória ou excluir facilmente a influência de comportamentos e efeitos fisiológicos não específicos (Izquierdo e Medina, 1998). Até o momento não existem estudos acerca das consequências da inibição da síntese protéica hipocámpal na consolidação e na persistência pós-evocação da memória espacial e da memória de reconhecimento. Para suprir esta

lacuna, utilizamos neste trabalho a tarefa do labirinto aquático de Morris (D'Hooge e De Deyn, 2001; Naghdi et al., 2001; Baldi et al., 2003; Hebert e Dash, 2004) e a tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaceur e Delacour, 1988; Ennaceur e Aggleton, 1994; Ennaceur et al., 1996, 1997; Mumby et al., 2002a,b; Gaskin et al., 2003), com o intuito de cumprir os objetivos a seguir:

## ***II. Objetivos***

---

### ***II.1 - Objetivo geral***

- Investigar o efeito da inibição da síntese protéica hipocampal na persistência da memória espacial e de reconhecimento após sua aquisição e reativação.

### ***II.2 - Objetivos específicos***

- Avaliar a importância da síntese protéica no hipocampo para a aquisição e a retenção da memória espacial no labirinto aquático de Morris (LAM).
- Investigar se a inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de evocação (com ou sem a presença da plataforma) exerce algum efeito na persistência da memória do LAM.
- Estudar qual a participação do hipocampo na extinção do aprendizado espacial no LAM utilizando um modelo tradicional de extinção, onde o reforço é inexistente.
- Investigar se o aprendizado reverso no LAM é resultado da extinção ou se é consequência de um processo de reconsolidação do traço mnemônico original.
- Investigar a possibilidade de fármacos capazes de melhorar a consolidação de memórias possam também atuar melhorando a

retenção destas quando administrados após uma sessão de evocação não reforçada.

- Analisar se a síntese protéica hipocampal é necessária para a consolidação da memória de reconhecimento.
- Avaliar se a síntese protéica hipocampal altera a retenção da memória de reconhecimento quando os objetos apresentados durante a reativação são iguais àqueles apresentados durante o treino.
- Analisar se a inibição da síntese protéica hipocampal afeta a persistência da memória de reconhecimento quando a reativação acontece conjuntamente com a incorporação de nova informação.

***PARTE II***

## ***I. Metodologia***

---

### ***I.1- Animais Experimentais***

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2,5 a 3 meses de idade, pesando em média 250 g. Os animais foram mantidos em caixas moradias em número de 5 por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23° C) submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS e mantidos no mesmo, ou adquiridos da FEPPS e mantidos no biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

### ***I.2 - Cirurgia Estereotáxica***

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas (A - 4.2, L 0.3, V +1.3) do Atlas de Paxinos e Watson (1986) (Figura 1).



Figura 1. Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.



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

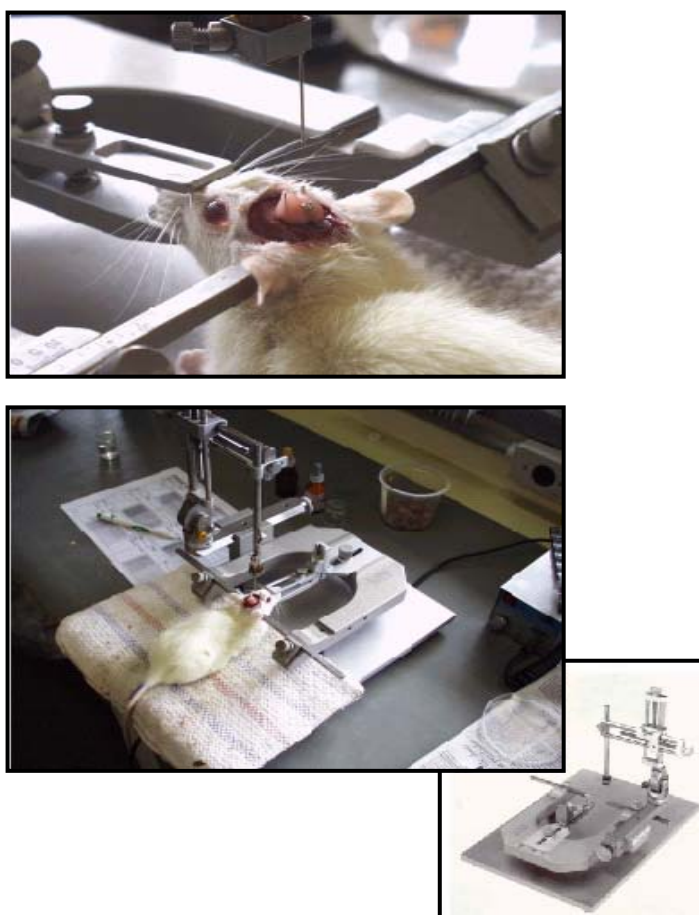


Figura 2. Fotos do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do aparelho estereotáxico.

### ***1.3 - Manipulação***

Dois a quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do

biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 5 min.

#### ***1.4 - Labirinto Aquático de Morris - LAM***

O LAM foi desenvolvido há quase 20 anos por Richard G. Morris (1986) como um instrumento para investigar aprendizado espacial em roedores. A relativa simplicidade do LAM é indubitavelmente umas das razões para seu sucesso. Na sua versão espacial (também denominada de “plataforma oculta”), esta tarefa está baseada em uma capacidade universal, a utilização de dicas ambientais para encontrar um alvo que, ao permitir o escape de uma situação desprazerosa, atua como reforço positivo. De fato, o LAM é o modelo comportamental mais amplamente usado para analisar a participação do hipocampo no processamento de informação espacial. O paradigma é plástico o suficiente como para poder ser adaptado com êxito à análise de diferentes fases e modalidades do processamento do traço mnemônico espacial, onde um maior número de sessões de treino, ou bem a execução do mesmo durante vários dias conduz ao estabelecimento de um mapa mnemônico perdurável, claramente evidenciado pelo surgimento de uma marcada preferência espacial. O fato de que a intensidade e a duração do treinamento possam ser alteradas com conseqüências previsíveis na magnitude da resposta adquirida e da preferência espacial estabelecida, facilita a análise correlativa entre os dados comportamentais e suas contrapartidas

bioquímicas. Além disso, a possibilidade de modificar a localização do escape no labirinto após sua posição original ter sido aprendida permite avaliar a transformação do traço mnemônico produzida pela adição de nova informação, uma situação na qual, acredita-se, o processo reconsolidatório teria um papel fundamental.

Embora o LAM seja um dispositivo usado primordialmente para estudo de aprendizagem espacial, vários protocolos de memória não espacial utilizando este labirinto foram desenvolvidos. A versão não espacial deste paradigma (também denominada de “LAM com plataforma visível”) auxilia particularmente no controle de tarefas que visam estudar a especificidade de um tratamento sobre memória espacial.

O LAM utilizado em nossos experimentos encontra-se em uma sala ampla, bem iluminada (iluminação indireta) e sem janelas, a qual foi especialmente construída nas instalações do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O labirinto em si consiste de uma piscina circular feita de concreto rebocado e impermeabilizado pintada da cor preta (2 m de diâmetro e 0,6 m de altura). A piscina está conceitualmente dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos. Dois centímetros abaixo da água (mantida entre 21–23°C durante todo o experimento) e oculta da vista do sujeito experimental encontra-se uma plataforma de escape de 12 cm de diâmetro. A superfície da plataforma é abrasiva para permitir que o animal suba nela assim que a detectar. O LAM está rodeado de numerosos elementos claramente visíveis e de

cores e motivos contrastantes ainda que comportamentalmente neutros (figuras, fotografias, desenhos geométricos e abstratos, etc.) pendurados nas paredes da sala. Estes elementos servem como dicas de localização espacial e sua posição pode ser mudada a vontade do experimentador (Figura 3).

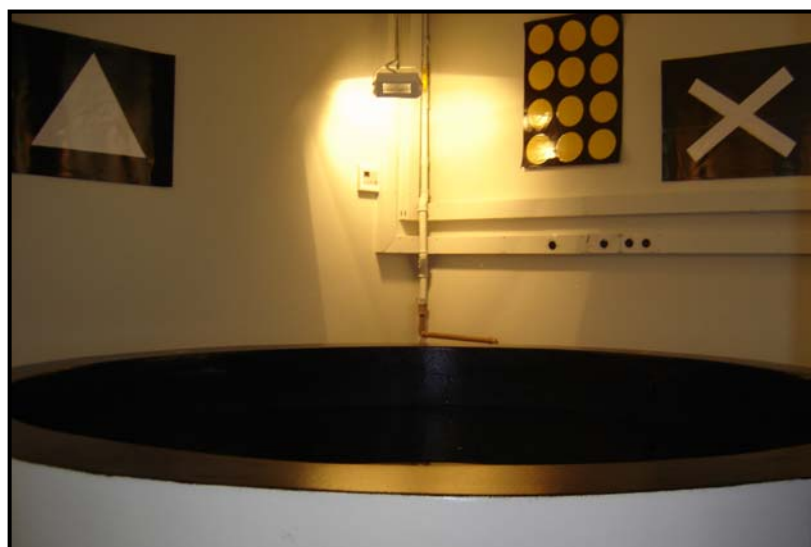


Figura 3. Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

#### ***1.4.1 - Aprendizado espacial no LAM***

O treino na versão espacial do LAM consistiu de 1 sessão diária de 8 largadas durante 5 dias. A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante os 5 dias de treino. Cada uma das 8 largadas diárias foi iniciada de uma posição distinta da piscina de acordo com um padrão pseudo-aleatório gerado por um sistema computadorizado desenvolvido em nosso laboratório. A duração máxima da largada foi de 60 s e se o animal não encontrasse a plataforma neste período de tempo era

conduzido até ela pelo experimentador, permanecendo sobre a mesma durante 30 s. A retenção da memória no LAM foi avaliada em um teste de retenção na ausência da plataforma de escape de 60 s, realizado 24 h após o treino. O tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante alvo (QA, quadrante onde a plataforma de escape esteve localizada durante o treino) foi utilizado como o principal indicador de retenção da memória espacial (Figura 4).

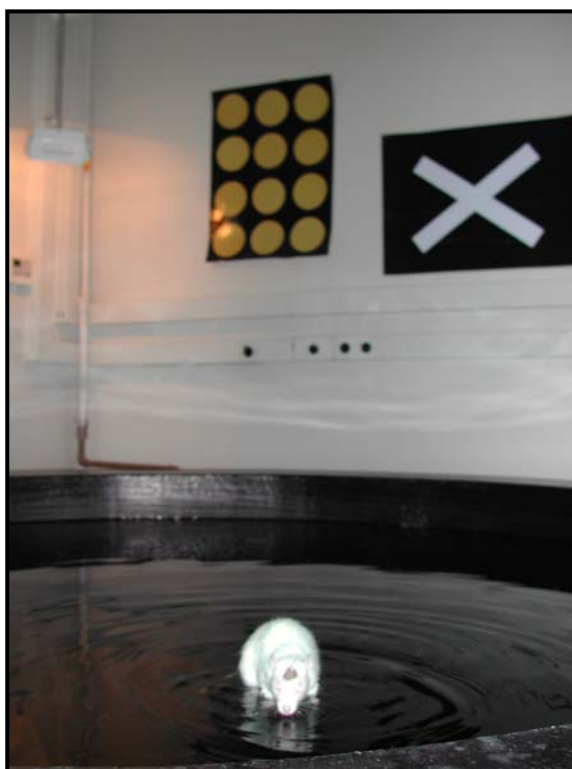


Figura 4. Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM.

#### ***1.4.2 - Aprendizado não espacial no LAM***

O treino para a versão não espacial do LAM foi realizado utilizando o mesmo dispositivo. Porém, a sala experimental foi modificada para excluir

as pistas de localização espacial e a plataforma de escape foi alterada de maneira a facilitar a sua localização por parte do animal. Para este fim, colocamos uma cortina da cor cinza ao redor do labirinto aquático e uma bandeirinha flutuante da cor branca com listras pretas foi presa na plataforma para indicar sua posição. O treino para a versão não espacial do LAM consistiu de 8 largadas de diferentes posições do labirinto; a posição da plataforma foi alterada a cada largada. Cada largada durou no máximo 60 s e se o animal não encontrasse a plataforma neste período era conduzido até ela, onde permanecia durante 30 s. O intervalo entre largadas foi de 30 s.

#### ***1.4.3 - Aprendizado Reverso no LAM***

Os animais foram treinados no LAM como descrito em 1.4.1, realizando-se uma sessão diária de oito largadas durante cinco dias. No sexto dia, a plataforma de escape foi movida do quadrante original (ORI) para o quadrante oposto/reverso (REV). O treino com a plataforma na localização reversa (aprendizado reverso) foi realizado em um único dia e consistiu de 8 largadas consecutivas. A retenção da memória foi avaliada 2, 24 ou 120 h após a oitava largada de aprendizado reverso mediante um teste na ausência da plataforma de escape durante o qual se avaliou o tempo que o animal passou nadando no quadrante ORI e no REV.

#### ***1.4.4 - Extinção da memória espacial associada ao LAM***

Os animais foram treinados no LAM como descrito em 1.4.1. Vinte e quatro horas após a última sessão de treino os animais foram submetidos a 16, 8 ou 4 testes de retenção consecutivos na ausência da plataforma de escape. O intervalo entre os testes foi de 30 s. Vinte quatro horas após o último teste não reforçado os animais foram submetidos a 8 testes consecutivos adicionais durante os quais foi avaliado o tempo gasto nadando no QA.

#### ***1.4.5 - Reativação da memória espacial associada ao LAM***

O treino no LAM foi realizado como descrito em 1.4.1. Vinte quatro ou 120 horas após a última sessão de treino os ratos foram submetidos a um teste de reativação na ausência ou na presença da plataforma de escape (PT ou RT, respectivamente). Duas, 24 ou 120 horas após o teste (PT1 ou RT) realizamos um novo teste na ausência da plataforma de escape (PT2 ou PT).

Nos experimentos em que realizamos 2 dias de treino, oito largadas/dia, outros parâmetros além dos mencionados acima foram analisados. Assim, avaliamos a latência para o aro (círculo imaginário com 24 cm de diâmetro centralizado na posição da plataforma), o número de cruzamentos e o tempo de permanência na área do mesmo em relação à área do quadrante alvo.

### ***1.5 - Paradigma de reconhecimento de objetos***

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles despendem um tempo maior para explorar o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaceur e Delacour, 1988), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (Reed et al., 1999; Moses et al., 2005; Mandolesi et al., 2003). O aparato para estudar reconhecimento de objetos consiste de um campo aberto retangular com 60 cm de comprimento por 40 cm de profundidade e 50 cm de altura o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente. A parede da frente do campo aberto é construída de vidro, para a melhor observação do animal. Antes de serem submetidos à tarefa de reconhecimento, os animais passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental que durou 4 dias e consistiu de uma sessão comportamental diária de 20 min na qual os animais foram colocados individualmente no campo aberto para que o explorassem livremente (Akirav e Maroun, 2006; Kelly et al., 2003). Os objetos estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento foram confeccionados em metal, vidro ou cerâmica. Nenhum dos objetos possui significância comportamental para os animais experimentais os quais não demonstraram preferência por algum deles durante estudos piloto realizados oportunamente. Cada objeto foi preso ao assoalho do campo



aberto pela base. A arena do campo aberto assim como os objetos estímulo foram limpos com uma solução de etanol a 30 % entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas. A exploração foi definida como cheirar ou tocar os objetos de estímulo com o focinho ou as patas dianteiras. Sentar-se no objeto ou permanecer ao redor dele não foi considerado comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada objeto foi medido por um observador e foi expresso como percentagem do tempo total de exploração (Figura 5).



Figura 5. Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de reconhecimento de objetos.

### ***1.5.1 - Treino no paradigma de reconhecimento de objetos***

No dia 1 (Sessão de treino), os ratos foram individualmente colocados no campo aberto contendo 2 objetos diferentes sendo-lhes permitido explorá-los livremente durante 5 min.

O teste de retenção foi realizado 180 min (para analisar a memória de curta duração) ou 24 horas após a sessão de treino (para analisar a memória de longa duração). Nestas sessões de teste de 5 min de duração os ratos foram individualmente re-introduzidos no campo aberto onde um dos objetos apresentados durante o treino tinha sido aleatoriamente substituído por um objeto novo.

### ***1.5.2 - Protocolo de reativação da memória de reconhecimento***

No dia 1 (Sessão de treino), os animais foram expostos a dois objetos diferentes por 5 min, como descrito em 1.5.1. Vinte quatro ou 120 horas após, os ratos foram expostos aos mesmos dois objetos por 2 ou 5 min para reativar o traço mnemônico (Sessão de reativação). Vinte quatro horas após (Sessão de teste), os ratos foram colocados novamente no campo aberto onde um dos objetos foi trocado por um objeto novo.

### ***1.5.3 - Protocolo de atualização da memória de reconhecimento***

No dia 1 (Sessão de treino), os animais foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 min. Vinte quatro horas após (Sessão de reativação) os ratos foram novamente colocados no campo aberto por 5 min e um dos objetos foi randomicamente trocado por um novo (objeto C). Vinte quatro horas depois (Sessão de teste), os animais foram randomicamente divididos em 3 grupos. Os animais do grupo 1 foram re-introduzidos no campo aberto na presença de um dos objetos que havia

sido apresentado na sessão de treino (objeto A) mais um objeto novo (objeto D). Os animais do grupo 2 foram tratados como os do grupo 1 exceto que o objeto familiar que foi apresentado com o objeto novo D foi o objeto B. Os animais do grupo 3 foram apresentados ao objeto D juntamente com o objeto que havia sido introduzido durante a fase de reativação (objeto C).

### ***1.6 - Esquiva Inibitória***

O aparelho utilizado para o treino na tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão consiste em uma caixa de madeira de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico. O assoalho do aparelho é formado por barras de bronze paralelas. No lado esquerdo da caixa, há uma plataforma de 5,0 cm de altura por 7,0 cm de largura (Figura 6).

Os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treinamento individual na qual eram cuidadosamente colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de esquiva inibitória para que explorassem a mesma. Quando desciam da plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis, que constituem o assoalho da caixa, recebiam um choque elétrico de 0,5 mA por 2 segundos (Camarota et al., 2003). Posteriormente eram retirados e retornavam para a caixa moradia.



Figura 6. Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória. Note-se o animal sobre a plataforma.

Para avaliar a retenção da memória de esquiva de longa duração os animais foram submetidos a uma sessão de teste comportamental 24 horas após o treino. O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para ambas as sessões foram adotados tempos máximos de descida, sendo 20 s para a sessão de treino e 180 s para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua caixa moradia. Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 20 s foram eliminados do estudo.

### ***1.7 - Campo Aberto***

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais, 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. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes iguais. Durante o experimento, o animal é gentilmente colocado na arena do campo aberto e deixado ali para explorar a caixa livremente por 5 minutos. Registram-se o número de linhas cruzadas e o número de elevações (em inglês *rearings*), comportamentos que nos roedores denotam exploração (Bonini et al., 2006; da Silva et al., 2006) (Figura 7).



Figura 7. Fotografia de um rato explorando o campo aberto. Observe-se o comportamento de elevação sobre as patas traseiras (“rearing”).

### ***1.8 - 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 contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. O animal é colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 minutos. Registra-se então 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 (menos ansiogênicos) e o número de entradas nestes braços (Bevilaqua et al., 2003; Kerr et al., 2005; da Silva et al., 2006) (Figura 8).



**Figura 8.** Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.

### ***1.9 - Tratamentos farmacológicos***

Para a realização dos diferentes tratamentos farmacológicos utilizamos uma cânula de infusão (0,05 mm de diâmetro), conectada a uma micro-seringa por meio de um tubo de polietileno acoplado a uma agulha de infusão; o fármaco a ser administrado foi colocado dentro do tudo e a agulha acoplada então à luz da cânula guia de infusão na cabeça do animal. A infusão foi realizada a uma velocidade de 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Ao término de cada infusão, a cânula foi deixada no local por 30-60 s adicionais para evitar refluxo (Figura 9). Utilizamos neste trabalho os seguintes fármacos:

- Anisomicina (ANI; Sigma Co) inicialmente dissolvida em 1M de HCl, o pH ajustado a 7.4 com NaOH. Esta solução foi levada à concentração de trabalho (160  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) com salina. É importante salientar aqui que a dose de ANI utilizada em nossos estudos bloqueia cerca de 85% da síntese protéica (Quevedo et al., 1999; Cammarota et al., 2004)
- D-cicloserina (cSER; Sigma Co) dissolvida em solução salina (10 mg/kg ou 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos-piloto e estudos prévios mostrando o efeito destes compostos sobre aprendizado e memória e outras variáveis comportamentais e fisiológicas. Os animais do grupo controle receberam infusão bilateral de 1  $\mu\text{L}$  do veículo utilizado para a preparação dos fármacos estudados.



Figura 9: Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão é introduzida na luz da cânula guia, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco seja infundido.

#### ***1.10 - Controle histológico da região estudada***

Após o término dos experimentos comportamentais os animais previamente operados tiveram a colocação da suas cânulas conferida histologicamente, e a região cerebral atingida pela infusão avaliada; visando garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta dos fármacos fossem incluídos na análise estatística final.

Para isso, após dos procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 0,1% através das cânulas como descrito acima. Quinze minutos depois desta, foram sacrificados e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 a 7 dias, quando então se procedeu a análise histológica, considerando-se somente os animais com a localização dentro de 2 mm<sup>3</sup> do local desejado.



### ***1.11 - Análise Estatística dos Dados***

Para a análise dos dados do LAM quanto para aqueles obtidos na tarefa de reconhecimento de objetos, no campo aberto e no labirinto em cruz utilizamos testes de estatística paramétrica (ANOVA de uma ou duas vias seguidas do contraste adequado ou teste  $t$  de Student para amostra única ou amostras pareadas). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os dados obtidos na esQUIVA inibitória foram analisados mediante estatística não paramétrica (teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) já que a variável em estudo (i.e. a latência de descida da plataforma) não segue uma distribuição normal nem cumpre com o requerimento de homocedasia (igualdade das variâncias). A análise foi realizada num computador Pentium IV 2.8 GHz utilizando o software Prism Graph-Pad 4.1.

## **II. Resultados**

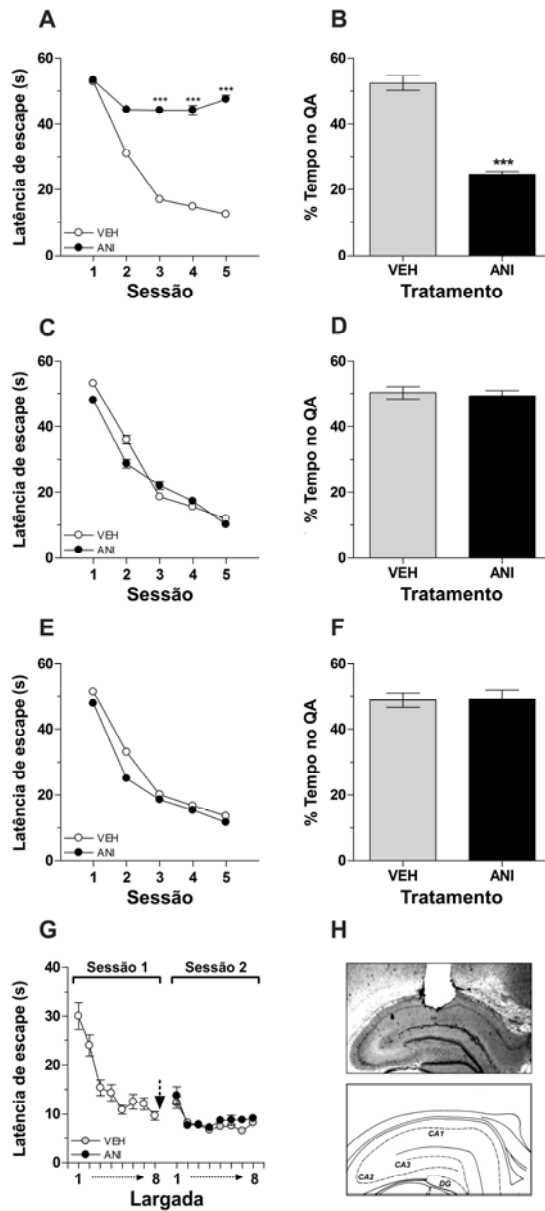
---

### **II.1 - A infusão intra-hipocampal de ANI após o treino no labirinto aquático de Morris bloqueia a consolidação da memória espacial.**

Em primeiro lugar, decidimos investigar se a síntese protéica hipocampal é requerida para a formação da memória espacial associada ao labirinto aquático de Morris (LAM). Para tal, infundimos bilateralmente anisomicina (ANI; 160 µg/lado), um inibidor da síntese protéica, ou veículo (VEH) na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após cada sessão de treino (8 largadas/dia). Como se pode observar na Figura 10A a administração de ANI na região CA1 imediatamente pós-treino bloqueou a diminuição na latência de escape produzida pelo treinamento nos animais controle ( $F_{(1,20)}=83,21$ ;  $p<0,001$ ). Mais ainda, quando realizamos um teste de retenção na ausência da plataforma de escape (PT) 24 horas após a última sessão de treino (ver Metodologia) observamos que os animais controles passaram mais tempo nadando no quadrante alvo (QA) que aqueles que receberam ANI, os quais não mostraram preferência por nenhum quadrante (Figura 10B). Conseqüentemente, quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino, ANI bloqueia a consolidação da memória espacial associada à aprendizagem no LAM ( $t_{(20)}=11,61$ ;  $p<0,001$  vs VEH).

Alguns autores têm mostrado que certas memórias dependentes do hipocampo (Grecksch e Matthies, 1980; Freeman et al., 1995) apresentam

duas fases de sensibilidade à ação de inibidores da síntese protéica, uma imediatamente em seguida do treino e outra entre 3 a 6 horas após.



**Figura 10. A síntese protéica é requerida no hipocampo dorsal durante um breve período pos-treino para a consolidação da memória espacial no LAM.** **A)** Média das latências de escape durante os cinco dias de aquisição da memória espacial associada ao treino no LAM para ratos que receberam anisomicina (160 µg/lado; ANI) ou veículo (VEH) na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após cada sessão de treino. Os dados estão apresentados como a média ± SEM de cada sessão. \*\*\* $p < 0,001$  vs VEH no teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias;  $n = 11$  por grupo. **B)** Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o 5º dia de treino para ratos que receberam ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1 como indicado em **A**. Os dados estão apresentados como a média ± SEM. \*\*\* $p < 0,001$  vs VEH no teste  $t$  de Student para amostras pareadas;  $n = 11$  por grupo. **C)** Animais foram treinados como em **A**, mas receberam ANI (160 µg/lado) ou VEH 3 horas após cada sessão de treino. Os dados estão apresentados como a média ± SEM de cada sessão;  $n = 8$  por grupo. **D)** Média do tempo gasto no QA durante um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o 5º dia de treino para ratos que receberam ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1 como indicado em **C**. Os dados estão apresentados como a média ± SEM;  $n = 8$  por grupo. **E)** Animais foram treinados como indicado em **A**, mas receberam ANI ou VEH 6 horas após a cada sessão de treino. Os dados estão apresentados como a média ± SEM de cada sessão;  $n = 8$  por grupo. **F)** Média do tempo gasto no QA durante um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o 5º dia de treino para ratos que receberam ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1 como indicado em **E**. Os dados estão apresentados como a média ± SEM;  $n = 8$  por grupo. **G)** Média das latências de escape durante 2 sessões de treino na versão não-espacial do LAM para ratos que receberam ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1 do hipocampo dorsal. A seta indica o momento da infusão. Os dados estão apresentados como a média ± SEM;  $n = 8$  por grupo. **H)** Fotomicrografia representativa e desenho esquemático retirado do Atlas de Paxinos e Watson, 1986 mostrando o local de infusão na região CA1 dorsal.

Devido a isto, após verificar que a síntese protéica hipocampal é necessária logo após o treino no LAM para que a memória espacial

associada a esta tarefa se consolide, decidimos investigar se também seria requerida em tempos mais tardios. Para tanto, treinamos animais conforme descrito acima e, 3 ou 6 horas após cada sessão de treino infundimos ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) na região CA1 do hipocampo dorsal. Como se pode observar nas Figuras 10C e 10E, as curvas de aprendizado dos animais que receberam ANI não apresentam nenhuma diferença em relação às dos animais controle. Ainda mas, a infusão intra-hipocampal de ANI 3 ou 6 horas pós-treino não modificou a performance dos animais num teste de retenção na ausência da plataforma de escape realizado 24 h após a última sessão de treino (Figuras 10D e 10F).

Tendo em vista que o desempenho no LAM depende da capacidade exploratória e da correta funcionalidade do sistema sensorio/visual dos animais, decidimos avaliar se o efeito amnésico provocado pela administração intra-hipocampal de ANI podia dever-se a uma ação inespecífica deste composto nos níveis de motricidade ou acurácia visual. Para tanto, treinamos animais na versão não-espacial da tarefa do LAM (oito largadas por sessão, dois dias de treino; ver Metodologia) e imediatamente após a última largada do primeiro dia de treino os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 com veículo ou ANI na mesma dose usada nos experimentos descritos acima (160  $\mu\text{g/lado}$ ). Como se pode observar na Figura 10G, a infusão intra-hipocampal de ANI imediatamente após a última largada no primeiro dia de treino não causou nenhuma alteração no aprendizado da versão não espacial do LAM. O

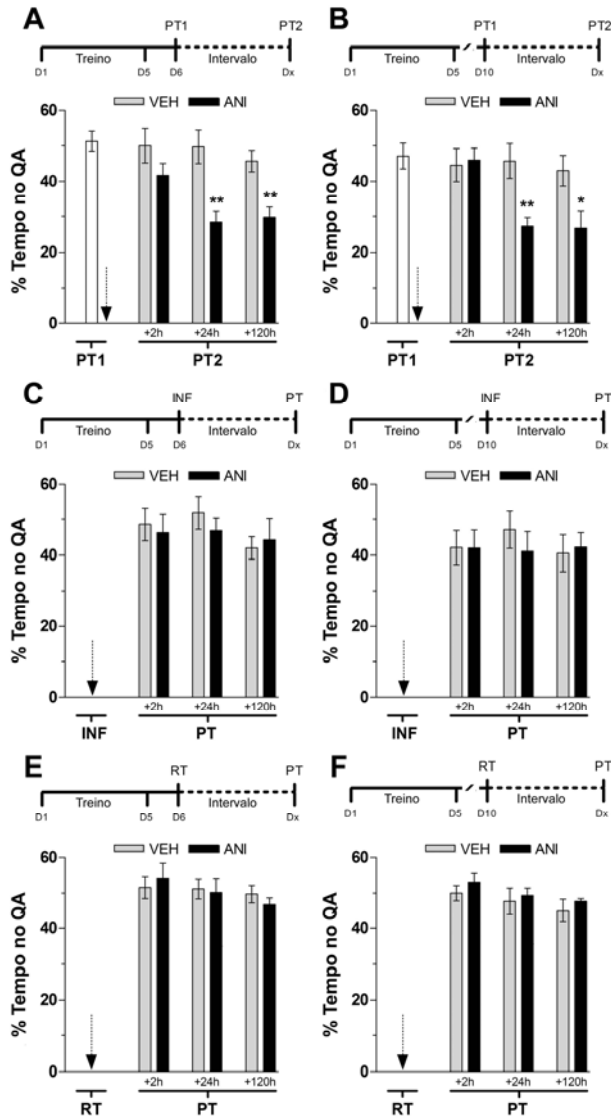
resultado deste experimento sugere que a amnésia provocada pela administração de ANI tem na memória espacial deve-se, especificamente, à inibição do processo consolidatório e não é consequência de um efeito espúrio no estado motivacional ou na capacidade visual e de orientação do animal (ver mais abaixo experimentos adicionais que confirmam esta suposição).

***II.2 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina após uma única sessão de evocação não reforçada no labirinto aquático de Morris bloqueia a retenção da memória espacial.***

Após termos verificado que a ANI bloqueia a consolidação da memória espacial no LAM decidimos investigar se a inibição da síntese protéica após uma sessão de evocação não reforçada (sem a presença da plataforma) exerce algum efeito na persistência do traço mnemônico. Para tal, ratos foram treinados durante cinco dias na versão espacial do LAM, conforme descrito acima, sendo submetidos a uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape (PT1) 24 ou 120 horas após o treino e, a seguir, foram infundidos bilateralmente com ANI (160 µg/lado) ou VEH. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste na ausência da plataforma de escape realizado 2, 24 ou 120 horas após o PT1.

Os animais que receberam ANI após um teste na ausência da plataforma de escape (PT1) 24 (Figura 11A) ou 120 h após o treino (Figura 11B), passaram menos tempo que os animais controles no quadrante alvo

durante o segundo teste (PT2), independentemente se este foi realizado 24 ou 120 horas após o primeiro.



**Figura 11. A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de retenção não reforçada prejudica a perdurabilidade da memória espacial.** **A)** Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 h após foram divididos em 6 grupos experimentais e submetidos a um teste de 60-s na ausência da plataforma de escape (PT1). Imediatamente após PT1 os animais receberam anisomicina (160 µg/lado; ANI) ou veículo (VEH) na região CA1. As setas pretas indicam o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste na ausência da plataforma de escape (PT2) realizado 2, 24 ou 120 h após PT1. Os dados estão apresentados como a média (± SEM) da percentagem do tempo total gasto no quadrante alvo (QA). \*\* $p < 0,01$  vs VEH durante o PT2 realizado 24 (+24h;  $t_{(12)}=3,80$ ) ou 120 h (+120h;  $t_{(12)}=3,73$ ) após PT1. Em todos os casos  $n=7$  por grupo. **B)** Animais foram tratados exatamente como em **A** exceto que PT1 foi realizado 120 h após a última sessão de treino. \*\* $p < 0,01$  vs VEH durante PT2 realizado 24 h após PT1 (+24h;  $t_{(12)}=3,38$ ) e \* $p < 0,05$  vs VEH durante PT2 realizado 120 h após PT1 (+120 h;  $t_{(12)}=2,51$ );  $n=7$  por grupo. **C)** Animais com cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados no LAM. 24 h depois foram divididos em 6 grupos experimentais e receberam uma infusão bilateral (INF) de ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1. A retenção da memória foi avaliada num PT realizado 2, 24 ou 120 h após INF. Os dados estão apresentados como a média (± SEM) da percentagem do tempo total gasto no QA;  $n=7$  por grupo. **D)** Animais foram tratados exatamente como em **C** exceto que INF foi realizada 120 h após a última sessão de treino;  $n=7$  por grupo. **E)** Animais com cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados no LAM. 24 h após foram divididos em seis grupos experimentais e submetidos a um teste de reativação (RT) na presença da plataforma de escape. Imediatamente após RT receberam ANI (160 µg/lado) ou VEH. A retenção da memória foi avaliada em um PT realizado 2, 24 ou 120 h após o RT. Os dados estão apresentados como a média (± SEM) da percentagem do tempo total gasto no QA;  $n=8$  por grupo.

No entanto, quando o segundo teste (PT2) foi efetuado 2 horas após o primeiro (PT1) não se observou nenhuma diferença entre os grupos

experimentais, sem importar se o lapso transcorrido entre PT1 e PT2 foi de 24 (Figura 11A) ou de 120 h (Figura 11B). Ao contrário, os animais que foram infundidos bilateralmente com ANI (160  $\mu$ g/lado) na região CA1 após um teste de reativação na presença da plataforma de escape (RT) realizado 24 (Figura 11E) ou 120 h após o treino (Figura 11F), passaram a mesma quantidade de tempo que os animais controle no quadrante alvo durante o segundo teste na ausência da plataforma de escape (PT), independentemente se este foi realizado 2, 24 ou 120 horas após o RT. Para descartar a possibilidade de que ANI estivesse provocando algum prejuízo na funcionalidade hipocampal, e que este fosse a causa da amnésia observada, treinamos animais durante cinco dias na versão espacial do LAM e, 24 ou 120 horas após a última sessão de treino, os ratos receberam uma infusão bilateral de ANI (160  $\mu$ g/lado) ou de VEH na região CA1 do hipocampo dorsal. Duas, 24 ou 120 horas após a infusão os animais foram submetidos a uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape para avaliar a retenção da memória espacial. Como se pode observar nas Figuras 11C e 11D, por si só, a infusão intrahipocampal de ANI não produz qualquer alteração na retenção do traço mnemônico independentemente do momento da infusão ou do período transcorrido entre esta e o teste.

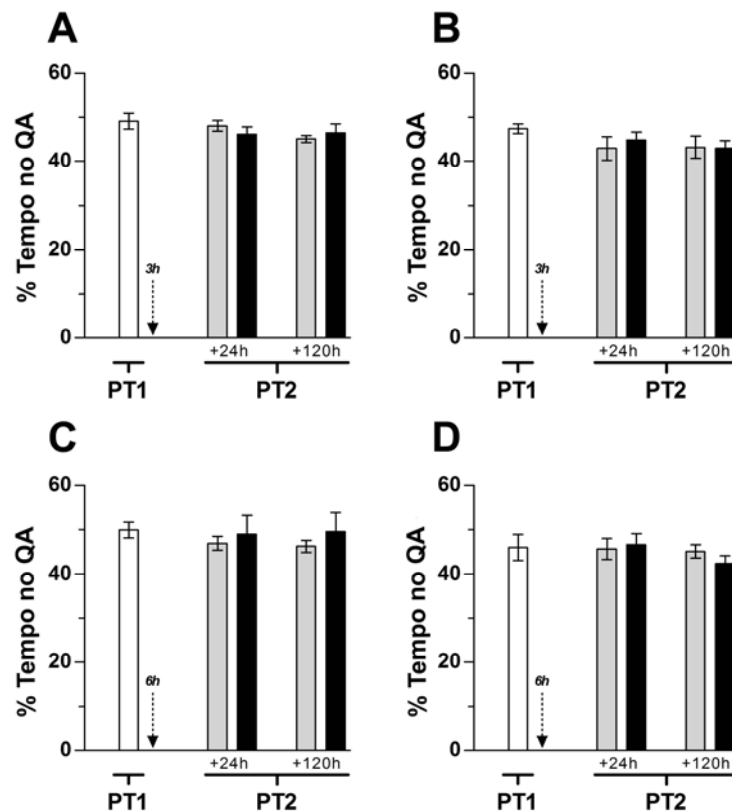
Os resultados deste conjunto de experimentos demonstram que, quando infundida no hipocampo após uma sessão de reativação na ausência de reforço (i.e. na ausência da plataforma de escape), ANI afeta

negativamente a subsequente retenção da memória espacial (Figuras 11A e 11B.).

O fato de que este inibidor da síntese protéica não tenha efeito na retenção do traço quando administrado na ausência de um comportamento relevante ou bem, quando infundido depois de uma sessão de reativação realizada em presença da plataforma de escape (i.e. uma sessão de treino extra) sugere que a expressão não reforçada da memória de preferência espacial associada ao LAM inicia um processo reconsolidatório dependente da síntese protéica hipocampal.

Com o intuito de determinar a extensão da janela temporal de sensibilidade do traço reativado para ANI, repetimos os experimentos apresentados nas Figuras 11A e 11B, mas infundindo ANI (160  $\mu$ g/lado) na região CA1 3 ou 6 h após uma sessão de reativação na ausência da plataforma de escape. Como se pode observar na Figura 12, quando infundida na região CA1, 3 ou 6 horas após um teste de reativação na ausência de plataforma de escape, ANI (160  $\mu$ g/lado) não afetou a retenção da memória espacial do LAM independentemente da idade do traço mnemônico e do tempo decorrido entre o primeiro e o segundo teste de reativação.





**Figura 12. A inibição da síntese protéica hipocampal 3 e 6 horas após uma sessão de evocação não reforçada não afeta a retenção da memória espacial.** **A)** Animais com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 h depois foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais e submetidos a um teste de 60 s na ausência da plataforma de escape (PT1). Três horas após PT1 os animais receberam anisomicina (160 µg/lado; ANI) ou veículo (VEH) na região CA1. A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s na ausência da plataforma (PT2) realizado 24 ou 120 h após PT1. Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da porcentagem do tempo total gasto no quadrante alvo (QA); n=9 por grupo. **B)** Animais foram tratados exatamente como em **A** exceto que o PT1 foi realizado 120 h após a última sessão de treino; n=8 por grupo. **C)** Animais com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 h depois foram divididos em quatro grupos experimentais e submetidos a um PT1. Seis horas após PT1 os animais receberam ANI (160 µg/lado) ou VEH. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 ou 120 h após PT1. Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da porcentagem do tempo total gasto no QA; n=9 por grupo. **D)** Animais foram tratados exatamente como em **C** exceto que o PT1 foi realizado 120 h após a última sessão de treino; n=8 por grupo.

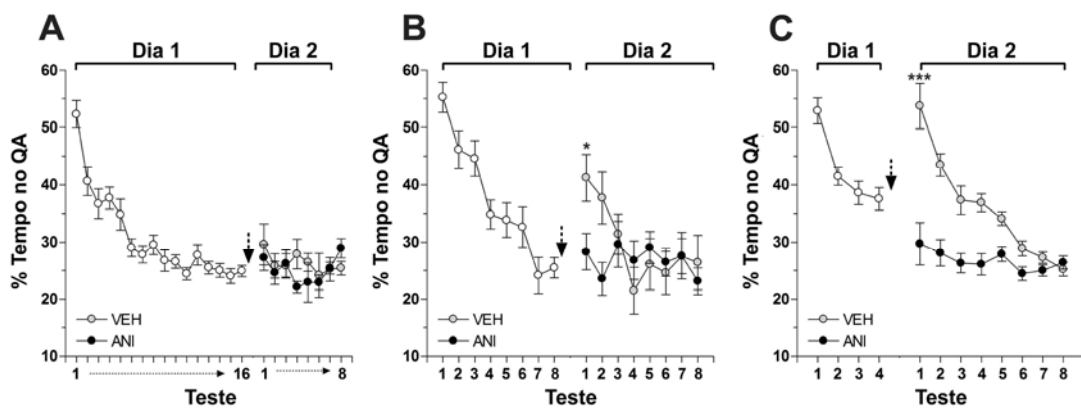
### ***II.3 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina após uma série de testes consecutivos de evocação sem reforço, não afeta a extinção, mas bloqueia a recuperação espontânea da memória espacial no LAM.***

Existem duas explicações factíveis para os resultados apresentados no item I.2: ou bem a reativação não reforçada do traço induz reconsolidação

da memória espacial que é bloqueada pela infusão intra-hipocampal de ANI ou, ANI dada após a evocação não reforçada acelera extinção da memória do LAM. A bibliografia não nos ajuda a determinar qual destas duas opções é correta já que, apesar de vários trabalhos demonstrarem que bloqueadores da síntese protéica inibem a extinção da memória associada a diferentes tarefas (Vianna et al, 2001; Myers e Davis, 2002; Bahar et al., 2003; Santini et al., 2004) outros estudos indicam que, sob certas condições, esses mesmos inibidores podem melhorar a extinção (Fischer et al., 2004).

Com o intuito de resolver este dilema treinamos animais durante 5 dias no LAM e 24 h após o término do treinamento os dividimos em três grupos experimentais que foram submetidos a 4, 8 ou 16 testes de reativação consecutivos na ausência da plataforma (ver Metodologia) antes de receber infusões bilaterais de ANI (160 µg/lado) ou de VEH na região CA1 do hipocampo dorsal. Como se pode observar na Figura 13A, a realização de 16 testes consecutivos (Dia 1) leva à completa extinção da preferência espacial que havia sido adquirida durante o treino ( $F_{(15,210)}=18,19$ ;  $p<0,001$  em ANOVA de medidas repetidas). Esta extinção foi ainda claramente evidente 24 h após o 16º teste de retenção e não foi afetada pela infusão intra-hipocampal de ANI (160 µg/lado). Quando realizamos 8 testes consecutivos (Figura 13B - Dia 1) também observamos a ocorrência de extinção ( $F_{(7,147)}=25,40$ ;  $p<0,001$  em ANOVA de medidas repetidas), mas no dia seguinte ocorreu uma recuperação parcial do aprendizado original,

a qual foi completamente bloqueada pela infusão intra-hipocampal de ANI após o 8º teste de reativação ( $t_{(20)}=2,63$ ;  $p<0,05$  vs VEH no primeiro teste do dia 2). Este efeito foi ainda mais evidente quando ANI foi infundida após 4 testes de reativação ( $t_{(18)}=4,41$ ;  $p<0,001$  vs VEH no primeiro teste do dia 2; Figura 13C). A realização de 4 testes consecutivos na ausência da plataforma de escape também levou à redução do tempo gasto no quadrante alvo ( $F_{(3,57)}=18,67$ ;  $p<0,001$  em ANOVA de medidas repetidas), mas os animais controle recobram completamente a memória original 24 h após. Porém, esta recuperação espontânea não aconteceu naqueles animais que receberam ANI na região CA1 após o 4º teste de reativação.



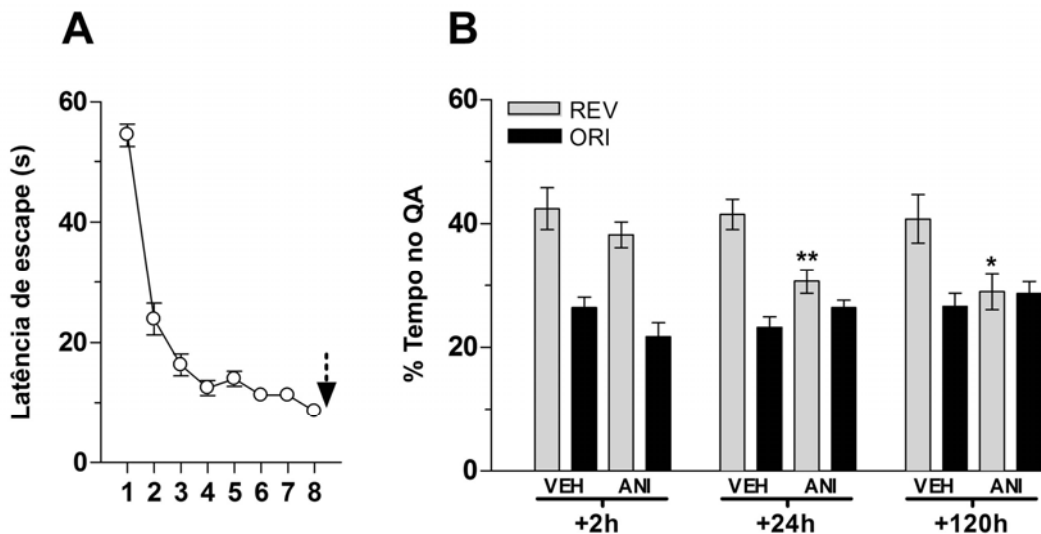
**Figura 13. A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a extinção, mas bloqueia a recuperação espontânea da memória espacial.** Animais com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão especial do LAM e, 24 horas após a última sessão de treino foram submetidos a 16 (A), 8 (B) ou 4 (C) testes consecutivos na ausência da plataforma de escape (Dia 1). Imediatamente após o último teste os animais receberam uma infusão bilateral de anisomicina (160 µg/lado; ANI) ou veículo na região CA1. A seta preta indica o momento de infusão. A retenção da memória foi avaliada durante 8 testes consecutivos adicionais realizados 24 horas após (DIA 2). Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da percentagem do tempo total de natação gasto no quadrante alvo (QA). \*\*\* $p<0,001$  e \* $p<0,05$  vs VEH no primeiro teste do Dia 2;  $n=8-11$  por grupo.

***II.4 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina após o aprendizado reverso no LAM bloqueia tanto a retenção da preferência espacial reversa como da original.***

Se após o estabelecimento da memória espacial no LAM, a localização da plataforma submersa é mudada para o quadrante oposto da piscina, os animais precisam criar um novo mapa espacial para substituir aquele formado durante o aprendizado original e assim serem ainda capazes de escapar da água. Este fenômeno denomina-se aprendizado reverso e é tido por alguns autores como uma forma especial de extinção, a qual, ao invés de expressar-se como a desapareição da resposta original se manifesta na forma de uma nova preferência espacial (Lattal et al., 2004). Apesar disto, é claro que a aquisição do aprendizado reverso se baseia fortemente no conhecimento que o animal tem acerca da posição original da plataforma de escape bem como em outros aspectos não espaciais e procedimentais do LAM, incluindo a habilidade de nadar e a de subir à plataforma assim como a ciência dessa possibilidade. De fato, o aprendizado reverso é rapidamente adquirido, o qual sugere que parte do traço mnemônico original é preservado e fornece informações acerca da nova posição da plataforma de escape durante o aprendizado reverso, representando assim, uma situação experimental na que novas informações são adicionadas ao traço já consolidado e, portanto, durante a qual pode se esperar que ocorra reconsolidação (Sara, 2000; Nader, 2003). Baseando-nos nestas idéias, resolvemos investigar se o

aprendizado reverso no LAM é resultado da extinção do aprendizado original ou se é consequência de um processo de labilização e reconsolidação do traço original. Nós hipotetizamos que, se o aprendizado reverso envolvesse extinção do traço original, então a inibição da extinção deveria prejudicar a aquisição da preferência reversa mantendo inalterada a memória original, i.e. um tratamento capaz de bloquear o aprendizado reverso deveria permitir a reinstalação da memória original. Ao contrário, se o aprendizado reverso fosse consequência da reconsolidação da memória original então, a inibição desse processo deveria prejudicar tanto a retenção da preferência reversa como a persistência do traço original, i.e. um tratamento capaz de bloquear o aprendizado reverso deveria também impedir a reinstalação da memória original. Para responder esta questão, treinamos animais por 5 dias na versão espacial do LAM. No sexto dia a plataforma de escape foi movida para o quadrante oposto da piscina e os animais foram treinados para encontrar a nova localização (ver Metodologia). Imediatamente após o treino no aprendizado reverso os ratos receberam uma infusão bilateral de ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1 do hipocampo dorsal (Figura 14) e a retenção da memória para a nova localização da plataforma foi avaliada mediante um teste na ausência da plataforma de escape realizado 2, 24 ou 120 h após. Como se pode observar na Figura 14B, os animais controle adquiriram a preferência pela nova localização enquanto que os que tratados com ANI (160 µg/lado) fracassaram em adquiri-la,

(PT 24 horas -  $t_{(36)}=3,54$ ;  $p<0,01$  vs VEH; e PT 120 horas -  $t_{(20)}=2,49$ ;  $p<0,05$  vs VEH). No entanto, o efeito amnésico da ANI não foi observado quando os animais foram testados 2 h após o treino no aprendizado reverso, sugerindo que a amnésia induzida pela infusão intrahipocampal de ANI não é imediata. Interessantemente, os animais que receberam ANI imediatamente após o treino no aprendizado reverso, além de não adquirirem a memória da nova localização não retiveram a preferência espacial pela localização inicial, indicando que a memória original também foi prejudicada (Figura 14B).



**Figura 14. A inibição de síntese protéica hipocampal bloqueia o aprendizado reverso e impede a reinstalação da memória original.** Animais com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM e, 24 h após a última sessão de treino foram submetidos a 8 treinos consecutivos de aprendizado reverso. **A)** Média das latências de escape ( $\pm$  SEM) para encontrar a plataforma durante o treino no aprendizado reverso. Imediatamente após a última largada do aprendizado reverso, os animais receberam uma infusão bilateral de anisomicina (160  $\mu$ g/lado; ANI) ou veículo na região CA1. A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um teste realizado 2, 24 ou 120 h após o aprendizado reverso. **B)** Preferência espacial durante o teste de 60 s, para os animais que receberam infusão bilateral de ANI (160  $\mu$ g/lado) ou VEH na região CA1 como indicado em A. Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da porcentagem do tempo de natação no quadrante original (ORI) e oposto/reverso (REV) em relação ao tempo total. \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  vs VEH;  $n=11-19$  por grupo.

***II.5 - A administração de D-cicloserina após uma sessão de evocação não reforçada no labirinto aquático de Morris melhora a retenção da memória espacial.***

Da mesma forma que a hipótese tradicional da consolidação só foi aceita após a comprovação da existência de drogas promnésicas, a corroboração conclusiva da existência de um processo reconsolidatório requer a demonstração de que o mesmo possa ser modulado positivamente por agentes farmacológicos. Alguns estudos sugerem que o processo de reconsolidação requer da ocorrência de alguns dos eventos moleculares necessários para a consolidação original do traço (Akirav e Maroun, 2006; Boccia et al., 2005; Inda et al., 2005; von Herten e Giese, 2005), o qual permite acreditar na possibilidade de que fármacos capazes de melhorar a consolidação de memórias possam também melhorar sua reconsolidação quando dados após uma sessão de evocação não reforçada. Por isso, e com o intuito de determinar se a retenção da memória espacial associada ao LAM podia ser melhorada farmacologicamente após sua reativação não-reforçada, decidimos avaliar o efeito da D-cicloserina (cSER) na perdurabilidade do traço. A cSER é um agonista do sítio da glicina no receptor NMDA e diversos estudos têm demonstrado que é capaz de acelerar o aprendizado de distintas tarefas (Akirav, 2006; Richardson et al., 2004; Andersen et al., 2002; Lelong et al., 2001). Primeiramente determinamos se a cSER era capaz de melhorar a aquisição da memória espacial no LAM. Para isso, os animais

foram treinados no LAM somente por dois dias, utilizando um protocolo que envolvia oito largadas/dia (ver Metodologia). Imediatamente após cada sessão de treino os ratos receberam uma injeção intraperitoneal de cSER (10 mg/kg) ou veículo e a retenção da memória foi avaliada 24 h após.

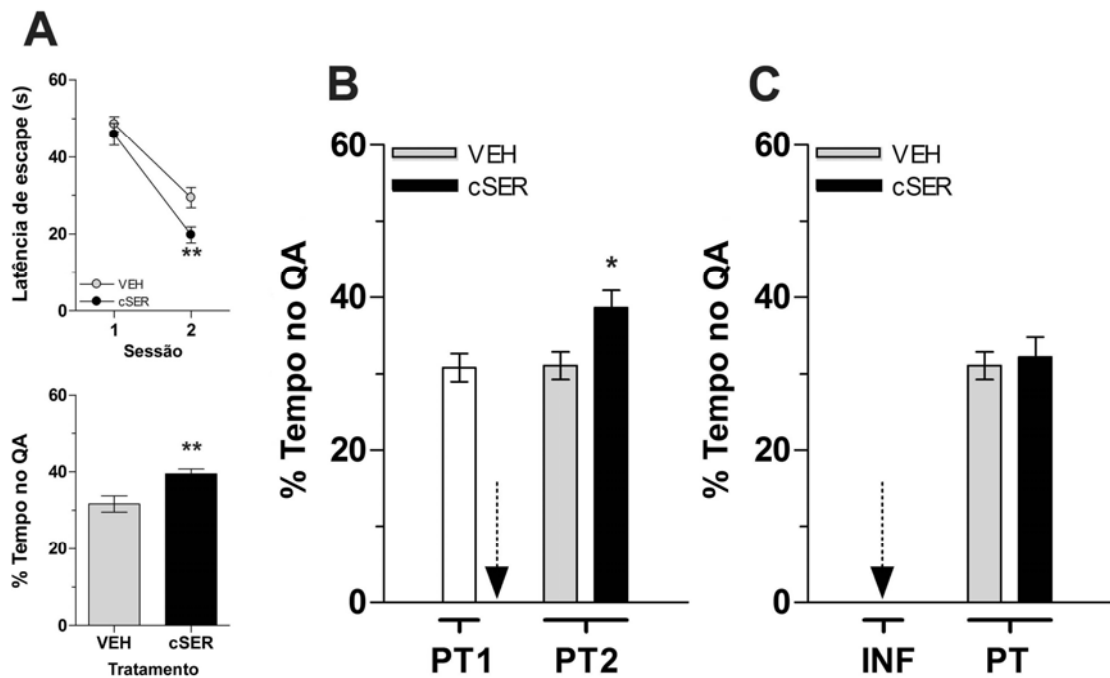
Como se pode observar na Figura 15A, os animais tratados com cSER acharam a plataforma de escape mais rapidamente que os animais controles durante o segundo dia de treino ( $t_{(20)}=2,87$ ;  $p<0,01$ ) e passaram mais tempo nadando no quadrante alvo durante uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape realizado 24 h após a finalização da fase de treinamento ( $t_{(20)}=3,18$ ;  $p<0,01$ ).

Após termos demonstrado que a administração i.p. de cSER aumenta a consolidação da memória espacial no LAM avaliamos se a cSER também poderia atuar na melhoria da reconsolidação. Para isso, treinamos animais na versão espacial do LAM durante dois dias e 24 horas após a última largada do segundo dia de treino realizamos um teste de retenção na ausência da plataforma de escape. Imediatamente depois administramos VEH ou cSER (10 mg/kg; i.p.). Os animais que receberam cSER logo após a reativação na ausência da plataforma de escape (Figura 15B) mostraram um aumento na retenção da memória durante um segundo teste de evocação não reforçado ( $t_{(16)}=2,65$ ;  $p<0,05$ ).

Para averiguar se a administração i.p. de cSER (10 mg/kg) poderia estar influenciando *per se* a retenção da memória espacial, treinamos animais

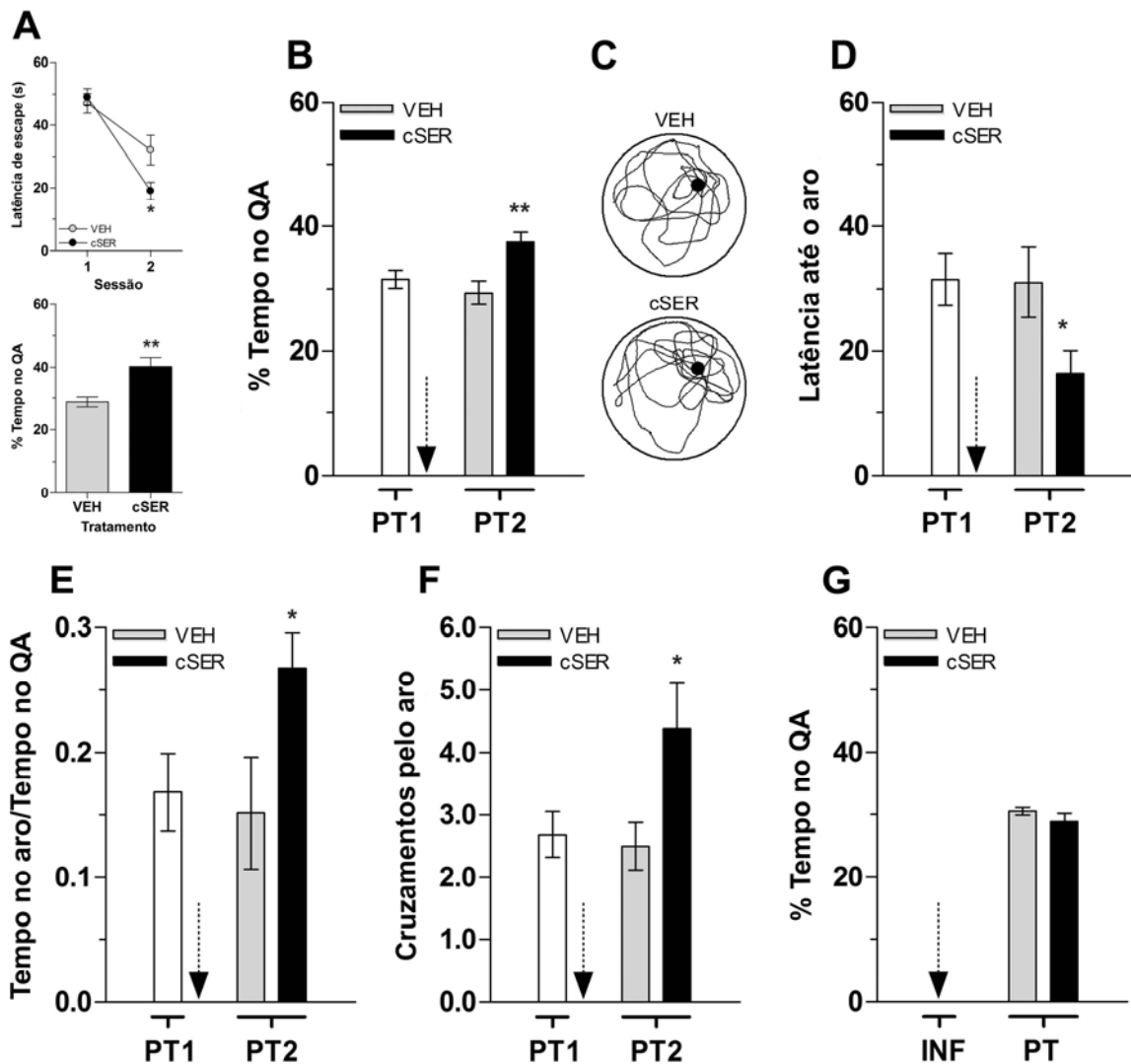


no LAM durante dois dias e, 24 horas após a última sessão de treino, administramos cSER (10 mg/kg; i.p.) realizando um teste de retenção 24 horas depois. Como se pode observar na Figura 15C tanto os animais tratados com cSER como os controles passaram o mesmo tempo no quadrante alvo durante o teste de retenção, indicando que a cSER não modifica a força do traço quando administrada na ausência de um estímulo comportamental relevante.



**Figura 15. A D-cicloserina melhora a retenção da memória espacial quando administrada i.p. após um teste na ausência de plataforma de escape.** **A)** (Acima) Média das latências de escape durante 2 dias de aquisição do aprendizado espacial para ratos que receberam D-cicloserina (10 mg/kg; cSER; círculos pretos) ou veículo (VEH; círculos brancos) i.p. imediatamente após a última largada de cada sessão de treino. Os dados estão apresentados como médias  $\pm$  SEM em blocos de 8 largadas. \*\* $p < 0,01$  vs VEH;  $n = 11$  por grupo. **A)** (Abaixo) Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam D-cicloserina (10 mg/kg; cSER; barra preta) ou veículo (VEH; barra branca). Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$  vs VEH;  $n = 11$  por grupo. **B)** Animais foram treinados durante 2 dias na versão espacial do LAM e, 24 horas após a última sessão de treino foram submetidos a um teste na ausência da plataforma de escape. Imediatamente após o teste os animais receberam uma infusão de D-cicloserina (10 mg/kg; cSER) ou veículo (VEH) i. p. A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 h após o primeiro. Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da porcentagem do tempo total de natação gasto no quadrante alvo (QA). \*\* $p < 0,05$  vs VEH durante o PT2;  $n = 9$  por grupo. **C)** Animais foram tratados exatamente como em **B** exceto que eles não foram submetidos a um teste um dia após a última sessão de treino. cSER (10 mg/kg) ou VEH foram administrados i.p. 24 h pós treino (INF) e a retenção da memória foi avaliada em um teste (PT) realizado 24 h após a infusão;  $n = 8-9$  por grupo.

Uma vez que a administração i.p. de cSER após um teste de reativação na ausência da plataforma de escape é capaz de produzir um incremento na retenção da memória espacial em questão, decidimos investigar se este efeito poderia ser mimetizado pela infusão intrahipocampal de cSER. Para tal, submetemos animais aos mesmos experimentos descritos acima, com a diferença de que a administração de cSER (10 µg/lado) foi realizada através de cânulas de infusão localizadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal. Os animais infundidos bilateralmente na região CA1 com cSER (10 µg/lado) acharam a plataforma de escape mais rapidamente que os animais controles durante a segundo dia de treino (Figura 16A;  $t_{(14)}=2,38$ ;  $p<0,05$ ) e passaram mais tempo nadando no quadrante alvo durante uma sessão de teste na ausência da plataforma de escape realizado 24 h após a finalização da fase de treinamento ( $t_{(14)}=3,58$ ;  $p<0,01$ ). Igualmente, os animais que receberam cSER logo após o teste de reativação na ausência da plataforma de escape (Figura 16) mostraram durante o segundo teste: a) um aumento na memória em um segundo teste de retenção ( $t_{(14)}=3,29$ ;  $p<0,01$ ); b) uma diminuição na latência de entrada em um aro virtual de 24 cm de diâmetro centralizado na posição original da plataforma ( $t_{(14)}=2,17$ ;  $p<0,05$ ); c) um aumento no tempo de natação dentro do aro ( $t_{(14)}=2,20$ ;  $p<0,05$ ) bem como no número de cruzamentos através deste ( $t_{(14)}=2,29$ ;  $p<0,05$ ).



**Figura 16. A D-cicloserina melhora a retenção da memória espacial quando dada na região CA1 do hipocampo dorsal após um teste na ausência de plataforma de escape.** **A)** (Acima) Média das latências de escape durante 2 dias de aquisição do aprendizado espacial para ratos que receberam D-cicloserina (10 µg/lado; cSER) ou veículo (VEH) na região CA1 imediatamente após a última largada de cada sessão de treino. Os dados estão apresentados como médias ± SEM em blocos de 8 largadas. \*\**p*<0,05 vs VEH; n=8 por grupo. **A)** (Abaixo) Média do tempo gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste realizado 24 h após o último dia de treino para animais que receberam cSER (10 µg/lado) ou VEH. Os dados estão apresentados como a média ± SEM. \*\**p*<0,01 vs VEH; n=8 por grupo. **B)** Animais foram treinados durante 2 dias na versão espacial do LAM e, 24 horas após a última sessão de treino foram submetidos a um teste na ausência da plataforma de escape. Imediatamente após o teste os animais receberam cSER (10 µg/lado) ou VEH na região CA1. A seta preta indica o momento da infusão. A retenção da memória foi avaliada em um segundo teste de 60 s (PT2) realizado 24 h após o primeiro. Os dados estão apresentados como a média (± SEM) da porcentagem do tempo total de natação gasto no QA. \*\**p*<0,01 vs VEH durante o PT2; n=8 por grupo. **C)** Percursos representativos durante o PT2 para animais que receberam VEH ou cSER na região CA1 imediatamente após PT1. **D)** Latência para a entrada no aro (ver Metodologia) para os animais mostrados em **B**; \**p*<0,05 vs VEH durante PT2. **E)** Relação entre o tempo no aro/tempo no QA para os animais mostrados em **B**; \**p*<0,05 vs VEH durante PT2. **F)** Número de cruzamentos pelo aro para os animais mostrados em **B**; \**p*<0,05 vs VEH durante PT2. **G)** Animais foram tratados exatamente como em **B** exceto que não foram submetidos a um teste um dia após a última sessão de treino. cSER (10 µg/lado) ou VEH foram infundidos na região CA1 24 h pós treino (INF) e a retenção da memória foi avaliada em PT realizado 24 h após a infusão; n=8 por grupo.

Estes dados confirmaram que a administração de cSER imediatamente após o teste de reativação na ausência da plataforma de escape

aumentou a retenção da memória espacial no LAM. A infusão intra-hipocampal de cSER 24 h após o treino no LAM na ausência de um evento comportamental relevante não induziu qualquer alteração na retenção da memória espacial previamente adquirida (Figura 16G).

***II.6 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina bloqueia a memória de longa duração para o reconhecimento de objetos, mas não afeta a memória de curta duração.***

Visando analisar se a síntese protéica hipocampal é necessária para a formação da memória de reconhecimento, treinamos ratos na tarefa de reconhecimento de objetos (ver Metodologia) e, em diferentes tempos após a sessão de treino, eles foram infundidos bilateralmente com VEH ou ANI (160 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória foi avaliada 24 h após o treino. Durante esta sessão de teste, os animais foram expostos durante 5 minutos a um dos objetos que tinha sido apresentado durante o treino juntamente com um objeto novo.

Como se pode observar na Figura 17, os animais que receberam VEH após o treino mostraram uma exploração muito maior do objeto novo do que do objeto familiar, independentemente do tempo transcorrido entre a finalização da sessão de treino e o momento da infusão ( $p < 0,0005$  no teste  $t$  de Student para amostra única, valor de referência=50;  $t_{(13)}=5,54$ ;  $t_{(9)}=8,97$  e  $t_{(9)}=9,77$  para animais infundidos 0, 180 e 360 min pós-treino, respectivamente).

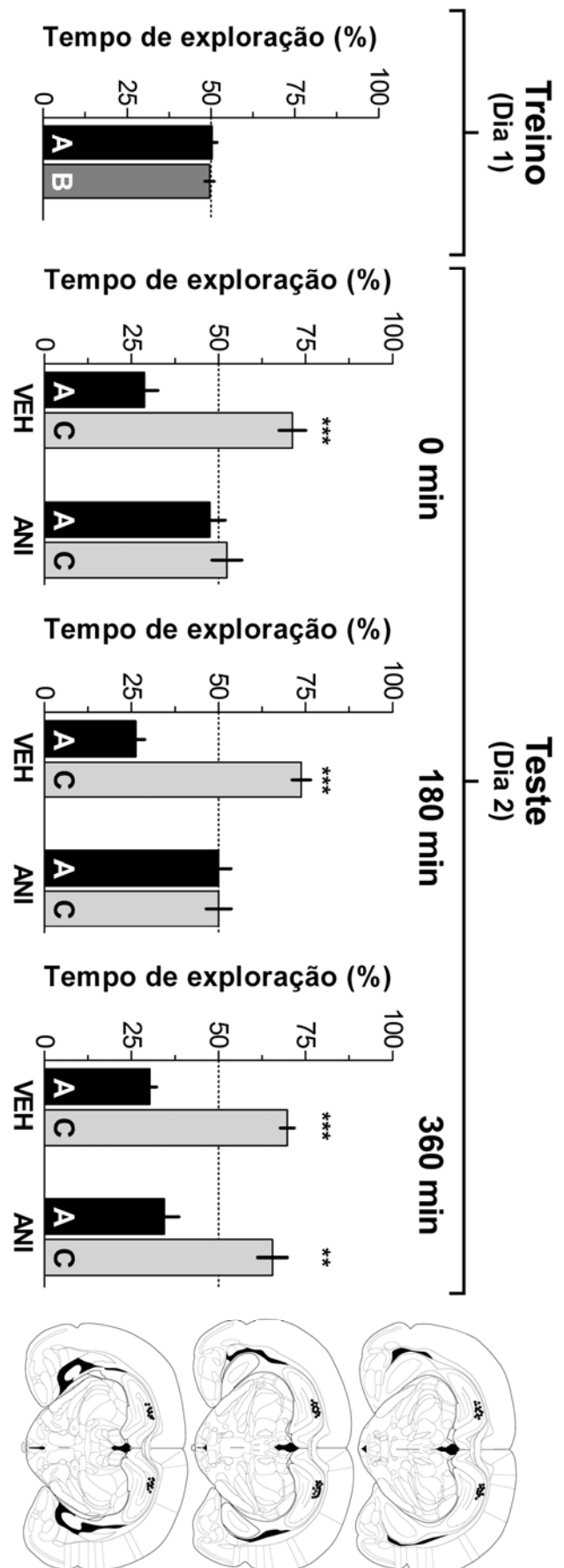


Figura 17. A síntese protéica hipocampal é requerida durante uma restrita janela de tempo após o treino para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos. No dia 1 (Sessão de treino) os ratos (n=74) foram expostos por 5 min a 2 objetos diferentes (A e B) e diferentes tempos após isto (0, 180 ou 360 min) receberam uma infusão bilateral de veículo (VEH) ou anisomicina (ANI; 160 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No dia 2 (Sessão de teste) os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min. Os dados estão apresentados como a média (± SEM) da percentagem de tempo de exploração de um objeto em particular em relação ao tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0.0005$  e \*\* $p < 0.005$  no teste *t* de Student; n=10-15 por grupo. Note-se que os animais que receberam ANI imediatamente após o treino passam a mesma quantidade de tempo explorando os objetos A e C durante a sessão de teste (Dia 2; 0 min – ANI), indicando que a memória de reconhecimento foi prejudicada. Na parte direita da figura, observa-se um desenho retirado do Atlas de Paxinos e Watson, 1986 mostrando a localização das cânulas de infusão na região CA1 dorsal para aqueles animais que receberam ANI.

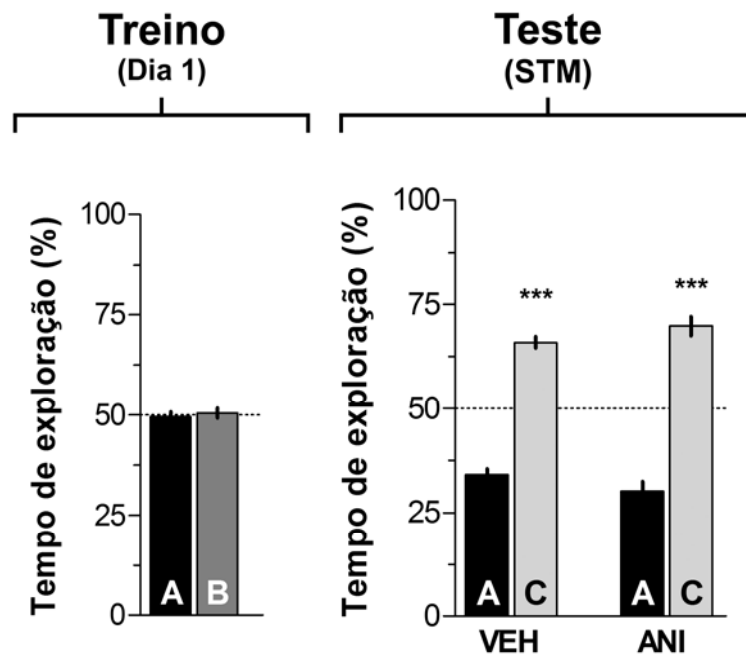
No entanto, os animais que receberam infusão intra-hipocampal de ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) imediatamente (0 min) ou 180, mas não 360 min após o treino passam a mesma quantidade de tempo explorando o objeto novo e o familiar durante a sessão de teste (Figura 17).

Isto sugere que a inibição da síntese protéica hipocampal imediatamente e 180 min após o treino bloqueia a consolidação da memória de reconhecimento de objetos de longa duração.

Sabido é que uma das diferenças mais notáveis entre as memórias de longa (LTM) e de curta duração (STM) é sua sensibilidade à ação de inibidores da síntese protéica (Quevedo et al., 2004; Izquierdo et al., 2002; Schafe e LeDoux, 2000). Portanto nos valemos desta diferença entre LTM e STM para avaliar se o efeito amnésico da ANI devia-se efetivamente à inibição da consolidação da LTM de reconhecimento ou, pelo contrário, devia-se simplesmente a um efeito inibitório sobre a capacidade de expressão do traço. Assim, treinamos e infundimos os animais com ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) ou VEH como indicado acima mas os mesmos foram testados 3 horas após para determinar a retenção da memória de curta duração.

Como se pode observar na Figura 18, tanto os animais controle como os tratados com ANI mostraram preferência pelo novo objeto durante a sessão de teste ( $p < 0,0005$  no teste  $t$  de Student;  $t_{(7)} = 11,30$  e  $t_{(7)} = 8,62$ , respectivamente), indicando que a inibição da síntese protéica hipocampal logo após o treino não afeta a retenção da STM para a tarefa

de reconhecimento de objetos e sugerindo então que o efeito amnésico demonstrado para a LTM se deve efetivamente ao bloqueio do processo de consolidação.



**Figura 18.** A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a memória de reconhecimento de curta duração. Ratos (n=16) foram expostos por 5 min a 2 objetos diferentes (A e B) e imediatamente após receberam a infusão bilateral de veículo (VEH) ou anisomicina (ANI; 160 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Três horas após (Sessão de teste/Teste STM), os animais foram expostos por 5 minutos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C). Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da porcentagem de tempo de exploração de um objeto em particular em relação ao tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,0005$  no teste  $t$  de Student; n=8 por grupo.

### ***II.7 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina 24 horas antes do treino não altera o estado de ansiedade, a atividade exploratória nem a formação de memórias dependentes do hipocampo.***

Para averiguar se a infusão intrahipocampal de ANI exerceria alguma ação tardia no estado de ansiedade ou na atividade exploratória dos animais que pudesse mascarar a evocação da LTM de reconhecimento de objetos, infundimos bilateralmente VEH ou ANI e submetemos os

animais, os mesmos foram submetidos a uma sessão comportamental no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado 24 horas após a infusão. Como se pode observar na Tabela 3 ANI 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. Similarmente, a ANI não alterou nem o número de cruzamentos nem o número de elevações durante uma sessão comportamental de 5 min de duração num campo aberto. Em conjunto estes resultados indicam que quando infundida no hipocampo 24 h antes da avaliação comportamental ANI não modifica nem o estado de ansiedade nem a atividade motora dos animais.

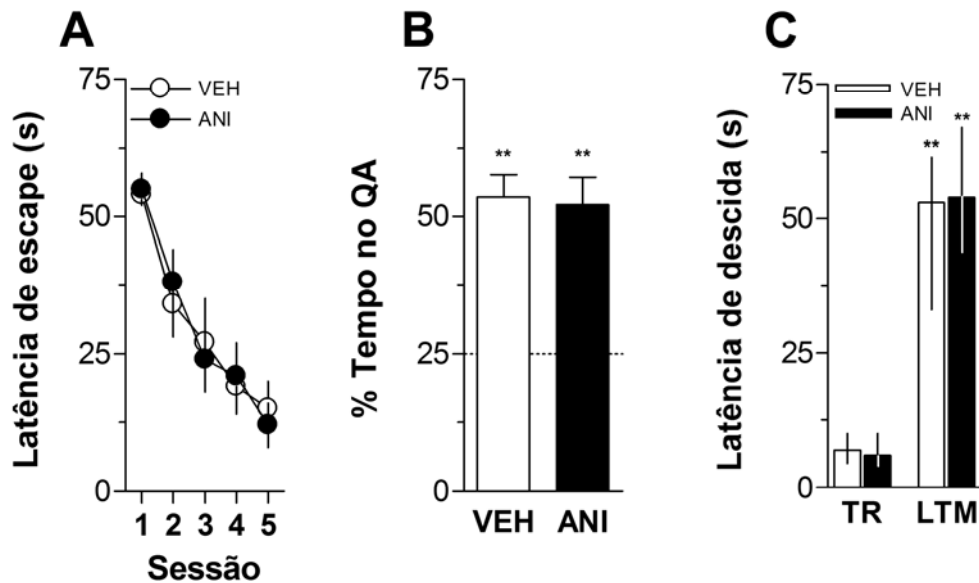
	<i>VEH</i>	<i>ANI</i>
<b>Total de entradas</b>	20.3 ± 1.9	18.2 ± 1.5
<b>Entradas nos braços abertos</b>	8.2 ± 0.9	9.0 ± 0.7
<b>% Tempo nos braços abertos</b>	25.6 ± 4.1	28.5 ± 4.8
<b>Cruzamentos</b>	77.3 ± 6.8	74.6 ± 8.1
<b>Elevações</b>	18.8 ± 2.0	23.6 ± 3.9

**Tabela 3. A infusão de anisomicina na região CA1 do hipocampo dorsal não afeta a atividade exploratória e locomotora ou o estado de ansiedade.** ANI (160 µg/lado) foi infundida bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes de uma sessão comportamental no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como a média (± SEM) do número total de entradas, do número de entradas nos braços abertos e da percentagem de tempo gasto nos braços abertos (Labirinto em cruz elevado; n= 10 por grupo) e do número de cruzamentos e elevações (Campo aberto; n= 10 por grupo). VEH= veículo. Grupos diferentes de animais foram utilizados em cada teste comportamental.

Além disso, ratos infundidos bilateralmente na região CA1 com ANI (160 µg/lado) não mostraram nenhum déficit remanescente na sua capacidade



de aprendizado após 24 horas. De fato, como se pode observar nas Figs 19A e 19B os animais treinados na versão espacial do LAM 24 horas após a infusão de ANI adquiriram e retiveram a preferência espacial tão bem como o grupo controle. Similarmente, quando infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal com ANI (160 µg/lado) 24 h antes do treino na tarefa da esquiwa inibitória de sessão única, os ratos aprenderam normalmente a resposta condicionada aversiva (Figura 19C).



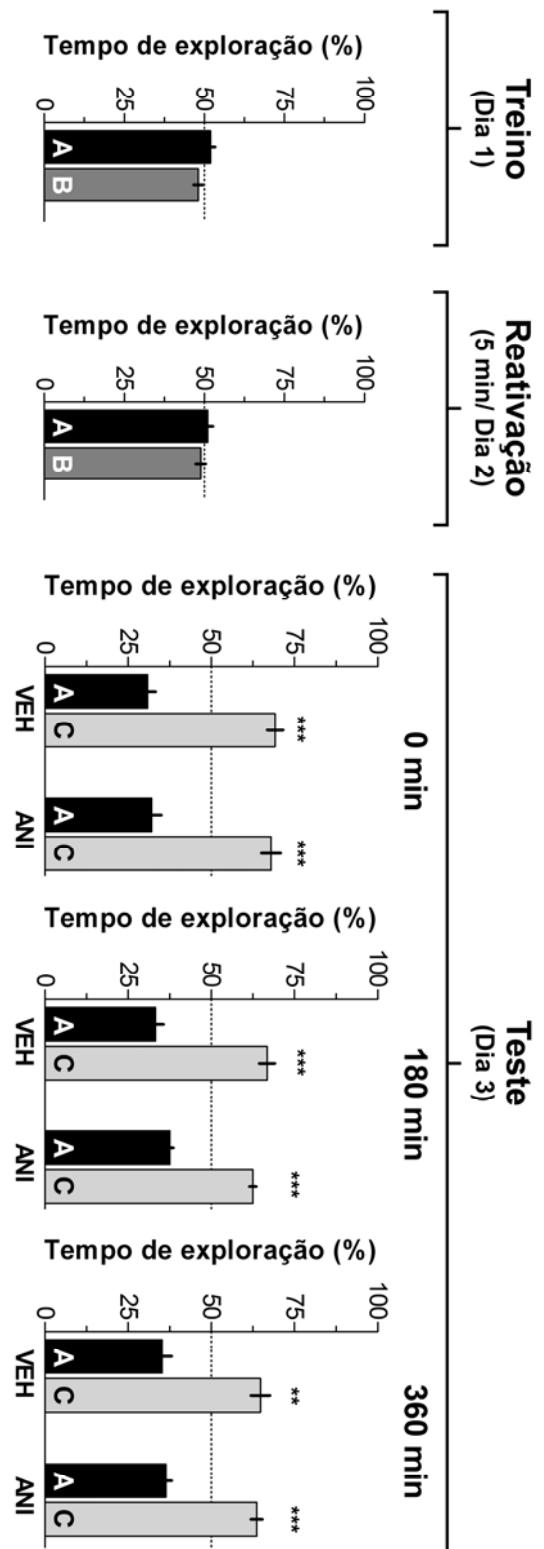
**Figura 19. A inibição da síntese protéica hipocampal 24 horas antes do treino não afeta a aquisição nem a retenção de memórias dependentes do hipocampo. A)** Média das latências de escape durante os cinco dias de aquisição do aprendizado espacial para ratos ( $n=16$ ) que receberam anisomicina (160 µg/lado; ANI) ou veículo (VEH) na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes da primeira sessão de treino. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  SEM por bloco de 8 largadas. **B)** Percentagem do tempo total gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste de 60 s realizado 24 horas após o 5º dia de treino para os animais mostrados em **A**. Os dados estão apresentados como a média  $\pm$  SEM. \*\* $p<0,005$  no teste  $t$  de Student para uma amostra (valor de referência=25%). **C)** Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal ( $n=18$ ) receberam uma infusão bilateral de ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1 do hipocampo dorsal e, 24 horas mais tarde, foram treinados na tarefa da esquiwa inibitória de sessão única. Os dados estão apresentados como a mediana  $\pm$  intervalo interquartil da latência de descida durante a sessão de treino (TR) ou a sessão de teste da memória de longa duração (LTM) realizada 24 horas após o treino. \*\* $p<0,005$  vs o respectivo valor de TR no teste U de Mann-Whitney.

***II.8 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina não afeta a retenção da memória para o reconhecimento de objetos quando a sessão de reativação é igual a de treino.***

Após termos realizado experimentos onde verificamos que a síntese protéica hipocampal se faz necessária para a formação da memória de reconhecimento de longa duração decidimos investigar que papel ela desempenha na manutenção das memórias reativadas. Como mencionado, muitos estudos sugerem que após a evocação, memórias consolidadas tornam-se novamente vulneráveis e para persistir necessitam passar por um processo de re-estabilização dependente da síntese protéica denominado reconsolidação (Nader et al., 2000b; Eisenberg e Dudai, 2004). Alguns estudos indicam que a reconsolidação pode empregar as mesmas regiões cerebrais necessárias à consolidação (ver acima; Przybylski e Sara 1997; Przybylski et al. 1999; Sara, 2000; Kida et al. 2002; Pedreira et al. 2002; Bozon et al. 2003). Conseqüentemente, a inibição da síntese protéica hipocampal após a evocação da memória de reconhecimento poderia anular a estabilidade do traço reativado. Para testar esta hipótese, no dia 1 (Sessão de treino) os animais foram expostos a dois objetos diferentes. No dia 2 (Sessão de reativação) os animais foram re-expostos por 5 min aos mesmos dois objetos com o intuito de reativar o traço da memória de reconhecimento e imediatamente (0 min) 180, ou 360 min após eles foram infundidos

bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal com VEH ou ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ).

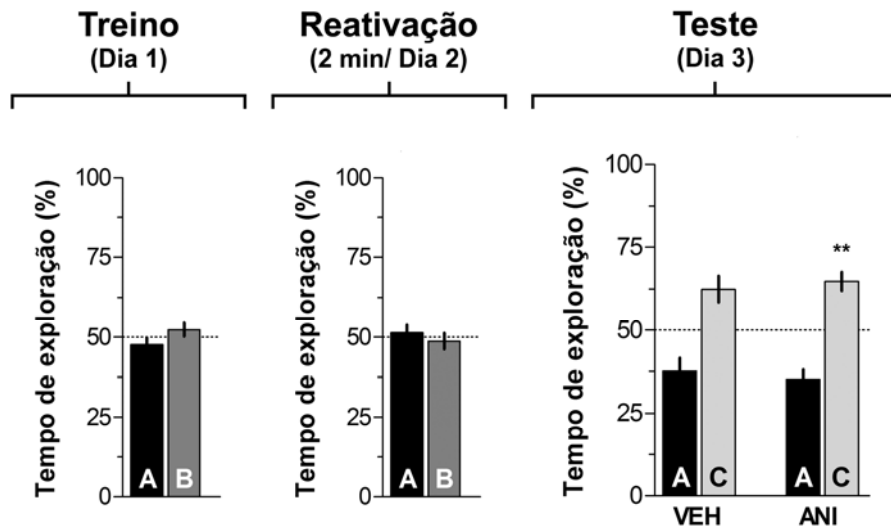
Se a síntese protéica se fizesse necessária para a reconsolidação da memória de reconhecimento poderia se esperar que, quando combinamos um objeto familiar com um objeto novo um dia após a reativação (Sessão de teste), os animais que recebem ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) ao final da sessão de reativação não mostrem nenhuma preferência por qualquer objeto e explorem ambos igualmente. No entanto, como se pode observar na Figura 20, ambos os grupos de animais tratados quanto controles quando confrontados com o objeto familiar e com o objeto novo no dia 3 (Sessão de teste) mostram preferência de exploração ao objeto novo ( $p < 0,0005$  no teste  $t$  de Student;  $t_{(9)}=7,90$  e  $t_{(12)}=6,18$ , respectivamente), indicando que a memória do objeto familiar não foi anulada pela inibição hipocampal de síntese protéica logo após a sessão de reativação. Como se pode observar na Figura 20 uma completa falta de efeito na persistência da memória também foi obtida quando administramos ANI 180 ( $p < 0,0005$ ;  $t_{(9)}=7,14$  e  $t_{(9)}=12,55$  para os animais infundidos com VEH e ANI) ou 360 min após a reativação ( $p < 0,0005$ ;  $t_{(9)}=5,26$  and  $t_{(9)}=7,98$  para os animais infundidos com VEH e ANI).



**Figura 20. A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a objetos familiares não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento.** Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal (n=64) foram expostos por 5 min a dois objetos distintos (A e B; Sessão de treino; Dia 1). Vinte quatro horas após, os animais foram re-expostos por 5 minutos aos mesmos dois objetos para reativação do traço mnemônico (Sessão de reativação; Dia 2) e, diferentes tempos após (0, 180 ou 360 min), receberam uma infusão bilateral de anisomicina (160 µg/lado; ANI) ou veículo (VEH) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória foi avaliada 24 horas depois mediante exposição dos animais a um objeto familiar A e um objeto novo C (Sessão de teste, Dia 3). Note-se que os animais passam mais tempo explorando o objeto novo que o familiar sem importar o tratamento recebido, indicando que a memória foi preservada. \*\*\* $p < 0,0005$  e \*\* $p < 0,005$  no teste  $t$  de Student; n=10-13 por grupo.

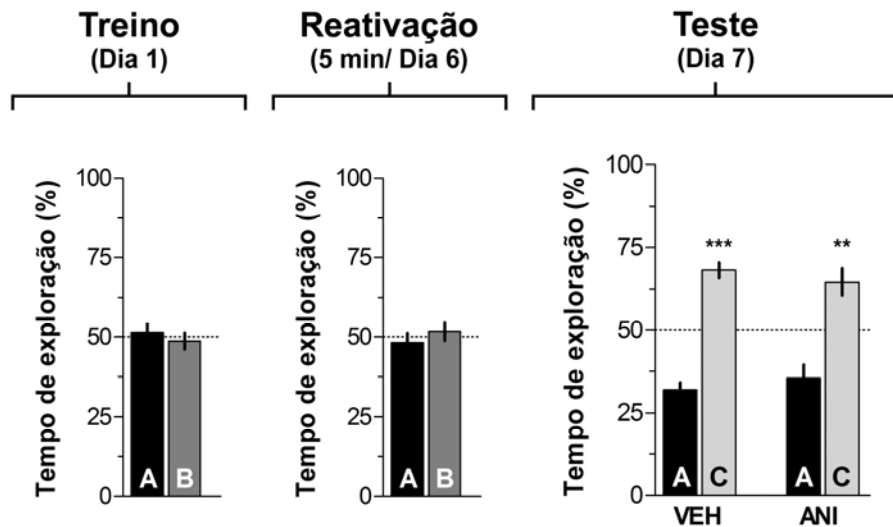
Uma vez que nenhum efeito foi observado na administração intra-hipocampal de ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) na reconsolidação do traço mnemônico quando este é reativado na presença dos mesmos objetos e já que muitos estudos sugerem que os efeitos pós-evocação de alguns agentes amnésicos dependem da duração da sessão de reativação e da idade do traço mnemônico.

Decidimos analisar se uma sessão de reativação mais curta seria capaz de dar início à reconsolidação da memória de reconhecimento. Para tanto, animais foram treinados como indicado acima e 24 h após foram submetidos a uma sessão de reativação de 2 min, logo após esta sessão os animais receberam uma infusão bilateral de VEH ou ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) na região CA1 e a retenção foi avaliada 24 h depois. Como se pode observar na Figura 21, tanto os animais controle como os tratados com ANI passam mais tempo explorando o objeto novo que o objeto familiar durante uma sessão de teste ( $p < 0,05$ ;  $t_{(9)} = 3,12$ ;  $p < 0,005$ ;  $t_{(9)} = 5,23$ , respectivamente). Isto sugere que a duração da sessão de reativação não influencia na ausência de efeitos da ANI, dada pós-evocação, na persistência da memória.



**Figura 21.** A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação breve envolvendo exposição a objetos familiares não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal ( $n=20$ ) foram expostos por 5 min a dois objetos distintos (A e B; Sessão de treino; Dia 1). Vinte quatro horas após, os animais foram submetidos a uma sessão de reativação foi de 2 min de duração, e receberam VEH ou ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) imediatamente após esta. \*\* $p<0,005$  e \* $p<0,05$  no teste  $t$  de Student;  $n=10$  por grupo.

Ainda, com o objetivo de investigar se a ocorrência de reconsolidação foi dependente da idade do traço da memória de reconhecimento, treinamos animais na tarefa de reconhecimento de objetos e os submetemos a uma sessão de reativação 5 dias após o treino. Imediatamente após a reativação os animais foram infundidos bilateralmente na região CA1 com VEH ou ANI (160  $\mu\text{g/lado}$ ) e a retenção foi mensurada 24 horas após. Como se pode ver na Figura 22, a idade do traço mnemônico não tem efeito na falta de ação da ANI na retenção da memória de reconhecimento ( $p<0,0005$ ;  $t_{(10)}=7,99$  e  $p<0,005$ ;  $t_{(10)}=3,28$  para os animais tratados com veículo e anisomicina respectivamente).



**Figura 22.** A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a objetos familiares realizada cinco dias após o treino não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal ( $n=22$ ) foram expostos por 5 min a dois objetos distintos (A e B; Sessão de treino; Dia 1). Cinco dias após o treino foram submetidos a uma sessão de reativação, e receberam VEH ou ANI (160  $\mu\text{g}/\text{lado}$ ) imediatamente após esta. Em todos os casos os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da porcentagem do tempo de exploração de um objeto em particular com relação ao tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,0005$  e \*\* $p < 0,005$  no teste  $t$  de Student;  $n=11$  por grupo.

O efeito negativo da inibição da síntese protéica na persistência das memórias reativadas é muito observado após sessões de evocação não reforçadas, mas não quando a sessão de reativação foi novamente uma sessão de evocação inalterada (isto é, uma sessão na qual a memória foi expressa, mas a possibilidade de extinção foi prevenida; Cammarota et al., 2004), ou quando uma sessão de reativação ocorre na presença exata das mesmas pistas e estímulos daqueles da sessão de treino (isto é, uma segunda sessão de treino; Cammarota et al., 2003; Gainutdinova et al., 2005; Eisenberg e Dudai, 2004). Note que este último exemplo se aplica perfeitamente ao desenho experimental apresentado na Figura 20.

***II.9 - A infusão intra-hipocampal de anisomicina bloqueia a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos quando durante a fase de reativação se apresenta um objeto novo.***

A inibição da síntese protéica após a reativação da memória prejudica a posterior retenção quando o reforço, se presente durante a reativação, não equivale exatamente às expectativas derivadas do aprendizado original. Esta observação sugere que a reconsolidação pode atuar não somente por salvar o traço mnemônico da desestabilização induzida pela evocação não reforçada, mas, pode também ajudar a incorporar novas informações às memórias já consolidadas (Rodriguez-Ortiz et al., 2005). Por esta razão, nós decidimos analisar se a inibição da síntese protéica hipocampal afeta a persistência da memória de reconhecimento quando a reativação acontece ao longo da incorporação de nova informação. Para isto, no dia 1 expusemos os ratos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 min (Sessão de treino). No dia 2 os animais foram novamente expostos por 5 min a um dos objetos que havia sido apresentado durante a sessão de treino (objeto A) e outro objeto novo (objeto C) e, logo após, os animais foram infundidos bilateralmente com ANI (160 µg/lado) ou VEH na região CA1. Os animais foram randomicamente divididos em três grupos experimentais e, a retenção da memória foi avaliada 24 h após (Sessão de teste). Durante a sessão de teste o grupo 1 foi exposto ao objeto A e o objeto novo D; o grupo 2 foi exposto aos objetos B e D e o grupo 3 aos objetos C e D (veja Figura 23). Como esperado, os animais



que recebem VEH após a reativação da memória passam mais tempo na sessão de teste explorando o objeto novo (objeto D) que os outros objetos, mostrando que eles lembram do objeto A (Figura 23; Sessão de teste - Grupo 1, VEH;  $p < 0,0005$ ,  $t_{(10)} = 6,82$ ) e do objeto B (Figura 23; Sessão de teste - Grupo 2, VEH;  $p < 0,005$ ,  $t_{(10)} = 3,76$ ) que foram apresentados no dia 1, e também adquirem a memória do objeto C apresentado durante a sessão de reativação no dia 2 (Figura 23; Sessão de teste - Grupo 3, VEH;  $p < 0,0005$ ,  $t_{(11)} = 7,04$ ). No entanto, como podemos observar na Figura 23 os animais que receberam ANI logo após a sessão de reativação passam a mesma quantidade de tempo explorando os objetos A e D (Figura 23; Sessão de teste - Grupo 1; ANI) e os objetos C e D (Figura 23; Sessão de teste - Grupo 2; ANI) indicando que a ANI prejudica a retenção da memória do objeto A e bloqueia a formação da memória do objeto C. Interessantemente, a memória para o objeto B (que não foi apresentado durante a sessão de reativação) não foi afetada pela infusão de ANI (Figura 23; Sessão de teste - Grupo 3; ANI;  $p < 0,0005$ ,  $t_{(8)} = 6,47$ ).

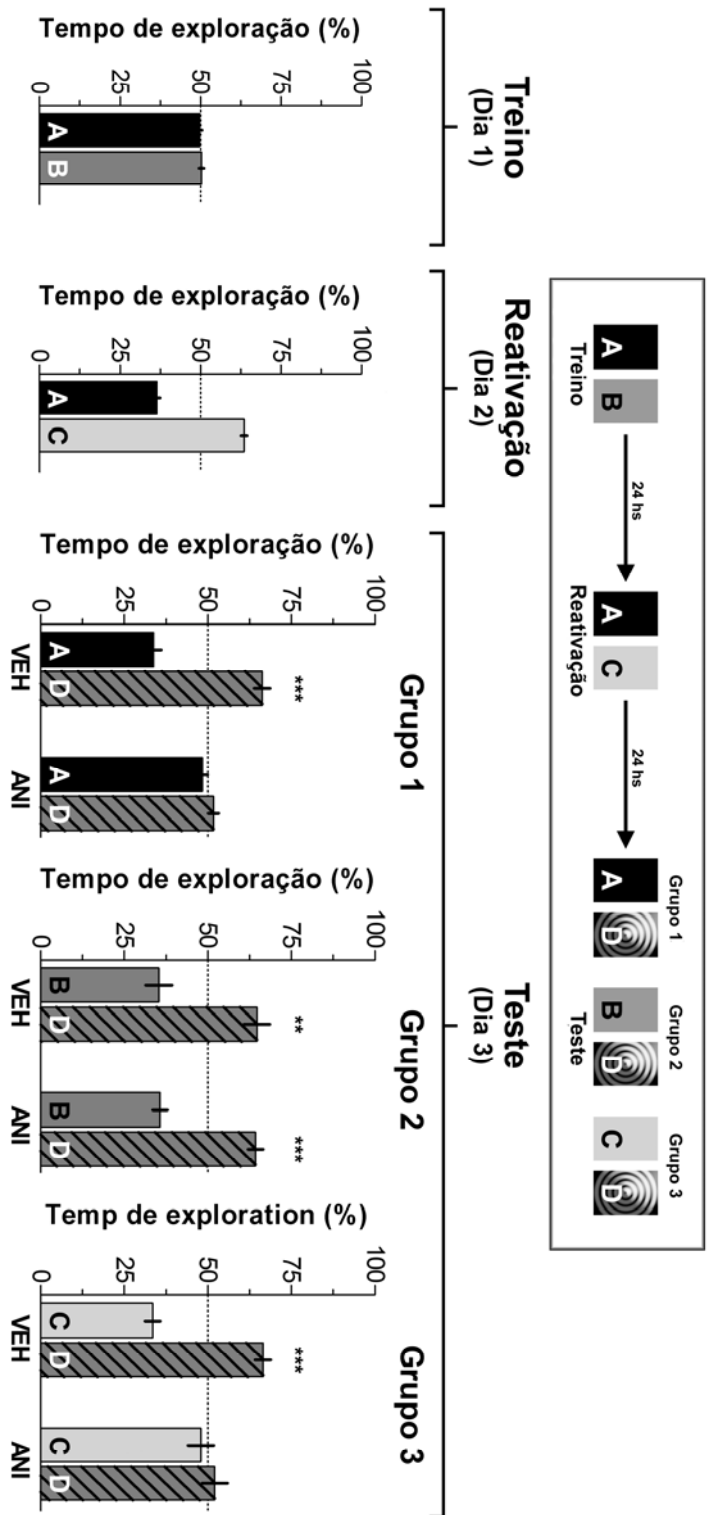
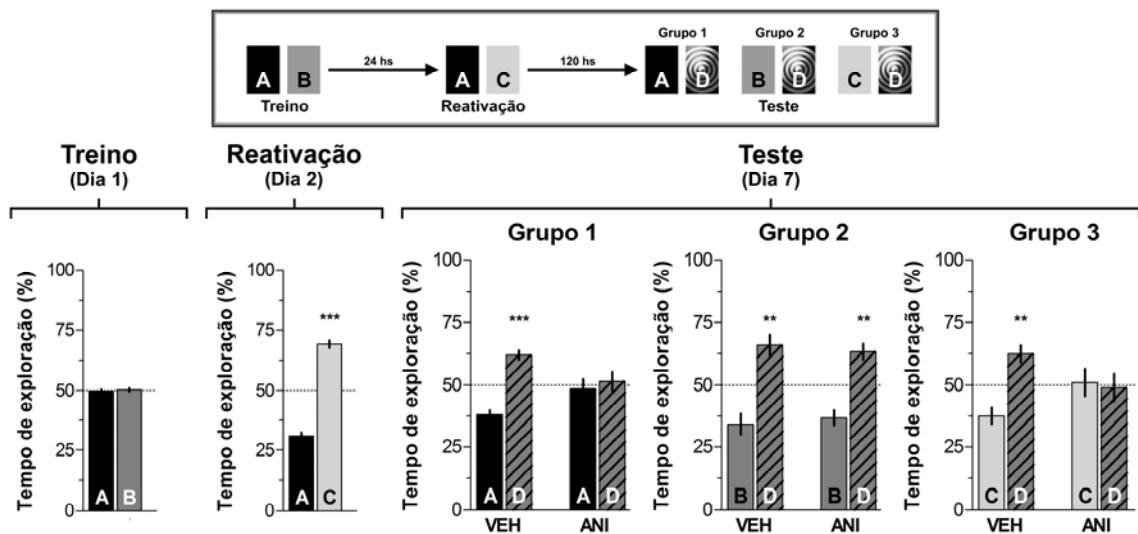


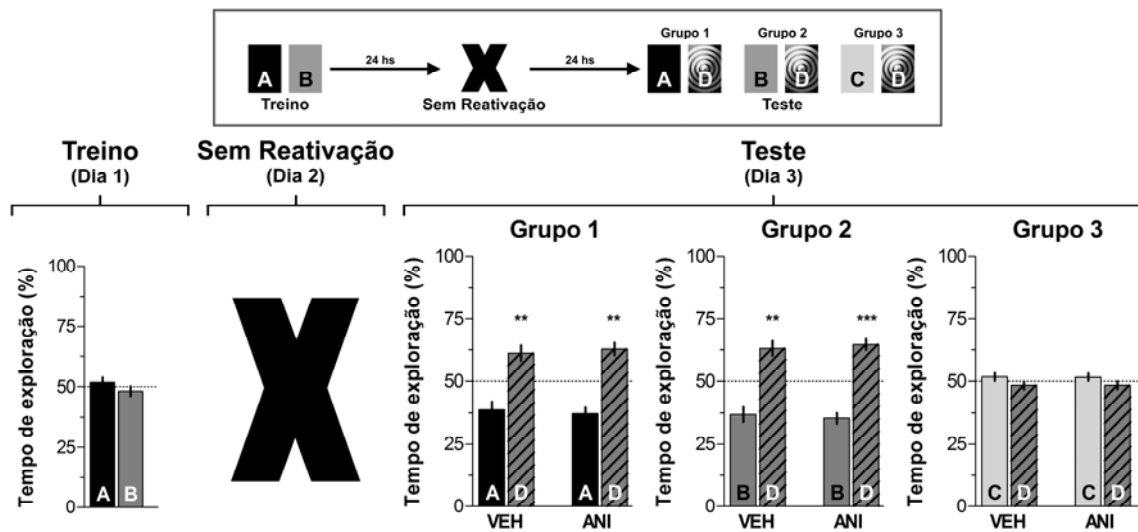
Figura 23. A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a um objeto novo e um familiar prejudica a memória desses objetos sem afetar a memória de outro objeto familiar não apresentado durante a sessão de reativação. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal (n=63) foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min (Sessão de treino; Dia 1). Vinte quatro horas após, os animais foram novamente expostos ao objeto A junto com um objeto novo C (Sessão de reativação; Dia 2). Após a fase de reativação os ratos foram randomicamente divididos em três grupos recebendo imediatamente após uma infusão bilateral de veículo (VEH) ou anisomicina (160 µg/lado; ANI) na região CA1. Vinte quatro horas após os animais foram submetidos a um teste de 5 min de duração (Sessão de teste; Dia 3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D, onde o objeto D é o novo. Note-se que ANI prejudica a retenção da memória para o objeto novo C e também para o objeto familiar A (que foi apresentado durante a sessão de reativação), mas poupa a memória para o objeto familiar B, ao qual não foi apresentado aos animais durante a fase de reativação. Os dados estão apresentados como a média (± SEM) da percentagem do tempo de exploração de um objeto em particular com relação ao tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,0005$  e \*\* $p < 0,005$  no teste *t* de Student; n=9–12 por grupo. No topo da figura observa-se uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

Para analisar se a amnésia induzida pela ANI foi temporária, animais foram treinados e testados como explicado acima, exceto que a sessão de teste foi realizada 120 ao invés de 24 horas após a reativação. Como mostra na Figura 24, o tempo passado entre a sessão de reativação e a de teste não tem efeito na amnésia provocada pela administração pós-reativação de ANI, sugerindo que este efeito não foi reversível. Importaneamente, a ANI não tem efeito na retenção da memória quando dada 24 h após a sessão de treino na ausência da reativação da memória (Figura 25).



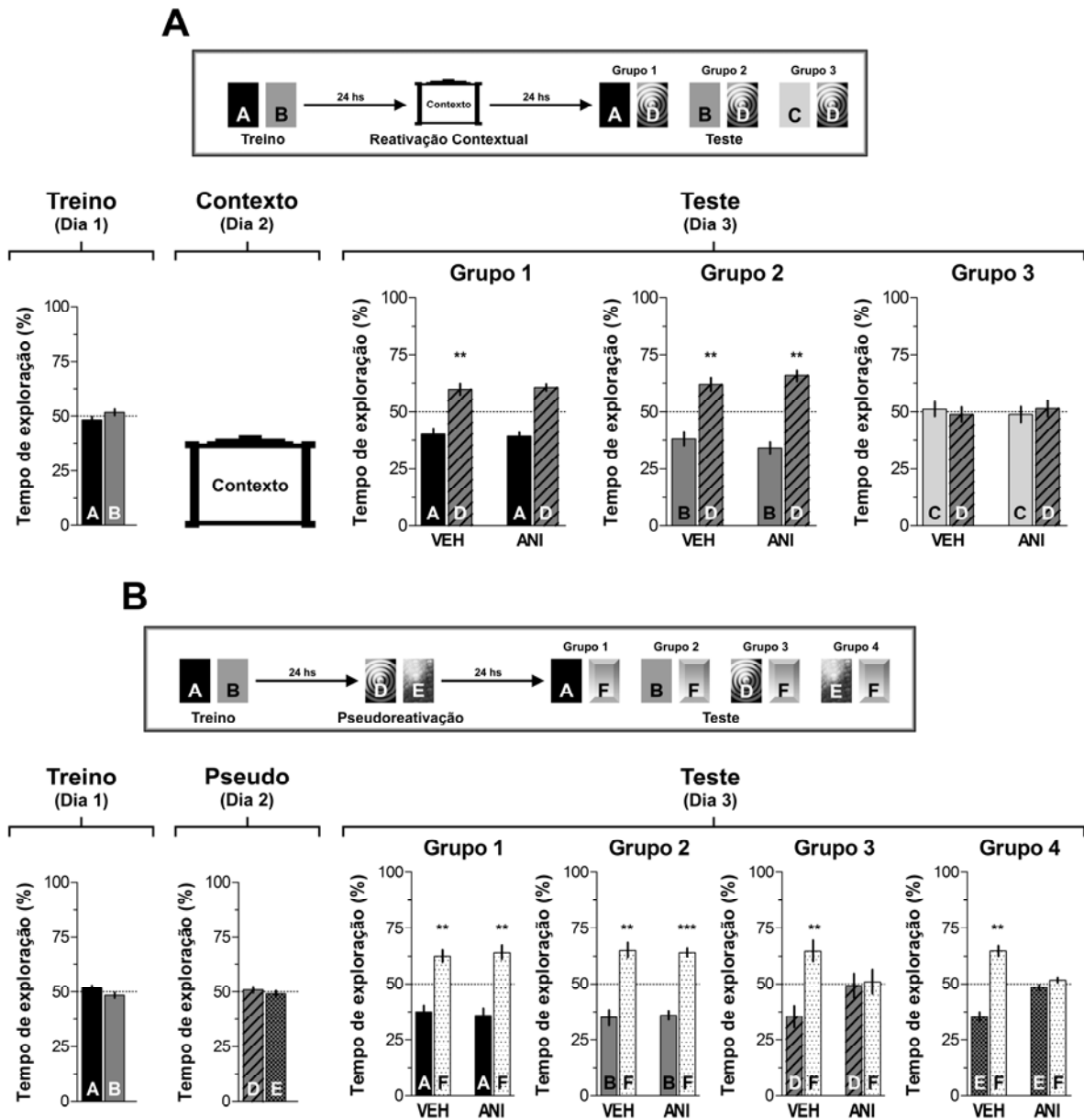
**Figura 24.** O tempo transcorrido entre a sessão de reativação e a sessão de teste não tem efeito sobre a amnésia causada pela infusão de ANI na região CA1 do hipocampo após a reativação do traço mnemônico. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal (n=59) foram expostos por 5 min a dois objetos diferentes (A e B; Sessão de treino; Dia1). Cinco dias após os animais foram expostos a um objeto familiar A e a um objeto novo C (Sessão de reativação; Dia 6). Após a sessão de reativação os ratos foram randomicamente divididos em três grupos e a seguir receberam uma infusão bilateral de veículo (VEH) ou anisomicina (160 µg/lado; ANI) na região CA1 do hipocampo dorsal. Vinte quatro horas mais tarde os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min de duração (Sessão de teste; Dia 7) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir. Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D, onde o objeto D é o novo. Note-se que ANI prejudica a retenção da memória para o objeto novo C e também para o objeto familiar A (que foi apresentado durante a sessão de reativação), mas poupa a memória do objeto familiar B, ao qual os animais não foram expostos durante a sessão de reativação. Os dados estão apresentados como a média (± SEM) da percentagem do tempo de exploração de um objeto em particular com relação ao tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,0005$  e \*\* $p < 0,005$  no teste *t* de Student; n=9–10 por grupo. No topo da figura observa-se uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

Sabe-se que pistas contextuais apresentadas durante o treino podem atuar como lembretes para promover a evocação da experiência aprendida (Spear, 1973; Sara, 2000). Isto sugere que somente a informação contextual, se salientada suficientemente, pode reativar o traço consolidado. Para determinar se a reconsolidação do traço de reconhecimento de objetos dependente de síntese protéica hipocampal pode ocorrer quando a informação contextual é dada sozinha, no dia 1 animais foram expostos por 5 min aos objetos A e B (Sessão de treino) e 24 h após foram submetidos a uma sessão de reativação contextual na ausência de objetos. Imediatamente após esta reativação os animais foram infundidos bilateralmente com VEH ou ANI (160 µg/lado) na região CA1 e, foram testados para a avaliação da retenção 24 horas após. Durante a sessão de teste ambos os grupos de animais controles ou tratados passam mais tempo explorando o objeto novo (objeto D) que o objeto familiar A ( $p < 0,005$ ;  $t_{(11)} = 3,91$  e  $p < 0,0005$ ;  $t_{(9)} = 7,17$  para os animais tratados com VEH e ANI, respectivamente) ou B ( $p < 0,005$ ;  $t_{(9)} = 4,18$  e  $p < 0,0005$ ;  $t_{(9)} = 6,18$  para os animais tratados com VEH e ANI, respectivamente) sugerindo que somente o contexto não é suficiente para reativar o traço e induzir reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos (Figura 26A). De fato, nós encontramos que a amnésia induzida pela infusão de ANI na região CA1 foi dependente da presença de ambos os objetos, familiar e novo durante a sessão de reativação.



**Figura 25.** A inibição da síntese protéica hipocampal 24 horas após o treino na ausência de eventos comportamentalmente relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal (n=60) foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min (Sessão de treino; Dia 1). Vinte quatro horas após a sessão de treino os animais foram randomicamente divididos em três grupos diferentes que receberam uma infusão bilateral de veículo (VEH) ou anisomicina (160 µg/lado; ANI) na região CA1 retornando às suas caixas moradia sem receber nenhum estímulo específico. Vinte quatro horas mais tarde os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min de duração (Sessão de teste; Dia 3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir. Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D, onde os objetos C e D são os objetos novos. Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da porcentagem do tempo de exploração de um objeto particular em relação ao tempo total de exploração. \*\*\* $p < 0,0005$  e \*\* $p < 0,005$  no teste *t* de Student; n=10 por grupo. No topo da figura há uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

Quando a ANI foi dada na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após uma sessão de pseudoreativação de 5 min (isto é, sessão comportamental durante a qual os animais devem explorar dois objetos diferentes daqueles apresentados na sessão de treino) ela não tem efeito na persistência da memória original (Figura 26B; Sessão de teste; Grupos 1 e 2), mas bloqueia a retenção da memória para os objetos introduzidos durante aquela sessão (Figura 26B; Sessão de teste; Grupos 3 e 4).



**Figura 26. A inibição da síntese protéica hipocampal após exposição ao contexto da caixa de treino ou uma sessão de pseudoreativação envolvendo exposição a dois objetos novos não afeta a memória de reconhecimento original. A)** Ratos com cânulas implantadas na região CA1 ( $n=64$ ) foram expostos por 5 min a dois objetos distintos (A e B; Dia 1). Vinte quatro horas depois os animais foram colocados na arena do campo aberto para que a explorassem livremente, na ausência dos objetos (Sessão de reativação contextual; Dia 2). Após a sessão de reativação os animais foram randomicamente divididos em três grupos e em seguida receberam uma infusão bilateral de veículo (VEH) ou anisomicina (160  $\mu\text{g}/\text{lado}$ ; ANI) na região CA1. Vinte quatro horas depois os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min de duração (Sessão de teste; Dia3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D, onde os objetos C e D eram novos.  $***p<0,0005$  e  $**p<0,005$  no teste  $t$  de Student;  $n=10-12$  por grupo. No topo da figura observa-se uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado. **B)** Ratos com cânulas implantadas na região CA1 ( $n=77$ ) foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min (Sessão de treino; Dia 1). Vinte quatro horas depois os animais foram expostos a dois objetos novos (D e E; Sessão de reativação; Dia 2). Após a sessão de reativação os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos diferentes recebendo imediatamente depois uma infusão bilateral de VEH ou ANI (160  $\mu\text{g}/\text{lado}$ ) na região CA1. Vinte quatro horas depois os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min de duração (Sessão de teste; Dia 3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto F; Grupo 2= Objeto B + Objeto F; Grupo 3= Objeto D + Objeto F; Grupo 4= Objeto E + Objeto F, onde F era o objeto novo. Note-se que a ANI prejudica a retenção da memória dos objetos D e E (que foram apresentados durante a sessão de pseudoreativação), mas poupa a memória dos objetos familiares A e B, aos quais os animais foram expostos durante a fase de treino. Os dados estão apresentados como a média ( $\pm$  SEM) da percentagem do tempo de exploração de um objeto particular em relação ao tempo total de exploração.  $***p<0,0005$  e  $**p<0,005$  no teste  $t$  de Student;  $n=8-10$  por grupo. No topo da figura observa-se uma representação esquemática dos protocolos comportamentais utilizados.

***PARTE III***

## ***I. Discussão***

---

Nossos resultados relacionados à memória espacial associada ao LAM mostram que:

- 1) A ANI quando injetada na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, mas não 3 ou 6 horas após o treino no LAM bloqueia a retenção da memória espacial.
- 2) A ANI dada na região CA1 do hipocampo dorsal após um único teste de retenção, realizado 24 ou 120 horas após o treino prejudica a memória durante um segundo teste feito 24 ou 120 horas, mas não 2 horas após; o efeito foi dependente do tempo e condicionado à evocação não reforçada do traço mnemônico.
- 3) A ANI quando dada na região CA1 do hipocampo dorsal não afeta a extinção, mas bloqueia a recuperação espontânea da memória espacial após uma série de testes de evocação consecutivos e não reforçados.
- 4) A ANI quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal após o aprendizado reverso bloqueia a retenção da preferência reversa, mas este bloqueio não resulta na reinstalação da memória espacial original.
- 5) A cSER melhora a retenção da memória quando dada sistemicamente ou na região CA1 do hipocampo dorsal, após o treino ou imediatamente após um teste de evocação não reforçado.



Muitos estudos mostraram que a inibição da síntese protéica em diferentes áreas cerebrais prejudica a consolidação da memória para distintas tarefas e em diferentes espécies, que vão desde os moluscos e artrópodes até pássaros e mamíferos (Crow e Forrester, 1990; Ramirez et al., 1998; Ezzeddine e Glanzman, 2003; Epstein et al., 2003; Barraco et al., 1981; Pedreira et al., 1996; Wustenberg et al., 1998; Igaz et al., 2002; Grunbaum e Muller, 1998; Menzel et al., 2001; Gibbs e Ng, 1978; Staubli et al., 1985). Além disso, muitos achados indicam a existência de uma janela de tempo crítica para a síntese protéica imediatamente após o treino, embora alguns estudos também apontem para uma segunda fase de sensibilidade da memória à inibição da síntese protéica, cerca de 3 a 6 horas após o treino (Grecksch e Matthies, 1980; Freeman et al., 1995). Totalmente de acordo com achados prévios que mostram que a ANI bloqueia completamente a memória espacial no LAM quando dada no ventrículo lateral logo após o treino, mas não em períodos mais tardios (Meiri e Rosenblum, 1998), nossos experimentos indicam que a retenção deste tipo de memória requer síntese protéica no hipocampo dorsal durante um breve período de tempo que inicia logo após o treino e vai até menos de 3 horas depois do mesmo (Figura 10).

O fato de que a infusão de ANI na região CA1 não afete a retenção da memória para a versão não espacial do LAM e que o efeito desta droga na memória espacial foi tanto dependente do tempo como reversível, indica claramente que a amnésia observada não foi devida a uma lesão

permanente na funcionalidade hipocampal ou a prejuízos no desempenho, mas sim a um efeito inibitório genuíno da ANI no processo de consolidação.

A teoria da consolidação comumente aceita postula que as memórias uma vez adquiridas passam por um processo de estabilização que envolve modificações plásticas na eficácia sináptica e na conectividade tornando o traço resistente a interferências (McGaugh, 1966). É obvio que as memórias consolidadas não são imutáveis: mudanças podem ser induzidas por falsas lembranças, aprendizados adicionais e influências neurohumorais durante a evocação (Loftus e Palmer, 1974; Izquierdo, 1989; Schacter e Dodson, 2001). No entanto, a teoria da consolidação por si só não prediz a existência de um mecanismo específico para explicar estas observações. Baseando-se em descobertas feitas décadas atrás (Misanin et al, 1968; Mactutus et al, 1979; Judge e Quartermain, 1982) uma considerável quantidade de evidências mostra que, quando evocadas sem reforço, as memórias já consolidadas entram em um estado vulnerável durante o qual se tornam novamente sensíveis à interferência de agentes amnésicos e, para persistir, necessitam passar por um processo de estabilização conhecido como reconsolidação (Sara, 2000; Nader, 2003; Eisenberg e Dudai, 2004; Lee et al., 2004).

Tem-se sugerido que extinção e reconsolidação são processos opostos e competitivos e que a susceptibilidade de um ou do outro à ação de inibidores da síntese protéica depende de qual deles sobressai para

direcionar o comportamento futuro (Nader, 2003; Dudai, 2004). O resultado da concorrência entre extinção e reconsolidação parece depender da duração e/ou do número de sessões de reativação da memória (Pedreira e Maldonado, 2003). Uma re-exposição breve, tal como a provocada por uma curta sessão de evocação, pode induzir reconsolidação, no entanto, sessões mais longas ou repetidas resultam na extinção do traço mnemônico (Debiec et al., 2002; Eisenberg et al., 2003).

Nossos resultados indicam que uma única sessão de reativação não reforçada no LAM, incapaz *per se* de iniciar extinção, pode levar o traço da memória espacial a um estágio onde fica novamente vulnerável à inibição de síntese protéica hipocampal (Figura 11). A ação amnésica da administração intra-hipocampal de ANI é dependente do tempo de infusão, requer mais de duas horas para exercer seu efeito, é duradoura, independente da idade da memória que estava sendo reativada e foi observada somente após uma sessão de reativação não reforçada (Figura 11A e Figura 11B). Estes dados sugerem que o efeito amnésico de ANI na memória reativada não foi causado por uma ação tardia na evocação, mas provavelmente foi devido à inibição de um processo que estabiliza o traço evocado.

Nós também encontramos que, a repetição dos testes de reativação na ausência de reforço, possibilita a extinção da memória espacial. Quatro ou 8 testes consecutivos induziram extinção incompleta, como demonstrado

pelo fato de que a preferência espacial aprendida re-aparece espontaneamente 1 dia após a última sessão de reativação (Figuras 13B e 13C). Dezesesseis testes induziram uma extinção profunda, da qual a memória original não se recuperou espontaneamente 1 dia depois (Figura 13A). No entanto, embora tenha sido reportado que a injeção sistêmica de ANI antes da reativação da memória do LAM bloqueia tanto a reconsolidação como a extinção dependendo do número de testes não reforçados (Suzuki et al., 2004), nós encontramos que a infusão intra-hipocampal de ANI não afetou a extinção da memória espacial após 16 testes. Entretanto, a ANI bloqueou a recuperação espontânea da memória inicial que ocorreu após 4 ou 8 testes de reativação consecutivos (Figura 13B e 13C).

Estes resultados têm múltiplas implicações. Eles sustentam a hipótese da reconsolidação como proposto por Sara (2000) e Nader (2000a,b). Eles não necessariamente endossam a noção de que extinção e reconsolidação são processos que competem (Nader, 2003; Dudai e Eisenberg, 2004; Dudai, 2004), pelo menos não no que diz respeito à necessidade da síntese protéica hipocampal. A diferença do que acontece em outras tarefas, no caso da memória espacial associada ao LAM, é a reconsolidação, mas não a extinção o processo que depende da síntese protéica hipocampal (Cammarota et al., 2003). Ainda mais, nossos resultados também sugerem que a recuperação espontânea não é um fenômeno desestruturado que reflete o reaparecimento da memória

original simplesmente porque esta pode recuperar seu vigor em determinado contexto. Nós encontramos que a inibição da síntese protéica bloqueou a ocorrência da recuperação espontânea, e que esta dependeu do número prévio de sessões de teste. Estudos prévios mostraram que ela também é dependente do intervalo entre a aquisição e a extinção (Sandoz e Pham-Delègue, 2004). De fato, nós temos demonstrado recentemente que a extinção pode ser levada até um ponto no qual não ocorra recuperação espontânea e, o reaprendizado da tarefa original após o retreino requer de síntese protéica como se o animal tivesse que aprender a tarefa novamente (Camarota et al., 2003). Isto sugere que, sob certas circunstâncias, a reativação repetida do traço mnemônico na ausência de reforço pode induzir extinção debilitando alguns aspectos da associação original (Robbins, 1990). Desde esta perspectiva, os resultados apresentados nesta Tese Doutoral podem ser interpretados como uma indicação de que o destino das memórias espaciais expressadas na ausência de reforço depende do número de reativações. Se este número não for suficiente para induzir extinção, parte do traço é preservado e pode ser reconstruído através de um processo de reconsolidação dependente de síntese protéica hipocampal que resulta na recuperação da memória original. Por outro lado, quando o número de sessões de reativação não reforçadas ultrapassa certo limiar, a preferência espacial original não pode mais ser reconsolidada e então se extingue.

Em total concordância com esta hipótese, um estudo recente sobre recuperação espontânea do aprendizado apetitivo de abelhas, Stollhoff e colaboradores (2005) mostraram que a emetina, um inibidor de síntese protéica, não afeta a extinção, mas inibe a recuperação espontânea da memória extinta, concluindo que esta recuperação espontânea resulta da reconsolidação da resposta original.

Nossos resultados contradizem aqueles de Abel e Lattal (2001) que mostram que a injeção subcutânea de ANI em camundongos logo após a re-exposição ao LAM não tem efeito na ulterior retenção da memória espacial. Este resultado negativo foi previamente atribuído à duração da sessão de re-exposição usada (Suzuki et al., 2004) e, pode também estar relacionado ao fato de que o efeito dos inibidores da síntese protéica no processamento mnemônico é altamente dependente de distintas variáveis experimentais, incluindo tempo e via de administração bem como a tarefa e a espécie animal estudada. Esta observação pode ser importante para entender a diferença entre nossos resultados e aqueles de Abel e Lattal (2001) já que os camundongos apresentam um comportamento distinto aos ratos no LAM. Em particular, o comportamento de boiar e de tigmotaxia (nadar na borda do tanque) tende a ser mais pronunciado em camundongos que em ratos, podendo complicar a interpretação dos dados experimentais (D`Hooge e De Deyn, 2001).

Embora a implicação de nossos resultados possa parecer clara e direta, é necessário notar que eles foram obtidos usando um protocolo

comportamental, que se repetido suficientemente, induz o desaparecimento comportamental da resposta aprendida. Então, existe algum paradigma comportamental capaz de induzir a reconsolidação da memória espacial como um produto primário ou este é simplesmente um processo secundário à extinção incompleta da preferência espacial original? Durante o aprendizado espacial reverso os animais redirecionam a resposta original e aprendem a nadar para um quadrante diferente. Tem se sugerido que este comportamento envolve uma forma especial de extinção que é expressa como uma nova preferência espacial (Lattal et al., 2004), porém esta interpretação não exclui outras possibilidades. De fato, a aquisição da resposta reversa é muito mais rápida do que a original (Figura 14A) sugerindo que, provavelmente, muitos dos componentes não espaciais do traço original não são extintos durante o aprendizado reverso, mas, usados como uma base onde o traço espacial original é primeiro enfraquecido e depois mudado e estabilizado sob a forma de uma preferência reversa. Visto por este ângulo, o aprendizado reverso pode ser considerado por envolver reconsolidação da resposta original, um processo que no caso de uma situação de vida real pode ser extremamente adaptativo. Nós encontramos que a infusão de anisomicina imediatamente após o aprendizado reverso não só bloqueou a preferência reversa, mas também prejudicou a persistência da memória original (Figura 14B). Se o efeito amnésico da ANI no aprendizado reverso tivesse sido somente devido à inibição da extinção da memória original, a

preferência espacial inicial deveria ter reaparecido após o tratamento com ANI. Isto também deveria ter acontecido se a duração e a estabilidade do traço original forem independentes de um processo dependente de síntese protéica hipocampal iniciado pelo aprendizado reverso. Como mostra a Figura 14B, este não foi o caso. Ainda mais, 1 ou 5 dias após 8 sessões consecutivas do aprendizado reverso não há a mais mínima evidência de recuperação espontânea da preferência espacial original nos animais controle (Figura 14B), diferente do observado após 8 sessões de extinção (Figura 13B), o qual sugere que o aprendizado espacial reverso não é simplesmente o produto da extinção da memória original. Nossos achados sustentam a hipótese de que o aprendizado reverso envolve reconsolidação da resposta original com uma nova dica espacial mais do que extinção e sugerem que, talvez, a reconsolidação não seja somente induzida quando a evocação não reforçada é inefetiva para induzir extinção, mas também quando o reforço, ainda se presente, não equivalha exatamente à expectativa derivada do aprendizado prévio. Relacionado a isto, Rodriguez-Ortiz e colaboradores (2005), tem proposto que o processo de reconsolidação poderia ser parte de um mecanismo capaz de incorporar novas informações àquelas memórias previamente consolidadas.

Um argumento muito utilizado para contestar a hipótese da reconsolidação é que quase todas as conclusões a respeito deste processo resultaram de experimentos usando drogas conhecidas por



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

Nos experimentos que formam parte desta Tese Doutoral nós confirmamos e ampliamos achados prévios indicando que o agonista do sítio de união para glicina do receptor NMDA, cSER, acelera a consolidação e a retenção da memória espacial associada ao LAM. Mais importante ainda, nosso trabalho indica que a cSER administrada sistemicamente ou na região CA1 do hipocampo dorsal logo após um teste de evocação não reforçado, incapaz de induzir extinção, melhora a retenção da memória durante um segundo teste realizado 24 horas após (Figura 15 e Figura 16). O fato de que a cSER não afetou a retenção na ausência de reativação da memória demonstra que esta droga não age *per se*, e indica que o efeito pró-mnésico da administração de cSER após a evocação é dependente da reativação da memória espacial. Nossos resultados estão de acordo com um trabalho muito recente que mostra que a ativação da PKA (proteína cinase dependente de AMPc) na amígdala basolateral após a evocação aumenta a retenção da memória de

medo (Tronson et al., 2006). O processo mais plausível para descrever estes resultados é a reconsolidação.

A evocação não reforçada pode enfraquecer o traço reativado, mas, se a memória original persiste como acontece no trabalho de Tronson e colaboradores (2006) e em outros experimentos, então este enfraquecimento pode ser desfeito e permitir a re-estabilização do traço original. A ativação farmacológica da maquinaria molecular envolvida neste processo pode melhorar e levar a produção de uma memória reconsolidada mais forte do que a inicial. A possibilidade de um fenômeno semelhante a este está extensivamente documentada em mais de cem trabalhos que mostram drogas que induzem melhora da consolidação da memória (Lynch, 2002; Izquierdo et al., 2006; Izquierdo e McGaugh, 2000). Nossos resultados indicam que a consolidação da memória espacial associada ao LAM requer síntese protéica hipocampal após o treino durante uma janela temporal restrita. Também sugerem que a evocação labiliza a memória espacial, mas quando a expressão não reforçada é insuficiente para induzir extinção o traço desestabilizado recupera-se através de um processo de reconsolidação dependente do hipocampo, que é bloqueado pela infusão intra-hipocampal de ANI e melhorado por cSER, dada sistemicamente ou na região CA1 logo após a reativação da memória. Mais ainda, nossos dados indicam que a inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a extinção da memória espacial,

mas prejudica o aprendizado reverso, provavelmente devido ao bloqueio da reconsolidação da memória original.

Em relação aos resultados relacionados à memória de reconhecimento de objetos observamos que:

- 1) A ANI quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente ou 180 min, mas não 6 horas após o treino na tarefa do reconhecimento de objetos bloqueia a retenção da memória.
- 2) A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a memória de reconhecimento de curta duração.
- 3) A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a dois objetos familiares não afeta a retenção da memória de reconhecimento.
- 4) A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a um objeto familiar e um objeto novo prejudica a memória destes dois objetos, mas não afeta a memória do objeto familiar não apresentado durante a sessão de reativação.
- 5) A inibição hipocampal da síntese protéica após a exposição à arena do campo aberto ou a dois objetos novos não afeta a memória de reconhecimento.

Neste trabalho, nós mostramos que a infusão bilateral de ANI na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente e 180 min após a sessão de treino prejudicou significativamente a memória de reconhecimento de objetos se comparada aos animais que receberam veículo nos mesmos tempos. Importaneamente, o efeito da ANI não foi observado quando a droga foi infundida na região CA1 360 min após o treino indicando que a amnésia induzida foi devido ao bloqueio do processo de consolidação e não a um dano permanente à funcionalidade do hipocampo ou causada por um prejuízo no desempenho (Figura 17). Isto foi confirmado por experimentos que mostraram que a infusão pós-treino de ANI não afetou a retenção da memória de reconhecimento de curta duração (Figura 18) e por outros que demonstraram que: a) a infusão desta droga 24 horas antes do teste correspondente não modificou a exploração da arena do campo aberto ou o comportamento do animal no labirinto em cruz elevado (Tabela 1); b) os animais que receberam uma infusão bilateral de ANI na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes de começar a serem treinados na versão espacial do LAM ou na esquivia inibitória, dois paradigmas que envolvem diferentes tipos de memórias e requerem a integridade fisiológica da formação hipocampal (Camarota et al., 2000; Martin e Morris, 2002), adquiriram a preferência espacial e a resposta condicionada aversiva respectivas (Figura 19) tão eficazmente como os animais controle. Acredita-se que algumas regiões corticais podem ter uma participação mais proeminente que o hipocampo no processamento

da memória de reconhecimento de objetos (Mumby et al., 2001). No entanto, estudos recentes mostraram que a exposição a dois objetos novos bem como a re-exposição a estes mesmos objetos 24 horas mais tarde aumenta a fosforilação de membros da família ERK (proteína cinase regulada por sinais extracelulares) de MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) na região CA1 e no giro denteado, sugerindo que a consolidação e talvez também a evocação da memória de reconhecimento de objetos envolva a ativação da formação hipocampal (Kelly et al., 2003). O hipocampo exerce um papel central na reconsolidação de vários tipos de memórias (Sara, 2000; Myers e Davis, 2002; Dudai, 2006; ver acima). Porém, e apesar de que a teoria da reconsolidação postula que alguns dos eventos moleculares necessários para a consolidação inicial da memória são novamente requeridos para a reconsolidação do traço após sua reativação (Debiec et al., 2002, Myers e Davis, 2002), nós não detectamos nenhum efeito da ANI na persistência da memória do reconhecimento de objetos quando esta droga foi infundida na região CA1 após uma sessão de reativação envolvendo re-exposição a dois objetos familiares (Figura 20). A falta de efeito da ANI foi independente da duração da sessão de reativação (Figura 21) e da idade do traço da memória de reconhecimento (Figura 22), dois fatores que podem afetar a ocorrência de reconsolidação (Milekic e Alberini, 2002; Pedreira e Maldonado, 2003; Suzuki et al., 2004; Boccia et al., 2006). Este resultado negativo deveu-se, provavelmente, ao fato de que o

procedimento que empregamos para reativar o traço de reconhecimento atuou não só como uma sessão de evocação, mas também como uma segunda sessão de treino durante a qual nenhuma informação nova foi disponibilizada. Em relação a isto, análises comportamentais e bioquímicas recentes indicaram que o papel desempenhado pelo hipocampo durante o reconhecimento é limitado à detecção de novidade e à identificação de mudanças na configuração espacial (Wan et al., 1999; Hammond et al., 2004; Viola et al., 2000; Winograd e Viola, 2004; Aggleton e Brown, 2005; Moncada e Viola, 2006). De fato, tem sido mostrado que a lesão do hipocampo prejudica a formação da memória para aspectos conceituais e espaciais de uma experiência, mas deixa intacta aquela referida aos objetos que foram parte da mesma (Mumby et al., 2002). Outras regiões cerebrais, particularmente o córtex pré-frontal, parecem ser requeridas para discriminar os estímulos recentes dos previamente encontrados, ordená-los temporalmente e modular sua evocação (Rainer e Miller, 2000; Xiang et al., 2004; Hannesson et al., 2004a,b). Relacionado a isto, usando um protocolo de reativação que envolveu re-exposição a objetos familiares, recentemente demonstrou-se que a infusão de ANI no córtex pré-frontal bloqueia a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos (Akirav e Maroun, 2006).

Como mencionado anteriormente, as memórias tornam-se lábeis após a evocação e vários estudos sugerem que, para serem mantidas, requerem da ocorrência um processo dependente de síntese protéica (Dudai, 2006

para uma revisão recente). Porém, não há consenso acerca de se a reconsolidação é só uma repetição da consolidação ou um processo distinto (Alberini, 2005).

Embora algumas das conclusões derivadas da teoria da reconsolidação se ajustem perfeitamente ao modelo de memória ativa-inativa proposto por Lewis (Lewis, 1979) para explicar a amnésia dependente de dicas (Lewis et al., 1972; Bregman et al., 1976), vários estudos sugerem que muitos dos eventos moleculares envolvidos na consolidação não são recapitulados toda vez que a memória é evocada. De fato, tem-se proposto que o propósito da reconsolidação não é meramente reconstruir um traço que se tornou vulnerável após a reconsolidação, mas também integrar novas experiências às memórias previamente consolidadas (Nader et al., 2000; Sara, 2000; Rodriguez-Ortiz et al., 2005; ver acima). Se este fosse o propósito da reconsolidação, e considerando que durante o reconhecimento de objetos o hipocampo atua principalmente como um detector de novidade, então pode ser factível supor que o hipocampo seria necessário para modificar o traço de reconhecimento previamente consolidado após o animal detectar uma diferença entre o que ele esperava e o que realmente ocorreu. Para testar esta hipótese nos avaliamos se a inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo a apresentação de um objeto familiar e um novo, teria algum efeito na ulterior retenção do traço. Pensando que, se o hipocampo estivesse realmente envolvido na reconsolidação da memória

de reconhecimento então, a infusão de ANI após a reativação da mesma prejudicaria o reconhecimento daqueles objetos que foram apresentados durante a sessão de reativação e de treino, mas manteria intacta a memória do objeto familiar que foi apresentado somente durante a sessão de treino. Como pode ser visto na Figura 23 isto foi exatamente o que aconteceu. Ainda mais, ANI bloqueou a retenção da memória para o objeto novo apresentado durante a sessão de reativação. O efeito amnésico da ANI foi independente do tempo transcorrido entre a sessão de reativação e a de teste (Figura 24) e não foi observado na ausência da reativação (Figura 25) ou quando os objetos apresentados durante esta foram ambos novos (Figura 26B). Mais ainda, ANI não teve efeito na persistência da memória quando foi dada na região CA1 após uma sessão de reativação contextual na ausência de qualquer objeto (Figura 26A). Estes experimentos controles têm importantes implicações. Primeiro, eles indicam que o efeito da ANI pós-evocação é inquestionavelmente devido à amnésia da memória de reconhecimento e não consequência de um prejuízo no desempenho. Segundo, eles demonstram que a participação do hipocampo na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos está associada com a reativação do traço na presença de uma situação particular de pistas de evocação envolvendo os elementos familiares e novos. Terceiro, eles sugerem que a exposição ao contexto por si só não reativa o traço de reconhecimento efetivamente; pelo menos não a ponto de induzir reconsolidação



dependente do hipocampo. Esta falta de efeito pode ser atribuída ao fato de que os animais empregados em nossos experimentos foram pré-habitados à arena do campo aberto antes de serem treinados, por esta razão, a importância relativa do contexto como um preditor da ocorrência de um set específico de objetos e sua habilidade para desencadear a evocação foi seguramente grandemente diminuída.

Nossos resultados sustentam à hipótese de que a síntese protéica hipocampal é requerida para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos e fortalece a noção de que o traço de reconhecimento torna-se lábil após a evocação, necessitando de uma fase reconsolidatória dependente do hipocampo para ser mantido. Outros estudos mostraram que diferentes regiões corticais são requeridas para a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos quando a evocação foi provocada por objetos familiares. Especificamente Kelly e colaboradores (Kelly et al., 2003) mostraram que a infusão intra-cérebro-ventricular de um inibidor da via de sinalização da ERK1/2, bloqueia a persistência do traço de reconhecimento e, Akirav e Maroun (2006) reportaram a participação do córtex pré-frontal ventro-medial neste processo. Mais ainda, Bonzon e colaboradores (2003) apontaram que camundongos mutantes para zif286 são incapazes de evocar novamente o traço de reconhecimento após sua reativação.

Nossos resultados indicam que o hipocampo só é engajado na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos quando a

evocação ocorre concomitantemente com a aquisição de nova informação, mas não quando o traço é reativado completamente durante uma segunda sessão de treino. Se considerados em conjunto com os estudos mencionados acima (Kelly et al., 2004; Bonzon et al., 2003; Akirav e Maroun, 2006), nossos experimentos sugerem que, como acontece durante a consolidação (Izquierdo et al., 2006) diferentes áreas do cérebro estão também envolvidas na reconsolidação, talvez em aspectos diferentes do processamento do traço mnemônico ou permitindo a incorporação de informações novas ao conjunto já existente.

Nossos resultados não excluem a possibilidade de que uma nova memória esteja sendo formada durante a reativação parcial do traço original em presença de um objeto novo, e de que, portanto, o efeito amnésico da ANI seja devido ao bloqueio da consolidação deste novo traço e não à reconsolidação da memória original. No presente é impossível discriminar conclusivamente estas duas possibilidades.

É importante destacar que muitos dos experimentos apresentados aqui, como a maior parte dos resultados apóiam a hipótese da reconsolidação, foram obtidos usando o antibiótico ANI. Assim como muitos outros agentes farmacológicos ANI tem efeitos colaterais. Conseqüentemente, uma outra ação, além da inibição da síntese protéica, poderia ser responsável pelo efeito amnésico sobre o traço reativado produzido por este composto. Esta possibilidade foi recentemente sugerida por Rudy e colaboradores (2006) e previamente por Routtemberg e Rekart (2005).

Porém, é importante destacar que na dose utilizada em nossos estudos ANI bloqueia especificamente a síntese protéica hipocampal (Quevedo et al., 1999; Cammarota et al., 2004) e que a possibilidade de que a amnésia observada fosse devida a algum efeito deletério desta droga sobre a funcionalidade do hipocampo foi descartada com os experimentos controles apropriados.

## **II. Conclusões**

---

Os resultados desta Tese Doutoral indicam que:

- A inibição da síntese protéica hipocampal durante um breve período pós-treino bloqueia a consolidação da memória espacial.
- A inibição da síntese protéica hipocampal após um único teste realizado 24 ou 120 horas após o treino prejudica a retenção durante um segundo teste feito 24 ou 120, mas não 2 horas após o primeiro teste. O efeito é dependente do tempo e condicionado à evocação não reforçada do traço mnemônico.
- A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a extinção, mas bloqueia a recuperação espontânea da memória espacial após uma série de testes de evocação consecutivos e não reforçados.
- A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a extinção, mas bloqueia a recuperação espontânea da memória espacial após uma série de testes de evocação consecutivos e não reforçados.
- A D-cicloserina melhora a retenção da memória espacial quando dada sistemicamente ou na região CA1 do hipocampo dorsal, após o treino ou imediatamente após um teste de evocação não reforçado.
- A inibição da síntese protéica hipocampal após o treino na tarefa do reconhecimento de objetos bloqueia a consolidação da memória de reconhecimento.

- A inibição da síntese protéica hipocampal não afeta a memória de reconhecimento de curta duração.
- A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a dois objetos familiares não afeta a retenção da memória de reconhecimento.
- A inibição da síntese protéica hipocampal após uma sessão de reativação envolvendo exposição a um objeto familiar e um objeto novo prejudica a memória desses dois objetos, mas não afeta a memória do objeto familiar não apresentado durante a fase de reativação.
- A inibição da síntese protéica hipocampal após a exposição à arena do campo aberto ou a dois objetos novos não afeta a memória de reconhecimento.

Em síntese, os experimentos apresentados neste trabalho indicam que, após serem evocadas, as memórias já consolidadas podem tornar-se novamente vulneráveis à ação de inibidores de síntese protéica. Isto sustenta a hipótese de que, sob certas circunstâncias, as memórias são reconsolidadas após sua evocação, e que este processo é dependente de síntese protéica. Muitas evidências indicam que o hipocampo tem um papel chave na consolidação e na reconsolidação de diferentes memórias. A evocação não reforçada pode causar extinção e/ou reconsolidação, dois processos que afetam a retenção da memória de

maneiras opostas. Nossos resultados no LAM sugerem a existência de um processo reconsolidatório dependente de síntese protéica hipocampal que opera recuperando e atualizando o traço enfraquecido pela evocação e sugerem que, semelhante ao processo de consolidação, o de reconsolidação não só pode ser bloqueado, mas também melhorado por tratamentos farmacológicos apropriados.

Os resultados obtidos a partir da análise da tarefa de reconhecimento de objetos indicam que o hipocampo é engajado tanto durante a consolidação como durante a reativação do traço mnemônico original, é que quando este último processo acontece concomitantemente com a apresentação de nova informação, ocorre um processo de reconsolidação dependente da síntese protéica hipocampal que permite a atualização da memória de reconhecimento.

***PARTE IV***

***I. Referências*** 

---

Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:180-187.

Aggleton JP, Brown MW (2005) Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q. J. Exp. Psychol. B.* 58:218-33.

Akirav I (2006) NMDA Partial Agonist Reverses Blocking of Extinction of Aversive Memory by GABA(A) Agonist in the Amygdala. *Neuropsychopharmacol.* 15.

Akirav I, Maroun M (2006) Ventromedial Prefrontal Cortex Is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory. *Cereb. Cortex.* 18.

Alberini CM (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* 28:51-6.



Andersen JM, Lindberg V, Myhrer T (2002) Effects of scopolamine and D-cycloserine on non-spatial reference memory in rats. *Behav. Brain Res.* 129:211-216.

Bahar A, Dorfman N, Dudai Y (2004) Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur. J. Neurosci.* 19:1115-1118.

Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y. (2003) The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur. J. Neurosci.* 17:1527-1530.

Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C (2003) Task solving by procedural strategies in the Morris water maze. *Phys. Behav.* 78:785-793.

Barraco DA, Lovell KL, Eisenstein EM (1981) Effects of cycloheximide and puromycin on learning and retention in the cockroach, *P. americana*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15:489-494.

Berman DE, Dudai Y (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 291:2417-2419.

Bevilaqua LR, Rossato JI, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2003) Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behav. Pharmacol.* 14:649-652.

Biedenkapp JC, Rudy JW. (2004) Context memories and reactivation: constraints on the reconsolidation hypothesis. *Behav. Neurosci.* 118:956-964.

Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM (2005) Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice: effects of a new different learning task. *Neurosci.* 135:19-29.

Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM (2006) Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learn. Mem.* 13:376-81.

Bonini JS, Bevilaqua LR, Zinn CG, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2006) Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm. Behav.* 50:308-313.

Bozon B, Davis S, Laroche S (2003) A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40:695-701.

Bregman N, Nicholas T, Lewis DJ (1976) Cue-dependent amnesia: permanence and memory return. *Physiol. Behav.* 17:267-70.

Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L (1997) Place cells and place navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:343-350.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH (2000) Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Mol. Brain Res.* 76:36-43-46.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Kerr D, Medina JH, Izquierdo I (2003) Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J. Neurosci.* 23:737-741.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I (2004) Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn. Mem.* 11:572-578.

Crow T, Forrester J (1990) Inhibition of protein synthesis blocks long-term enhancement of generator potentials produced by one-trial in vivo conditioning in *Hermissenda*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:4490-4494.

D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36:60-90.

da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M (2006) Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiol. Learn. Mem.* 86:100-106.

Dawson R G, McGaugh J L (1969). Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: Further examination. *Science* 166:525–527.

De Hoz L, Martin SJ, Morris RG (2004) Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory. *PLoS Biol.* 2:E225-227.

Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36:527-538.

Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Ann. Rev. Psychol.* 55:51–86.

Dudai Y (2006) Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16:174-8.

Dudai Y, Eisenberg M (2004) Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron.* 30:93-100.

Eisenberg M, Dudai Y (2004) Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *Eur. J. Neurosci.* 20:3397-3403.

Eisenberg M, Kobilov T, Berman DE, Dudai Y (2003) Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 301:1102-1104.

Ennaceur A, Aggleton JP (1994) Spontaneous recognition of object configurations in rats: effects of fornix lesions. *Exp. Brain Res.* 100:85-92.

Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31:47-59.

Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1996) Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behav. Brain Res.* 80:9-25.

Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1997) Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp. Brain Res.* 113:509-519.

Epstein HT, Child FM, Kuzirian AM, Alkon DL (2003) Time windows for effects of protein synthesis inhibitors on Pavlovian conditioning in *Hermisenda*: behavioral aspects. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79:127-131.

Ezzeddine Y, Glanzman DL (2003) Prolonged habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia* depends on protein synthesis, protein phosphatase activity, and postsynaptic glutamate receptors. *J. Neurosci.* 23:9585-9594.

Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. (2004) Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *J. Neurosci.* 24:1962-1966.

Freeman FM, Rose SP, Scholey AB (1995) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63:291-295.

Gainutdinova TH, Tagirova RR, Ismailova AI, Muranova LN, Samarova EI, Gainutdinov KL, Balaban PM (2005) Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis. *Learn. Mem.* 12:620-625.

Gaskin S, Tremblay A, Mumby DG (2003) Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus* 13:962-969.

Gibbs ME, Ng KT (1978) Memory formation for an appetitive visual discrimination task in young chicks. *Pharmacol Biochem Behav.* 8:271-276.

Grecksch G, Matthies H (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12:663-665.

Grunbaum L, Muller U (1998) Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J. Neurosci.* 18:4384-4392.

Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82:26-34.

Hannesson DK, Howland JG, Phillips AG (2004) Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. *J. Neurosci.* 24:4596-4604.

Hannesson DK, Vacca G, Howland JG, Phillips AG (2004) Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. *Behav. Brain Res.* 153:273-285.

Hebert AE, Dash PK (2004) Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 79:143-153.

Hernandez PJ, Kelley AE (2004) Long-term memory for instrumental responses does not undergo protein synthesis-dependent reconsolidation upon retrieval. *Learn. Mem.* 11:748-754.



Horne CA, Rodriguez WA, Wright TP, Padilla JL (1997) Time-dependent effects of fructose on the modulation of a reactivated memory. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 21:649-658.

Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I (2002) Two time periods of hippocampal RNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J. Neurosci.* 22:6781-89.

Inda MC, Delgado-Garcia JM, Carrion AM (2005) Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *J. Neurosci.* 25:2070-2080.

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

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* 29:496-505.

Izquierdo I, McGaugh JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.* 11:517-534.

Izquierdo I, Medina JH (1998) On brain lesions, the milkman and Sigmunda. *Trends Neurosci.* 21:421-24.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 103:1-11.

Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, de David e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I (2002) Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol. Neurobiol.* 22:269-287.

Judge ME, Quartermain D. (1982) Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiol. Behav* 28:585–590.

Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J. Neurosci.* 23:5354-5360.

Kerr DS, Bevilaqua LR, Bonini JS, Rossato JI, Kohler CA, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2005) Angiotensin II blocks memory

consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacol.* 179:529-535.

Kida S, Josselyn SA, de Ortiz SP, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat. Neurosci.* 5:348-355.

Lattal KM, Abel T (2001) Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J. Neurosci.* 21:5773-5780.

Lattal KM, Abel T (2004) Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101:4667-4672.

Lattal KM, Honarvar S, Abel T (2004) Effects of post-session injections of anisomycin on the extinction of a spatial preference and on the acquisition of a spatial reversal preference. *Behav. Brain Res.* 153:327-339.

Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.

Lelong V, Dauphin F, Boulouard M (2001) RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. *Neuropharmacol.* 41:517-522.

Lewis DJ (1979) Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.* 86:1054-1083.

Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan JJ (1972) Cue-dependent amnesia in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81:243-247.

Loftus EF, Palmer JC (1974) Reconstruction of automobile destruction: An example of interaction between language and memory. *J. Verbal Learn. & Verbal Behav.* 13: 585-589.

Logothetis NK, Sheinberg DL (1996) Visual object recognition. *Annu. Rev. Neurosci.* 19:577-621.

Lynch G (2002) Memory enhancement: the search for mechanism-based drugs. *Nat. Neurosci. Suppl.*:1035-1038.

Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM (1979) Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: Some anomalous characteristics. *Science* 204:1319-1320.

Mandolesi L, Leggio MG, Spirito F, Petrosini L (2003) Cerebellar contribution to spatial event processing: do spatial procedures contribute to formation of spatial declarative knowledge? *Eur. J. Neurosci.* 18:2618-2626.

Martin SJ, Morris RGM (2002) New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus.* 12:609-636.

McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153:1351-1358.

McGaugh JL (2000) Memory - a century of consolidation. *Science* 287:248-251.

Meiri N, Rosenblum K (1998) Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res.* 789:48-55.

Menzel R, Manz G, Menzel R, Greggers U (2001) Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn. Mem.* 8:198-208.

Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A (2005) Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn. Mem.* 12:23-29.

Milekic MH, Alberini CM (2002) Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36:521-525.

Mileusnic R, Lancashire CL, Rose SP (2005) Recalling an aversive experience by day-old chicks is not dependent on somatic protein synthesis. *Learn. Mem.* 12:615-619.

Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160: 554–555.

Moncada D, Viola H (2006) Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: a molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiol. Learn. Mem.* 86:9-18.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Nature* 319:774-776.

Moses SN, Cole C, Driscoll I, Ryan JD (2005) Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Res. Bull.* 67:62-76.

Mumby DG (2001) Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav. Brain Res.* 127:159-181.

Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn. Mem.* 9:49-57.

Mumby DG, Glenn MJ, Nesbitt C, Kyriazis DA (2002) Dissociation in retrograde memory for object discriminations and object recognition in rats with perirhinal cortex damage. *Behav. Brain Res.* 132:215-226.

Myers KM, Davis M (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron.* 36:567-584.

Myers KM, Davis M (2002) Systems-level reconsolidation: reengagement of the hippocampus with memory reactivation. *Neuron* 36:340-343.

Nader K (2003) Memory traces unbound. *Trends Neurosci.* 26:65-72.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000) The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1:216-219.

Naghdi N, Majlessi N, Bozorgmehr T (2003) The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. *Behav. Brain Res.* 139:69-73.

Pavlov IP (1927) *Conditioned Reflexes* (Oxford, Oxford University Press).

Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego.

Pedreira ME, Dimant B, Maldonado H (1996) Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:611-617.



Pedreira ME, Maldonado H (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863-869.

Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H (2002) Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J. Neurosci.* 22:8305-8311.

Power AE, Berlau DJ, McGaugh JL, Steward O (2006) Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: The role of re-exposure duration *Learn. Mem.* 13: 27-34.

Przybylski J, Roulet P, Sara SJ (1999) Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J. Neurosci.* 19:6623-6628.

Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* 84:241-246.

Quevedo J, Vianna MR, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, Izquierdo I (2004) Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are

differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav. Brain Res.* 154:339-343.

Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de Paris F, Izquierdo I, Rose SP (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn. Mem.* 6:600-607.

Rainer G, Miller EK (2000) Effects of visual experience on the representation of objects in the prefrontal cortex. *Neuron.* 27:179-89.

Ramirez RR, Gandhi CC, Muzzio IA, Matzel LD (1998) Protein synthesis-dependent memory and neuronal enhancement in *Hermissenda* are contingent on parameters of training and retention. *Learn. Mem.* 4:462-477.

Redish AD, Touretzky DS (1998) The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural. Comput.* 10:73-111.

Reed JM, Squire LR, Patalano AL, Smith EE, Jonides J (1999) Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. *Behav. Neurosci.* 113:411-419.

Richardson R, Ledgerwood L, Cranney J (2004) Facilitation of fear extinction by D-cycloserine: theoretical and clinical implications. *Learn. Mem.* 11:510-516.

Riesenhuber M, Poggio T (2002) Neural mechanisms of object recognition. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12:162-168.

Robbins SJ (1990) Mechanisms underlying spontaneous recovery in autoshaping. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Processes* 16: 235–249.

Rodriguez WA, Horne CA, Padilla JL (1999) Effects of glucose and fructose on recently reactivated and recently acquired memories. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 23:1285-1317.

Rodriguez WA, Rodriguez SB, Phillips MY, Martinez JL Jr (1993) Post-reactivation cocaine administration facilitates later acquisition of an avoidance response in rats. *Behav. Brain Res.* 59:125-129.

Rodriguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutiérrez R, Bermudez-Rattoni F. (2005) Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn. Mem.* 12:533-537.

Routtenberg A, Rekart JL (2005) Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends Neurosci.* 28:12-19.

Rudy JW, Biedenkapp JC, Moineau J, Bolding K (2006) Anisomycin and the reconsolidation hypothesis *Learn. Mem.* 2006 13:1-3.

Sandoz JC, Pham-Delegue MH (2004) Spontaneous recovery after extinction of the conditioned proboscis extension response in the honeybee. *Learn. Mem.* 11:586-597.

Sangha S, Scheibenstock A, Morrow R, Lukowiak K (2003) Extinction requires new RNA and protein synthesis and the soma of the cell right pedal dorsal 1 in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci.* 23:9842-9851.

Santini E, Ge H, Ren K, Pena de Ortiz S, Quirk GJ. (2004) Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 24:5704-5710.

Sara SJ. (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* 7:73-84.

Schacter DL, Dodson CS (2001) Misattribution, false recognition and the sins of memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356:1385-1393.

Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J. Neurosci.* 20:RC96.

Schimanski LA, Nguyen PV (2004) Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: a focus on inbred mouse strains. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28:463-483.

Spear, N.E. (1973). Retrieval of memory in animals. *Psychol. Rev.* 80:163-194.

Squire LR, Kandel ER (2003) *Memória: da mente às moléculas*. Artmed: Porto Alegre.

Squire LR, Slater PC, Chace PM (1976). Reactivation of recent or remote memory before electroconvulsive therapy does not produce retrograde amnesia. *Behav. Biol.* 18:335–343.

Squire LR, Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93:13515-13522.

Staubli U, Faraday R, Lynch G (1985) Pharmacological dissociation of memory: anisomycin, a protein synthesis inhibitor, and leupeptin, a

protease inhibitor, block different learning tasks. *Behav. Neural Biol.* 43:287-297.

Stollhoff N, Menzel R, Eisenhardt D (2005) Spontaneous recovery from extinction depends on the reconsolidation of the acquisition memory in an appetitive learning paradigm in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Neurosci.* 25:4485-4492.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* 24:4787-4795.

Tronson NC, Wiseman SL, Olausson P, Taylor JR (2006) Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat. Neurosci.* 9:167-169.

Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:12251-12254.

Viola H, Furman M, Izquierdo LA, Alonso M, Barros DM, de Souza MM, Izquierdo I, Medina JH (2000) Phosphorylated cAMP response element-

binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *J. Neurosci.* 20:RC112.

von Herten LS, Giese KP (2005) Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J. Neurosci.* 25:1935-1942.

Wan H, Aggleton JP, Brown MW (1999) Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J. Neurosci.* 19:1142-1148.

Winograd M, Viola H (2004) Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. *Hippocampus* 14:117-123.

Wustenberg D, Gerber B, Menzel R (1998) Long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur. J. Neurosci.* 10:2742-2745.

Xiang JZ, Brown MW (2004) Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. *Neuron* 42:817-829.