

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

MIRELLE ARAUJO CASAGRANDE

**CONSOLIDAÇÃO SINÁPTICA DA MEMÓRIA:
DESCOBRINDO OS PARÂMETROS QUE MODULAM SUA JANELA TEMPORAL**

Porto Alegre, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

MIRELLE ARAUJO CASAGRANDE

**CONSOLIDAÇÃO SINÁPTICA DA MEMÓRIA:
DESCOBRINDO OS PARÂMETROS QUE MODULAM SUA JANELA TEMPORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Linha de Pesquisa: Neuropsicofarmacologia

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Álvares

Porto Alegre, 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jandir e Véra,
pelo incondicional apoio
para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A construção deste trabalho se deve não somente a um esforço próprio, mas à participação de muitas pessoas, às quais sou grata e me sinto extremamente feliz por fazerem parte da minha vida. Muitas delas estiveram presentes desde o início: a ansiedade da preparação para o processo de seleção do mestrado. Outras, conheci ao longo do tempo e enriqueceram essa caminhada.

Agradeço ao meu orientador, Lucas de Oliveira Alvares, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Neurobiologia da Memória. Sua confiança e seu apoio foram fundamentais para meu ingresso na pós-graduação e essa etapa da realização de meu projeto de vida. Agradeço pelo exemplo de dedicação profissional e por todos os momentos enriquecedores de aprendizado. Além de gratidão, sinto orgulho por ter esse grande mestre como orientador.

Aos meus pais, Jandir e Véra, pelo apoio a todas as minhas decisões. Seu amor, carinho e incentivo são a base que estrutura cada passo da minha vida. Às minhas irmãs, Amanda Sabrina, a gratidão pelo companheirismo, conselhos e sorrisos. Agradeço também meus queridos cunhados, Rodrigo e Igor. Os finais de semana em Erechim sempre foram refúgios nas interpéries dessa jornada. Faltam palavras para expressar a felicidade que sinto por ter uma família tão maravilhosa.

A Eliezer, irmão que a vida presenteou durante os anos de iniciação científica e que permitiu estarmos lado a lado também na pós-graduação. Minha gratidão pela amizade, por compartilhar os momentos de conquistas e angústias, por fazer com que me sinta em casa sempre que está por perto. Obrigada pela paciência, por me aguentar nos dias de desânimo e mau humor e me ajudar a superar as dificuldades.

À Charlanne e Giana, leais companheiras, cuja amizade faz de cada encontro momentos de alegria, encorajamento e alento para o coração. Obrigada por todas as trocas, os abraços, as palavras de conforto e noites de catarse.

À Lizeth, que me acolheu fraternalmente no laboratório e cuja colaboração foi fundamental para a realização de todo o trabalho de pesquisa. Sua obstinação de cientista é exemplo e incentivo. Aos demais colegas que fizeram parte da equipe, Flávia, Fabiana e Rodrigo, minha gratidão pela parceria e desejo de sucesso em suas jornadas.

À Rossana, com quem tive a alegria de conviver durante um tempo precioso, minha gratidão pela amizade, pela confiança e pela paciência em me ensinar a técnica de eletroforese.

A Josué, uma menção especial, com estima e admiração. Por todos os momentos que tivemos juntos, pelas conversas construtivas e a ajuda com a dissertação. Sua amizade é uma das coisas mais significativas que guardarei deste tempo e ficará para sempre no meu coração. Meu profundo desejo de que tenha uma vida feliz e plena de conquistas, digna de seu caráter, sua inteligência e seu empenho acadêmico.

À sempre intensa e amável Krislei, com quem compartilho a busca pelo aprimoramento científico e o desejo de uma vida aproveitada em toda sua intensidade.

A Kamilla e Bruno, que chegaram mais tarde, enchendo o laboratório de energia criativa. Não posso deixar de mencionar, ainda, as prestativas alunas de iniciação científica, Fernanda, Laura, Bruna, Walquíria e Vanessa, pela disponibilidade em ajudar com os experimentos sempre que puderam. À Paula e Ana, por seu exemplo de simplicidade e busca pela excelência.

Aos queridos Douglas, Felipe e Éverton, pela parceria nos encontros, ainda que breves.

À Dona Zelma, que é mãe e amiga. Minha gratidão pela amizade, por descontrair o ambiente de trabalho, pela confiança e por suas lições diárias, de respeito aos animais experimentais e de relação com o coletivo.

A Guilherme, Gabriel e Bruna, pelo aconchego do convívio diário, por entenderem meus horários inadequados e aguentarem o acúmulo de livros espalhados pela sala do apartamento.

Meu agradecimento a quem, desde o início, foi inspiração para minha escolha pelo mestrado: professoras orientadoras de iniciação científica, Mônica Piccione Gomes Rios e Ortenila Sopelsa.

A Rafael, companheiro da jornada final de produção deste trabalho. Seus cuidados cheios de ternura foram fundamentais para a manutenção da motivação, do meu equilíbrio mental e para a elaboração de novas definições sobre a palavra “amor”.

A meu sobrinho, Dom, cuja presença em Porto Alegre inspirou confiança, nutriu meu coração com companheirismo e afeto, e muito ensinou sobre o relacionamento interespecies.

A todos os professores, funcionários da universidade e demais pessoas que contribuíram de alguma forma com minha passagem pelo mestrado, fica o registro minha gratidão.

Agradeço por fim à Capes, pela bolsa de pesquisa.

RESUMO

As memórias não são geradas instantaneamente. A consolidação é um processo de estabilização, necessário para que as memórias de longa duração sejam formadas e armazenadas. Através da consolidação sináptica, modificações na rede neural ocorrem durante algumas horas, levando à retenção das informações adquiridas. Com base na literatura sobre a neurobiologia da memória, a hipótese deste trabalho é que existem fatores que podem modular a janela temporal da consolidação sináptica. Nossos resultados sugerem que, em protocolos de condicionamento aversivo contextual, intensidades fortes de treino e exposição prévia ao contexto aceleram a consolidação sináptica. Na contramão da visão geral de que a consolidação é um mecanismo que ocorre em um espaço de tempo fixo, apresentamos a perspectiva de um mecanismo temporal dinâmico. Nós demonstramos, ainda, que a síntese de glicocorticoides durante a aquisição da memória medeia o tempo requerido para a consolidação sináptica. Esses mecanismos parecem estar relacionados com a força da memória que será formada, e podem ser compreendidos à luz da função adaptativa da consolidação. Um aprendizado mais fraco e menos significativo está relacionado com a consolidação mais lenta, que pode permitir a modulação seletiva das conexões sinápticas durante uma janela temporal maior. Por outro lado, a consolidação de um evento fortemente aversivo ocorre de forma rápida e robusta, possivelmente com o recrutamento de diversas estruturas corticais e subcorticais, o que pode garantir o armazenamento adequado de tal experiência.

ABSTRACT

Memories are not instantly created. Consolidation is a stabilization process, necessary for long-lasting memories to be formed and stored. Through the synaptic consolidation, modifications in neural networks are stabilized in a few hours, leading to the retention of acquired information. Based on the literature of memory neurobiology, the hypothesis of paper is there are factors that can modulate the temporal window of synaptic consolidation. Our results suggest that, in contextual aversive conditioning protocols, strong training intensities and prior exposure to context accelerate synaptic consolidation. Contrary to the common sense that consolidation is a mechanism that occurs in a fixed time frame, we present the perspective of a dynamic temporal mechanism. We also demonstrate that the synthesis of glucocorticoids during memory acquisition mediate the required time for the synaptic consolidation. These mechanisms seem to be related to the strength of the memory to be formed, and they can be understood in light of the adaptive function of consolidation. A Weaker and less significant learning is related to slower consolidation, which may allow selective modulation of synaptic connections during a longer time window. On the other hand, consolidation of a strongly aversive event occurs rapidly and is expressed robustly, possibly recruiting various cortical and subcortical structures, which may ensure adequate storage of such experience.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	CONCEITOS BÁSICOS.....	12
2.1	Tipos de Memória	12
2.1.1	Memória declarativa e não-declarativa.....	12
2.1.2	Memória de curta e de longa duração.....	12
2.2	Fases da Memória	13
2.2.1	Aquisição	14
2.2.2	Consolidação	14
2.2.3	Evocação – reconsolidação e extinção	14
2.2.4	Esquecimento.....	15
2.3	A consolidação da memória ao longo do tempo	15
2.4	A modulação da consolidação sináptica.....	21
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo Geral.....	24
3.2	Objetivos Específicos	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Animais e condicionamento	25
4.2	Procedimentos Cirúrgicos	25
4.2.1	Anestesia.....	25
4.2.2	Coordenadas da estrutura e colocação das cânulas.....	25
4.2.3	Pós-operatório.....	26
4.3	Procedimentos Comportamentais	26
4.3.1	Condicionamento Aversivo ao Contexto.....	26
4.4	Fármacos.....	27
4.4.1	Muscimol.....	27
4.4.2	Lidocaína	27
4.4.3	Metirapona.....	27
4.4.4	Administração dos fármacos	27

4.5	Eutanásia e controle do posicionamento das cânulas	28
4.6	Análises Estatísticas	28
5	RESULTADOS	29
5.1	A intensidade do estímulo determina a janela temporal da consolidação sináptica da memória	29
5.2	A consolidação sináptica da memória é completada em até 3 horas com um estímulo forte e necessita de mais de 6 horas com um estímulo fraco.....	31
5.3	Uma pré-exposição ao contexto acelera a janela temporal da consolidação sináptica da memória de medo contextual.....	34
5.4	A aceleração da consolidação sináptica da memória de medo contextual é mediada pela via dos glicocorticoides.....	35
6	DISCUSSÃO	37
7	REFERÊNCIAS.....	42
8	APÊNDICE	51
8.1	Inativação hipocampal por lidocaína imediatamente após o condicionamento fraco não apresentou efeito sobre a consolidação da memória.....	51
8.2	Inativação hipocampal por lidocaína antes do condicionamento de medo fraco promoveu uma facilitação sobre a consolidação	52
8.3	Inativação hipocampal por lidocaína antes da reativação não promoveu efeito sobre a reconsolidação da memória de medo contextual no protocolo fraco	53

1 INTRODUÇÃO

Os debates acerca da natureza da mente humana remetem a um interesse em compreender a memória desde a Antiguidade. Tentativas de definição sobre sua composição, inicialmente, consideravam-na a manutenção de um traço daquilo que não mais existe, mas fora impresso na alma, e então pode ser acessado pela lembrança (Platão, 1991). Dessa forma, a alma era o lugar onde estariam guardados os registros daquilo que queremos recordar, das coisas que vimos, ouvimos ou sentimos. Os primeiros escritos médicos dos quais se tem relato (Hipócrates, 460 a.C.; Galeno, 129 a.C.) já inferiam uma associação entre as faculdades mentais e o funcionamento encefálico (Ballester, 1972; Platão, 2011). Predominavam, porém, as teorias dualistas, de acordo com as quais os esses processos (mentais) não estariam relacionados com o corpo físico.

Filósofos medievais também se debruçaram sobre o fenômeno da memória, considerada, em geral, em um contexto religioso, com um fim de transcendência. A partir do conhecimento, possibilitado pela capacidade de percepção, preservação e recordação dos fatos, ocorreria a integração de todas as coisas, culminando na elevação do ser humano em direção ao desconhecido (Yates, 1966). Nesse contexto, a memória também confere ao ser humano a capacidade de medida do tempo, o que seria fundamental para situá-lo em um plano de vida finita, em oposto à imagem divina, cuja existência seria eterna e atemporal (Agostinho, 2007).

A partir do período da modernidade ocorreu um profundo desenvolvimento do método científico, juntamente com o avanço tecnológico e a gradual dissociação do campo da filosofia clássica para uma reflexão racionalista (Suassuna et al., 2005). Dessa forma, os estudos sobre memória e demais propriedades da mente foram evoluindo, ao longo do tempo, para uma abordagem biológica, que têm se desenvolvido amplamente no campo das neurociências.

Sabe-se, hoje, que a formação das memórias refere-se à capacidade de aprender. A partir de um aprendizado, uma informação pode ser codificada, armazenada e, posteriormente, evocada (Izquierdo, 2011; Kandel, 2012). Sua importância está relacionada, do ponto de vista da psicologia, com a formação da personalidade e o desenvolvimento da identidade própria de cada indivíduo e, de um ponto de vista biológico, com aspectos evolucionistas, como sobrevivência e preservação das espécies, pois o aprendizado permite uma mudança de comportamento adaptativa ao ambiente, quando necessário (Kandel, 2012).

Nenhuma memória é formada como que escrita em quadro em branco. O que ficou registrado de nossas experiências passadas serve de base para os novos aprendizados. Uma mesma história pode ser relatada de forma diferente por duas pessoas que a vivenciaram, pois seu registro foi formado a partir da percepção daquilo que ocorreu, e não do evento em si. A informação que será evocada é chamada, no campo da neurobiologia da memória, de “traço de memória”, o que consiste na representação física da memória no encéfalo, envolvendo diversas regiões. Existem vários tipos fundamentalmente diferentes de memória, e certas regiões encefálicas são mais importantes para alguns tipos de armazenamento do que para outros (Kandel, 2012). Além disso, há diferentes mecanismos envolvidos nos diferentes tipos de memória. Por isso, uma classificação é importante, e a mais usual classifica as memórias de acordo com o conteúdo e o tempo de duração em que está disponível para ser evocada (Squire, 1986).

As memórias também possuem distintos mecanismos para sua formação, que são organizados em processos denominados “fases” da memória. Memórias explícitas, aquelas relacionados a fatos e eventos, têm o hipocampo como estrutura central (Kandel, 2012; Squire, 1986). Por esse motivo, o hipocampo é alvo de intensiva pesquisa visando elucidar os mecanismos da memória (Lee et al., 2016).

Um princípio fundamental do entendimento da neurobiologia da memória é o de que ela não se forma instantaneamente após uma experiência. Para ser formada, é necessário um processo gradual de estabilização, cunhado de consolidação (Müller & Pilzecker, 1900). Este processo é passível de diversas modulações, entre as quais a valência emocional tem um papel de destaque. Com base nisso, levantamos a hipótese de que o curso temporal da consolidação é em sua natureza dinâmico, sendo sensível à mudança de acordo com diferentes experiências de aprendizagem e demandas cognitivas. Para um melhor entendimento do trabalho, as próximas sessões descrevem conceitos básicos da área de pesquisa em memória.

2 CONCEITOS BÁSICOS

2.1 Tipos de Memória

2.1.1 Memória declarativa e não-declarativa

Essa definição é importante por fazer uma distinção entre as memórias que são evocadas conscientemente, as quais se pode acessar detalhadamente em conteúdo, e as memórias que não são evocadas através de esforço consciente.

A memória não-declarativa, também chamada de implícita, abrange formas heterogêneas de aprendizado, como do tipo associativo e não-associativo, além de habilidades, hábitos e representações perceptuais (*priming*) (Izquierdo, 2011). Exemplos de memórias pertencentes a essa categoria são tocar um instrumento, praticar um esporte e ter medo de dirigir após ter sofrido um acidente de trânsito. Mesmo sendo difícil assimilá-las ou descrevê-las conscientemente, seus mecanismos celulares e moleculares são acessíveis através de pesquisas experimentais. Sabe-se que seu processamento ocorre em estruturas encefálicas distintas, como os núcleos da base, a amígdala, o cerebelo e o neocórtex, de acordo com a natureza da memória (figura 1).

A memória declarativa, também conhecida como memória explícita, é aquela que se refere a fatos e eventos - o que aprendemos sobre o mundo e as coisas, assim como o registro das experiências que vivenciamos no decurso das nossas vidas (Riedel & Blokland, 2015). Seu acesso ocorre livremente através da consciência, o que explica sua nomenclatura, pois abrange o que podemos evocar por meio de palavras. Sua importância é ampla, para a formação e o reconhecimento da própria identidade, bem como situar-se no mundo adequadamente, em um contexto social e histórico. Elas podem ser subdivididas em memórias declarativas de curta duração e de longa duração.

2.1.2 Memória de curta e de longa duração

Algumas memórias duram mais do que outras. Memórias de longo prazo podem ser evocadas dias, meses ou anos após sua aquisição, e algumas perduram pela vida inteira, enquanto as memórias de curta duração têm um registro de apenas alguns minutos a horas. Ainda mais

efêmera é a memória de trabalho, que nem chega a formar um registro e desaparece completamente após alguns segundos (Izquierdo, 2011).

Existem debates polêmicos sobre as classificações da memória por sua duração, como por exemplo, se a memória é inicialmente formada para durar poucas horas e depois se torna mais forte e permanente. Apesar de não haver consenso, há fortes evidências de que os mecanismos moleculares e as estruturas envolvidas diferem desde o início, e o momento da aquisição possui fatores determinantes para o armazenamento da memória (Izquierdo et al., 1998; Izquierdo et al., 1999). As memórias de longa duração são o foco do presente estudo. A informação adquirida passa por fases, até formar um traço consistente e duradouro. As fases da memória de longa duração são descritas na próxima sessão.

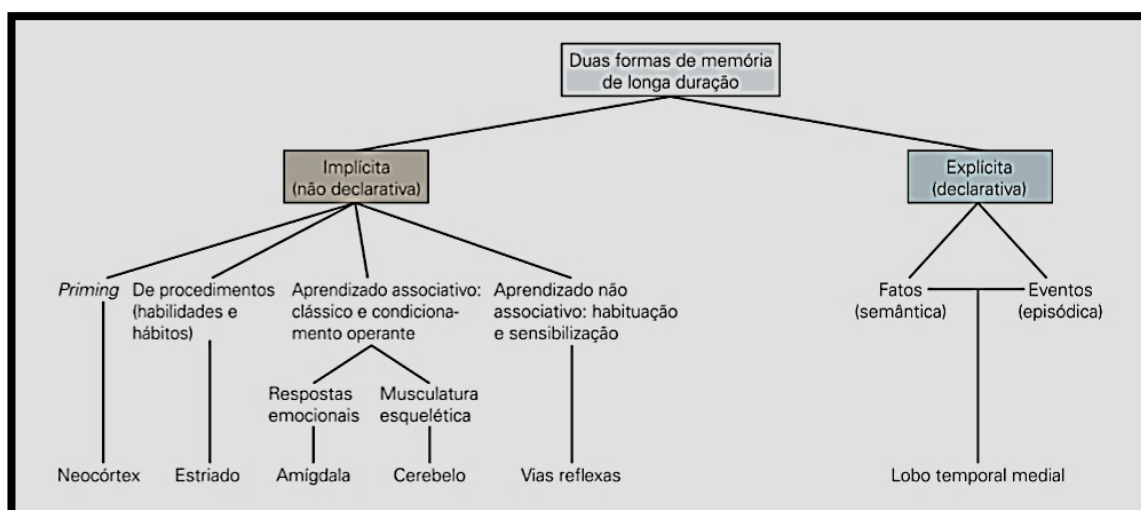


Figura 1. Subdivisões da memória de longa duração e regiões encefálicas correspondentes. Imagem retirada de Bear, Connors, & Paradiso (2016).

2.2 Fases da Memória

A memória não é um processo único, sendo dividida em fases distintas, cada uma com uma dinâmica e mecanismos próprios.

2.2.1 Aquisição

É o momento em que a experiência é vivenciada, no qual ocorre o aprendizado. A aquisição é também chamada de “treino”, referindo-se ao momento da pesquisa experimental em que os animais devem aprender uma tarefa para, a partir desse aprendizado, formar uma memória. A aquisição ocorre com a percepção do estímulo e uma consequente atividade neural que codifica essas informações (Redondo & Morris, 2011).

2.2.2 Consolidação

A consolidação se refere ao período imediatamente após a aquisição onde as informações são gradualmente armazenadas via modificações plásticas em circuitos neuronais específicos. Para que uma memória de longa duração seja formada e armazenada, após a aquisição, deve ocorrer a consolidação, na qual o traço é mais suscetível e pode ser modulado antes de ser armazenado de forma mais estável e resistente a interferências (McGaugh, 1966; Müller & Pilzecker, 1900). Na consolidação sináptica, os mecanismos de plasticidade envolvidos têm duração de minutos a algumas horas e são bem estudadas no hipocampo (Izquierdo et al., 2006; Kandel, 2001)

Existe ainda outra fase de formação da memória, chamada de consolidação sistêmica, na qual o traço da memória passa a ser gradualmente independente do hipocampo e reorganizado em regiões corticais (Haubrich et al., 2016; Pedraza et al., 2015; Winocur, Moscovitch, & Bontempi, 2010). Essa etapa pode levar de dias a semanas e envolve diversas estruturas (Frankland & Bontempi, 2005; Winocur & Moscovitch, 2011). Neste trabalho, investigamos especificamente os mecanismos referentes à consolidação sináptica.

2.2.3 Evocação – reconsolidação e extinção

Depois de consolidada, a memória poderá futuramente ser evocada. Quando reativada, a memória original retorna a um estado instável e passível de sofrer interferências (Nader, Schafe, & Le Doux, 2000), e então dois processos antagônicos podem ocorrer: reconsolidação ou extinção.

Se a informação for considerada importante para o indivíduo, a memória poderá ser atualizada e fortalecida. A reconsolidação tem, portanto, um papel adaptativo, permitindo que

novas informações apresentadas durante a reativação sejam incorporadas ao traço da memória original, atualizando-o (De Oliveira Alvares et al., 2013; Nader et al., 2000).

Se uma memória for pouco expressiva, sem relevância, tenderá a ser enfraquecida e sobreposta por uma nova, em um processo chamado de extinção (Bouton, 1993). É importante destacar que o sentido biológico da reconsolidação é manter ou acrescentar novas informações à memória original, enquanto o papel da extinção é de formar uma nova memória com significado distinto da memória original, suprimindo-a (Lee, Milton, & Everitt, 2006).

2.2.4 Esquecimento

Durante algum tempo, a visão prevaiente acerca do esquecimento era de um simples processo passivo de decaimento do traço de memória. Pesquisas recentes indicam, porém, que o esquecimento é um mecanismo neuronal bem organizado, que remove sistematicamente memórias do hipocampo, e que isso é essencial para manter a funcionalidade geral do sistema (Hardt, Nader, & Nadel, 2013). A capacidade de esquecer é importante, pois além de não sobrecarregar o sistema com memórias que deixaram de ser relevantes, permite fazer generalizações e abstrações (Izquierdo, 2011).

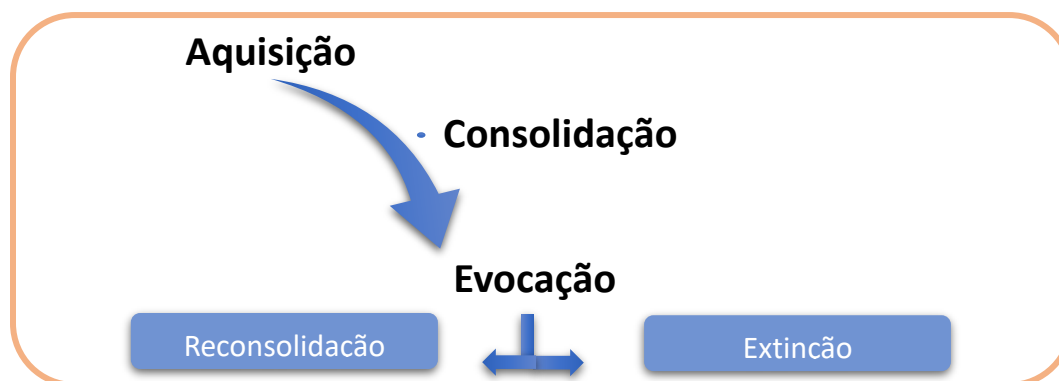


Figura 2. As fases da memória de longa duração. Diagrama elaborado pela autora.

2.3 A consolidação da memória ao longo do tempo

A formação da memória como um processo gradual, e não imediato, foi primeiramente relatada por estudos do final do século XIX e início do século XX, a partir de observações clínicas

e estudos experimentais que foram realizados principalmente no campo da psicologia experimental.

Era sabido que a memória divide-se em diferentes fases, com características distintas (Ebbinghaus, 2013). Em um trabalho pioneiro, Müller & Pilzecker (1900) estudaram o efeito de interferências realizadas após um aprendizado sobre a retenção da memória. Eles observaram que quando conduzidas logo após a aquisição, essas interferências prejudicavam a retenção da memória em um teste posterior. Porém, a mesma interferência, quando feita após um intervalo maior de tempo, não produzia efeito. Isso mostrou que inicialmente a memória é suscetível a interferências, mas devido a algum processo dependente do tempo, ela se torna resistente. Os autores interpretaram que isso se deve ao fato de que, após o aprendizado, processos biológicos tornam a memória, de um estado inicialmente instável e lábil, em fixa e estável, processo que cunham de consolidação.

Esses achados incitaram muito interesse, porque davam uma explicação fisiológica inédita para a formação das memórias. Diversos trabalhos foram realizados posteriormente, investigando diferentes situações em que a consolidação da memória poderia sofrer interferência. Entre eles, Skaggs (1925) demonstrou que um aprendizado verbal poderia ser modificado de maneira retroativa. Em seus estudos, observou que apresentar uma tarefa com palavras semelhantes às apresentadas em uma tarefa anterior facilitava a consolidação da memória, se ambas fossem realizadas em sequência, separadas por um curto período de tempo. Porém, palavras com conteúdo diferente prejudicavam a consolidação do primeiro aprendizado. McGeoch e colaboradores (1931; 1933) obtiveram resultados convergentes, em estudos da mesma natureza. Nessa mesma época, alguns trabalhos surgiram a partir da observação de pacientes tratados com choque eletroconvulsivo, que apresentavam perda seletiva de memória retrógrada dos eventos ocorridos pouco tempo antes do tratamento (Meyer-Gross, 1943).

A utilização de modelos experimentais animais contribuiu para a ampliação dos conhecimentos na área e, a partir da metade do século XX, foram publicados muitos trabalhos originados de investigações em laboratório. Com um grande número de publicações, as linhas de evidência que sustentaram a teoria da consolidação, em sua maioria, utilizavam agentes interferentes aplicados em distintos intervalos de tempo após o treino, induzindo amnésia retrógrada. Após um intervalo de tempo maior, o efeito das interferências não mais ocorria (Flexner, Flexner, & Roberts, 1965; Gordon & Spear 1973).

Dos trabalhos iniciais de maior relevância, destacam-se os estudos de Duncan (1949), como primeiro modelo animal de amnésia retrógrada. Trabalhando com a técnica de eletrochoque após a aquisição de uma tarefa comportamental, ele verificou um efeito amnésico graduado em roedores, com interferência tanto retrógrada como anterógrada. Ou seja, tanto a memória do primeiro aprendizado como a do eletrochoque eram prejudicadas. Com base em seus resultados, concluiu que após a sessão de aprendizado é necessária uma persistência da atividade neural promovida pelo estímulo inicial de aprendizado, interrompida se um eletrochoque for administrado em um curto intervalo de tempo.

Estudos posteriores já começavam a identificar fatores intracelulares que influenciam a consolidação e, entre eles, Flexner e colaboradores (1965) tiveram destaque em investigações sobre a importância da síntese proteica. Nessa época, também surgiram pesquisas sobre a diferença entre mecanismos de memória de curta e de longa duração (Barondes & Cohen, 1968). Já se sabia que, assim como certos tratamentos prejudicam a formação da memória se administrados após o treino, de forma oposta, algumas substâncias e fatores como estimulação elétrica podem fortalecer/facilitar a memória. Esses resultados eram observados em uma janela temporal limitada, e apenas sobre a memória de longa duração, enquanto a memória de curta duração não seria afetada (McGaugh & Petrinovich, 1965).

A nível estrutural, o complexo sistema envolvendo o hipocampo e outras áreas do lobo temporal medial para os mecanismos de formação de memórias foi inicialmente observado em seres humanos através de casos clínicos envolvendo lesões provocadas por acidentes, doenças ou remoções cirúrgicas. Um desses casos ganhou repercussão a partir de 1953, tornando-se um marco para os estudos de memória. Os procedimentos de lobectomia não eram incomuns e Henry Gustav Molaison, o “paciente H.M.”, teve parte dos dois lobos temporais mediais removido cirurgicamente, incluindo estruturas como amígdala e hipocampo. A intervenção cirúrgica foi um tratamento para um quadro grave de epilepsia apresentado pelo paciente, porém, a partir de então, H.M. tornou-se incapaz de formar novas memórias declarativas, além de apresentar severa amnésia retrógrada (Scoville & Milner, 1957; Sweatt, 2016).

Nas décadas seguintes, estudos em laboratório sustentaram a descoberta do hipocampo como região central dos processos mnemônicos, motivo pelo qual essa estrutura é foco principal das pesquisas na área (Kandel, 2001; Malenka & Nicoll, 1999). Nessa época, o condicionamento clássico já havia sido proposto (Pavlov, 1927) e os trabalhos pioneiros de neurobiologia da

memória empregavam métodos de aprendizado com tarefas simples, como o aprendizado associativo do condicionamento de medo, modelos de estudo até os dias atuais. O foco das pesquisas se voltou, então, para a busca dos correlatos neurobiológicos da memória (Malenka & Nicoll, 1999; McGaugh, 2000).

A nível molecular, Hebb (1949) postulou que a formação das memórias envolve a propagação de impulsos em um padrão espaço-temporal específico. A aquisição corresponde à ativação de circuitos neurais, que se mantêm por um tempo, em uma atividade de reverberação capaz de manter a memória de curta duração, porém para haver memória de longa duração, deve haver fortalecimento das sinapses. As ideias propostas por Hebb deram uma explicação fisiológica para a formação da memória, incentivando pesquisas nesse âmbito de investigação. Suas proposições foram posteriormente legitimadas através de estudos que demonstraram padrões de plasticidade sináptica que ocorrem na formação de memórias (Bear et al., 2016).

A partir do momento da aquisição da memória (momento do treino ou do aprendizado), as informações que estão sendo recebidas estimulam processos de plasticidade a nível das sinapses, que têm duração de minutos a algumas horas (Dudai, 2012; Kandel, 2001). Essa fase inicial foi chamada de consolidação sináptica (McGaugh, 1966), que corresponde ao momento em que a memória é mais suscetível a interferências e pode ser facilmente modulada. Desde a identificação da existência dessa fase da memória, correlatos neurobiológicos a nível celular foram descritos.

Uma descoberta extremamente relevante e influente foi realizada por Bliss & Lomo (1973), acerca de um mecanismo que promove modificações nas conexões sinápticas hipocâmpais, produzida por estimulação eletrofisiológica. Esse tipo de plasticidade é chamado de LTP (do inglês *Long Term Potentiation* ou potenciação de longa duração) (Kandel, 2001; Malenka & Bear, 2004). Desde que foi primeiramente relatada em mamíferos (Bliss & Lomo, 1973), tem sido amplamente estudada em modelos vertebrados e invertebrados, e seus mecanismos moleculares que promovem alterações funcionais e estruturais convergem com os mecanismos de formação da memória.

A LTP ocorre em diferentes regiões encefálicas, sendo que no hipocampo é mais conhecida e estudada por sua relação direta com a consolidação sináptica. Hoje sabe-se que memórias aversivas, por exemplo, utilizam esse mecanismo (Whitlock et al., 2006), que ocorre, entre outras estruturas, nas sinapses glutamatérgicas dependentes de receptores NMDA, entre as regiões hipocâmpais CA3 e CA1 (Bliss & Collingridge, 1993; Morris, Davis, & Butcher, 1990). Essas conexões constituem a via colateral de Schaffer (Szirmai, Buzsáki, & Kamondi, 2012).

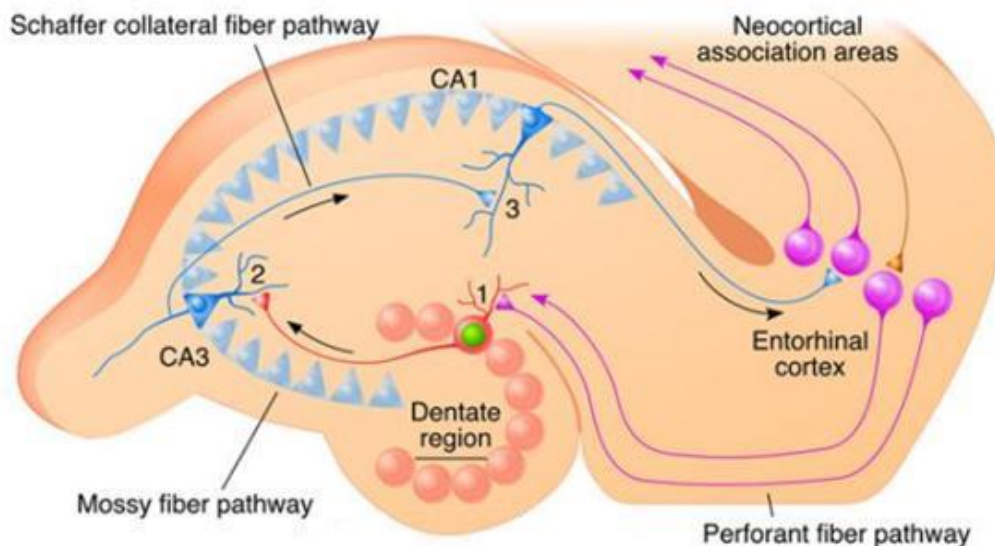


Figura 3. O hipocampo está situado no lobo temporal do córtex cerebral e está associado principalmente com a orientação espacial e a formação e armazenamento da memória de longa duração (Frankland & Bontempi, 2005; Hartley et al., 2003; Morris et al., 1982). A imagem representa a circuitaria trissináptica hipocampal de um rato. As informações chegam ao hipocampo através das fibras do córtex entorrinal, chamadas em conjunto de “via perforante”. Seguem o circuito interno constituído inicialmente por fibras musgosas partindo das células granulares do giro denteado (1), em direção à área CA3 (2), onde ocorrem sinapses com as células piramidais. As conexões entre CA3 e CA1 (3) constituem a “via colateral de Schaffer”, onde ocorrem os principais mecanismos moleculares adjacentes à formação e consolidação da memória. As informações processadas no hipocampo retornam ao córtex entorrinal e seguem para outras áreas corticais. *Adaptado de Katherine Harmon, 2011. Em roxo: neurônios do córtex entorrinal. Em rosa: células granulares do giro denteado. Em azul: células piramidais de CA3 e CA1. Em laranja na porção superior: neurônios das regiões neocorticais associadas.*

Na via colateral de Schaffer, os receptores ionotrópicos responsáveis pela despolarização em resposta à ligação ao neurotransmissor são os receptores AMPA. Após a membrana da célula pós-sináptica estar despolarizada pela ação de um estímulo, ocorre ativação de receptores do tipo NMDA, que além da ligação ao seu substrato, precisa dessa despolarização prévia para que o íon Mg^{++} que bloqueia seu canal seja desacoplado. Os eventos que se seguem após a ativação dos receptores NMDA são o influxo de íons Na^+ e Ca^{++} . O influxo de Ca^{++} determina a direção das mudanças na potenciação sináptica: maior influxo e conseqüente aumento na concentração no meio intracelular, leva a LTP; pequenos aumentos na concentração intracelular desse íon promovem LTD (Malenka & Bear, 2004).

De forma semelhante às memórias, após a indução, a LTP pode ser expressa como uma forma transitória de LTP, conhecida como fase precoce da LTP (E-LTP), que está relacionada com

o traço instável ou memória de curto prazo (STM). A LTP pode também ser expressa como uma forma persistente, conhecida como fase tardia de LTP (L-LTP) ou manutenção da potenciação, um análogo celular de memória de longo prazo (LTM) (Malenka & Nicoll, 1999).

Assim como após um treino de condicionamento de medo, a alta concentração intracelular de Ca^{++} promovida por estímulos de alta frequência na colateral de Schaffer promove ativação das proteínas quinases (Whitlock et al., 2006), como a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) e a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que têm função de ativar diversos fatores no ambiente intracelular (Lisman, Yasuda, & Raghavachari, 2012). No hipocampo, há picos de ativação molecular para a manutenção da LTP e a formação das memórias de longa duração (Abel et al., 1998; Bekinschtein et al., 2007; Izquierdo, Furini, & Myskiw, 2016; Sweatt, 2016), que vão culminar em alterações duradouras na estrutura e composição das sinapses, a nível pré e pós-sináptico (Bosch et al., 2014; Johansen et al., 2011). Essas alterações incluem síntese e degradação de proteínas, remodelamento de espinhos dendríticos, expressão gênica, incorporação e internalização de receptores na membrana (Bosch et al., 2014; Dudai, 2004; Flexner, Flexner, & Stellar, 1963; Giese & Mizuno, 2013), entre outras modificações que em última instância, promovem o fortalecimento sináptico.

Após a indução de LTP ou de uma tarefa de condicionamento de medo, ocorre ativação imediata da proteína dependente de Ca^{++} -calmodulina CaMKII, seguida por outro pico de fosforilação tardio (Cammarota et al., 1998). Esses aumentos em sua expressão facilitam a formação da memória e a indução de LTP, assim como seu bloqueio é prejudicial (Lucchesi, Mizuno, & Giese, 2011; Malinow, Schulman, & Tsien, 1989). Estímulos de alta frequência na colateral de Schaffer mimetizam a potenciação de longa duração que ocorre em tarefas de condicionamento de medo e promovem alterações morfológicas a nível de receptores em cerca de 30 min. (Whitlock et al., 2006). Mudanças estruturais como essa ocorrem através do rápido remodelamento do citoesqueleto dos espinhos dendríticos, que é fundamental para a manutenção da LTP e a consolidação da memória de longa duração (Bosch et al., 2014). A isoforma α -CaMKII participa desses processos, atuando sobre os filamentos de actina, que formam o citoesqueleto dos espinhos (Kim et al., 2015).

Outra proteína que participa da consolidação da memória de longa duração é a PKA, ativada tardiamente na LTP (cerca de 3h após) e rapidamente na formação da memória (Bernabeu et al., 1997). A fase tardia da LTP no hipocampo requer a atividade da PKA, concomitante com a

síntese de proteínas e de RNA (Nguyen, Abel, & Kandel, 1994). Quando os níveis de AMPc aumentam no hipocampo, ocorre a ativação da PKA, que entre outras funções fosforila CREB (do inglês, *cAMP response element binding*), levando à transcrição de um conjunto de genes de resposta imediata e promovendo assim o crescimento de novos sítios sinápticos (Alberini, 2009; Bollen et al., 2014). A ativação concomitante de PKA na amígdala também é requerida para a consolidação da memória (Parsons & Davis, 2012; Wallenstein, Vago & Walberer, 2002).

Na década de 90 se estudava a influência da síntese de novas proteínas sobre a manutenção da LTP e consolidação da memória de longa duração. Nos anos 2000 começou-se a investigar também o papel da degradação de proteínas, e ambos processos parecem ser dependentes. As primeiras evidências de que a degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma também é necessária para a manutenção da LTP e a consolidação da memória em estudos com roedores (Lopez-Salon et al., 2001). Sua importância tem sido demonstrada na consolidação, em experimentos com vertebrados e invertebrados, em modelos de condicionamento contextual e estudos in vitro (Fonseca et al., 2006; Jarome & Helmstetter, 2013; Lyons et al., 2016; Merlo & Romano, 2007; Fustiñana et al., 2014). Um estudo em cultura de células hipocámpais indica que a síntese e a degradação de proteínas ocorre rapidamente em CA1, desde os primeiros minutos após a indução de LTP, com pico entre 15 e 30 min, e a fase precoce e tardia dependem do sistema ubiquitina-proteassoma (Karpova, 2006).

2.4 A modulação da consolidação sináptica

Por que é interessante para um indivíduo/organismo que a consolidação da memória ocorra de forma lenta e gradual, e não instantaneamente? Tem sido proposto que a fase da consolidação proporciona ao organismo uma melhor oportunidade para avaliar, classificar e organizar as informações antes da memória de longa duração ser armazenada (Gerber, 2000; McGaugh, 2000). Se pensarmos em como isso ocorre no dia a dia, estímulos contínuos são captados pelos nossos sentidos, por isso é interessante uma forma de filtrar aquilo que é relevante reter como memória. A consolidação ocorrendo lentamente pode ter, então, uma função adaptativa, possibilitando a modulação seletiva da força das memórias, através de processos endógenos que podem fortalecer ou enfraquecer as conexões sinápticas (McIntyre, McGaugh, & Williams, 2012; Gold e McGaugh, 1975). Uma das evidências que sustenta essa hipótese é a de que as memórias aversivas, que têm

um componente emocional mais forte, são lembradas mais facilmente, enquanto memórias neutras tendem a ser esquecidas (Cahill & McGaugh, 1998; Christianson, 1992).

Os processos envolvidos na potenciação de longa duração, bem como na consolidação sináptica da memória de longo prazo, possuem uma dependência temporal e sequencial. Se houver qualquer interferência, o resultado será uma modificação no desfecho do aprendizado e da memória. Percebe-se, então, que os mecanismos adjacentes à formação da memória não ocorrem sempre da mesma maneira. Algumas substâncias endógenas podem modulá-los, levando a uma facilitação ou prejuízo na consolidação. Entre elas, o estresse tem um papel central, através da síntese e liberação de substâncias como os glicocorticoides. Já está bem estabelecido que o estresse e glicocorticoides modulam a aquisição e a consolidação da memória (Mcgaugh, 2015), e estudos recentes têm buscado compreender os mecanismos que medeiam esse efeito (Aubry, Serrano & Burghardt, 2016; de Quervain, Schwabe & Roozendaal, 2016).

A formação da memória requer a coordenação temporal de eventos celulares e moleculares. Durante o condicionamento pavloviano e a consolidação sináptica, elementos neuromoduladores atuam em convergência com os processos moleculares adjacentes. Neurônios de distintos núcleos da amígdala participam ativamente dos processos de consolidação, através da ativação de cascatas de sinalização intracelulares que promovem eventos de plasticidade similares aos que ocorrem no hipocampo (Schiff et al., 2016). Entre eles, a ação de neurotransmissores como a noradrenalina (NA), liberada em situações emocionais, são cada vez mais conhecidos como reguladores da transmissão glutamatérgica, da plasticidade Hebbiana e dos efeitos fisiológicos e comportamentais produzidos pelo estresse. (Johansen et al., 2011). Um estudo recente demonstrou que a ativação dos receptores β -adrenérgicos (β ARs) pela NA, no momento da aquisição, é determinante para a consolidação de memória de medo, com alvo na fosforilação de receptores AMPA e das proteínas quinases reguladas extracelularmente (ERK) (Schiff et al., 2016). Além da amígdala, também têm sido relacionados nessa modulação da consolidação pela noradrenalina outras regiões como o córtex pré-frontal (Gibbs, Hutchinson, & Summers, 2010).

Pouco depois de um evento indutor de estresse, neurônios do hipocampo e da amígdala, além de outras regiões do sistema límbico, são expostos a altos níveis de noradrenalina e glicocorticoides. Esses hormônios são necessários para a adaptação comportamental e seus efeitos são fortemente modulados pela corticosterona, indicando interações entre os dois hormônios. Um estudo com cultura de células hipocámpais (Zhou et al., 2012) mostrou que a ação combinada de

corticosterona e um agonista de receptores B-adrenérgicos originam uma resposta aumentada de fosforilação de receptores AMPA, que podem participar dos efeitos de melhoria sobre a memória. Estudos com seres humanos confirmam a importância dos glicocorticoides nos processos de consolidação (Lonergan et al., 2013; Wolf et al., 2016).

Os estudos sobre a memória utilizam paradigmas comportamentais para a investigação dos processos moleculares da consolidação sináptica, que tiveram origem no século final do século XIX, quando começaram a ser desenvolvidos estudos sobre os processos mentais em condições laboratoriais controladas (Pavlov, 1849; Duncan, 1949). Entre os paradigmas mais amplamente utilizados para o estudo da memória de medo, está o Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC), que é um método de condicionamento clássico que se baseia na associação entre estímulos, com conseqüente alterações comportamentais. De acordo com essa abordagem, um estímulo incondicionado, como a exposição a um choque, pode provocar uma resposta incondicionada, como o medo. Se um estímulo assim for pareado com um estímulo neutro (condicionado), como um determinado local, ocorrerá a associação entre os dois estímulos. Dessa forma, o estímulo condicionado, por si só, provocará uma reação comportamental, que antes não seria observada.

Para estudos com esses modelos de pesquisa, a utilização de animais experimentais como os roedores possibilita investigações mais complexas do que com seres humanos. Muitos animais possuem um sistema de memória semelhante ao humano em nível estrutural e molecular, pois os mecanismos são bem preservados ao longo da evolução. Estudos com ratos utilizam medidas comportamentais como o congelamento (*freezing*), uma expressão natural de medo desses animais, que consiste em uma posição de imobilização, durante a qual são perceptíveis apenas movimentos respiratórios (Bindra & Anchel, 1963; Bolles & Riley, 1973). Através desse comportamento, pode-se saber que o animal associou um estímulo aversivo a um determinado contexto anteriormente neutro, por exemplo, pois passou a expressar medo ao ser exposto em tal local que fora pareado. Sabe-se, assim, que o aprendizado ocorreu e uma memória foi formada a partir desse evento. Com esse paradigma, o medo pode ser quantificável, correspondendo ao tempo de imobilização do animal. Existem ainda outras medidas comportamentais de medo, que podem ser vocalizações, avaliação de risco, entre outras.

Já foi descrito anteriormente que durante a consolidação sináptica ocorre uma série de eventos celulares e moleculares e que interferir nessa etapa importante modifica a formação de uma memória de longo prazo. No entanto, dada a complexidade do fenômeno da consolidação,

mesmo hoje em dia, grande parte da sua natureza ainda é evasiva. Particularmente, embora seja bem reconhecida como um processo dependente do tempo, sua dinâmica temporal é pouco conhecida. A determinação precisa dos limites da consolidação da memória relacionados ao tempo e aos fatores que o afetam é de suma importância para intervenções terapêuticas bem-sucedidas em caso de transtornos relacionados com memórias aversivas, e esse foi o elemento motivacional para a realização deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos de diferentes protocolos de treino sobre a janela temporal da consolidação sináptica da memória de medo contextual.

3.2 Objetivos Específicos

1. Investigar se a intensidade do treino influencia no tempo necessário para que a consolidação sináptica da memória seja concluída, com protocolos de condicionamento aversivo ao contexto (CAC) de alta (0,7mA) e baixa intensidade (0,4mA).
2. Realizar uma curva de diferentes tempos de inibição hipocampal após o treino no CAC com choque de alta (0,7mA) e baixa intensidade (0,4mA) para delimitar com precisão a janela temporal a consolidação sináptica.
3. Avaliar se uma exposição prévia ao contexto do treino do CAC modifica a dinâmica temporal da consolidação sináptica.
4. Investigar o efeito da inibição da síntese de glicocorticoides sobre a janela da consolidação sináptica da memória de medo contextual.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e acondicionamento

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idades entre 2 e 3 meses, pesando entre 250g e 350g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do Instituto de Ciência Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos no ratário de nosso laboratório (Laboratório de Neurobiologia da Memória), no Departamento de Biofísica, e acondicionados em caixas plásticas cobertas com grades metálicas, na quantidade de cinco animais por caixa. O assoalho das caixas era coberto com maravalha seca e autoclavada, trocada duas vezes por semana. O ciclo de iluminação do ratário é de 12h de com luzes acesas (7h às 19h) e 12h com as luzes apagadas. A temperatura é mantida constantemente em 19°C. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes nacionais de cuidado com os animais (Lei Federal 11.794 / 2008) e as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais Experimentais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA, Projeto UFRGS nº 27.143).

4.2 Procedimentos Cirúrgicos

4.2.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, respectivamente), com efeito sedativo miorelaxante e analgésico, administrados intraperitonealmente (i.p.), nas doses de 75mg/kg e 10mg/kg, respectivamente.

4.2.2 Coordenadas da estrutura e colocação das cânulas

As coordenadas foram adaptadas a partir do Atlas “*The Rat Brain*”, de Paxinos e Watson (1998) e confirmadas em cirurgias-piloto prévias. Os procedimentos foram realizados com um aparelho estereotáxico para implantação bilateral de uma cânula-guia de aço inoxidável calibre 22

nas coordenadas ântero-posterior de - 4,0 mm, látero-lateral de +/-3,0 mm, e dorso-ventral de -1,6 mm, a partir do Bregma, posicionada apenas 1,0 mm acima da área CA1 do hipocampo dorsal. As cânulas foram fixadas comacrílico dentário e um parafuso posicionado imediatamente acima do cerebelo, formando um capacete sobre o crânio.

4.2.3 Pós-operatório

Após a cirurgia, os animais eram mantidos aquecidos sob uma lâmpada vermelha de 40W, durante 2h, colocada acima da gaiola. Os ratos não enxergam o comprimento de onda vermelho, evitando assim interferência no ciclo claro/escuro. Após uma recuperação da cirurgia de 5 a 7 dias, os procedimentos comportamentais eram iniciados.

4.3 Procedimentos Comportamentais

4.3.1 Condicionamento Aversivo ao Contexto

4.3.1.1 Contexto de condicionamento

O contexto de condicionamento consiste em uma caixa de madeira, com medidas de 20 x 25 x 22cm (comprimento x largura x altura), contendo um piso de barras paralelas de aço inoxidável com calibre 0,1cm espaçadas a 1cm. A parede frontal tem um vidro transparente, para observação dos animais durante as tarefas. O ambiente possui um som de fundo constante (ruído branco).

4.3.1.2 Sessão de treino

Na sessão de treino, os animais eram colocados individualmente na caixa de condicionamento. Após 3min de habituação, recebiam dois choques nas patas, através das barras de metal. Aos 3min30s, mais dois choques eram administrados. Quando completavam-se 4min de sessão, os animais eram retirados da caixa.

A intensidade de choque para o protocolo de condicionamento fraco foi 0,4mA e para o protocolo de condicionamento forte foi 0,7mA. Apenas um experimento foi realizado com

intensidade de choque de 1mA e somente na sessão de treino deste experimento foram administrados 4 choques de cada vez, em vez de 2, totalizando 8 choques de 1mA.

4.3.1.3 Sessão de teste

Passadas 48h da sessão de treino, os animais foram reexpostos ao mesmo contexto, durante 4min, e o tempo de congelamento foi cronometrado.

4.4 Fármacos

4.4.1 Muscimol

Agonista de canais GABAA. Os animais foram divididos em dois grupos, um que recebeu infusão bilateral (0,5ul/lado) de muscimol 1% no hipocampo e um grupo que recebeu seu veículo, solução salina com pH ajustado para 7,4.

4.4.2 Lidocaína

Antagonista de canais de sódio dependentes de voltagem. Os animais foram divididos em dois grupos, um que recebeu infusão bilateral (0,5ul/lado) de lidocaína 2% no hipocampo e um grupo que recebeu seu veículo, solução salina com pH ajustado para 7,4.

4.4.3 Metirapona

Inibidor seletivo da síntese de glicocorticoides. No experimento em que essa droga foi utilizada, todos os animais receberam a dose em relação ao peso individual (50mg/kg).

4.4.4 Administração dos fármacos

Muscimol e lidocaína foram infundidos após o treino, nos tempos de 0, 3, 6 ou 9 horas, para avaliar a consolidação da memória. Grupos controle e grupos droga foram infundidos da mesma forma, com uso de um sistema propulsor automático, em fluxo de 20ul/hora

(0,5ul/90segundos). Microseringas Hamilton foram acopladas em mangueiras com uma agulha odontológica de calibre 30 na ponta, posicionadas 1mm abaixo do local onde foram fixadas as cânulas, para atingirem a região CA1 hipocampal. Cada animal teve ambos os hipocampos infundidos simultaneamente.

Metirapona foi administrada individualmente, de forma intraperitoneal (i.p.), 50 minutos antes do condicionamento de medo contextual. Uma seringa foi acoplada a uma agulha descartável de calibre 26g para a realização das injeções.

4.5 Eutanásia e controle do posicionamento das cânulas

Após o término de cada experimento, os animais foram sacrificados com guilhotina, sob efeito de anestesia, que consistiu em uma solução de tiopental associado com lidocaína (dose de 60mg/kg), aplicada intraperitonealmente. Após o sacrifício, imediatamente foram administrados 0,5ul/lado de corante azul de metileno, em cada uma das cânulas, visando aumentar o contraste das marcas das cânulas no tecido encefálico. Em seguida, os encéfalos foram dissecados e fixados em uma solução de paraformaldeído com sacarose 4%.

Os encéfalos foram posteriormente fatiados com a utilização de um criostato, para verificação do posicionamento das cânulas. Os animais com erro de coordenadas cirúrgicas ou lesões teciduais foram excluídos da análise estatística.

4.6 Análises Estatísticas

Os tempos de respostas de congelamento dos diferentes grupos foram comparados com Teste *t de Student* para amostras independentes ou ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Tukey. O limiar de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 A intensidade do estímulo determina a janela temporal da consolidação sináptica da memória

Considerando os dados robustos da literatura sobre a importância do hipocampo dorsal para o processamento da memória, primeiramente, nós investigamos se a inativação dessa estrutura prejudica a consolidação da memória de medo contextual, quando realizada imediatamente após um condicionamento de alta intensidade.

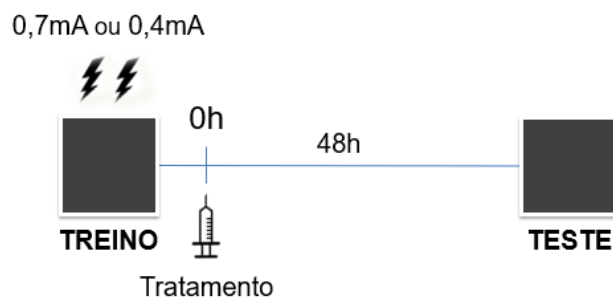
Os ratos foram operados para colocação de cânulas na região hipocampal CA1 e, no dia do treino, submetidos ao protocolo forte (0,7mA) ou fraco (0,4mA) de condicionamento aversivo ao contexto (figura 4a). Imediatamente após serem retirados do aparato de condicionamento, receberam infusão bilateral no hipocampo dorsal, do agonista GABAA muscimol ou de solução salina. O teste de memória ocorreu após 48 horas, com contabilização do tempo que os animais se mantiveram em posição de congelamento. Como esperado, os resultados analisados com ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos tanto nos fatores choque ($F(1, 31) = 12,66; p = 0,0012$) como tratamento ($F(1, 31) = 41,71; p = 0,0001$). A análise *post hoc* com teste de Tukey mostrou que, em ambos os protocolos, o muscimol reduziu a memória de medo em comparação com os grupos controle ($p < 0,05$) (figura 4b).

A literatura relata que a memória seria consolidada em até 6 horas no hipocampo (Izquierdo & Medina, 1997). Nós então testamos se a inativação hipocampal realizada 6h após o condicionamento aversivo ao contexto ainda poderia exercer efeito sobre a consolidação. Os animais foram condicionados da mesma forma que descrito acima e receberam infusão de muscimol ou solução salina 6 horas após o treino (figura 4c). A análise de ANOVA de duas vias apresentou efeitos significativos de ambos os fatores, choque ($F(1, 24) = 31,88; p = 0,0001$) e tratamento ($F(1, 24) = 8,856; p = 0,0066$). O teste *post hoc* de Tukey confirmou que o grupo tratado com muscimol após o treino fraco expressou menor congelamento do que grupo do veículo ($p < 0,05$). Essa diferença não ocorreu entre os grupos no protocolo forte ($p > 0,05$) (figura 4d).

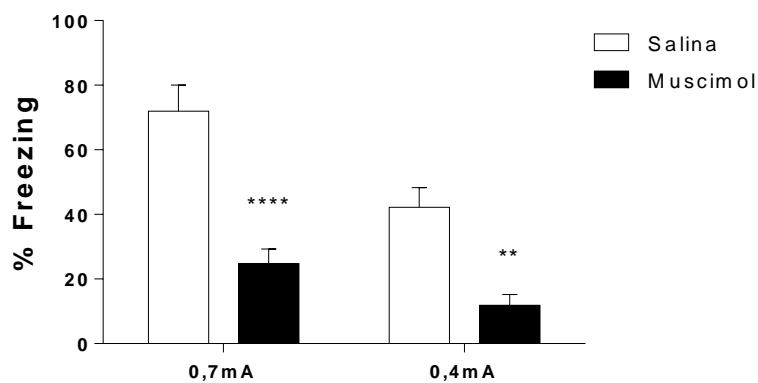
Esses resultados indicam que os processos de consolidação de uma memória de medo fraca ainda estão ocorrendo 6h após o evento aversivo. Para a consolidação de uma memória forte, porém, menos tempo é requerido. Concluimos, então, que a janela temporal da consolidação

sináptica da memória varia de acordo com a intensidade do aprendizado, e que quanto mais intenso for um estímulo, mais rápida a memória é consolidada no hipocampo.

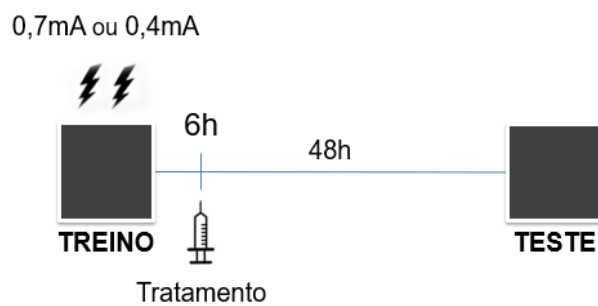
a



b



c



d

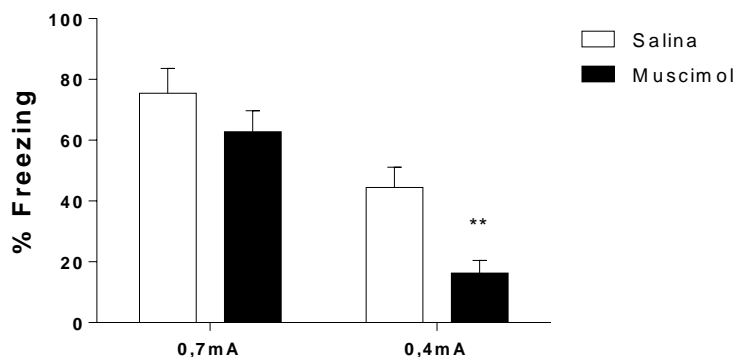


Figura 4. Todos os gráficos apresentam o percentual do tempo de congelamento dos animais na sessão de teste. O desenho experimental é apresentado no topo de cada painel. a) os animais foram treinados com o protocolo de condicionamento forte (0,7mA) ou fraco (0,4mA) e receberam infusão de muscimol ou solução salina na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após o treino. b) a inativação hipocampal reduziu a taxa de congelamento em ambas intensidades de condicionamento. c) os animais foram treinados no protocolo de condicionamento forte (0,7mA) ou fraco (0,4mA) e receberam infusão de muscimol na região CA1 do hipocampo dorsal, 6 horas após. d) a inativação hipocampal reduziu a taxa de congelamento apenas no grupo que foi submetido ao condicionamento forte. * $p \leq 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p \leq 0,0005$. $n = 7-8$ animais por grupo. ANOVA de duas vias e teste *post hoc* de Tukey.

5.2 A consolidação sináptica da memória é completada em até 3 horas com um estímulo forte e necessita de mais de 6 horas com um estímulo fraco

Os resultados acima demonstraram que a intensidade do treino modula a janela temporal da consolidação sináptica. Uma vez que a consolidação leva menos de 6h para ocorrer com um protocolo de treino forte e mais de 6h com um protocolo fraco, nos propomos investigar mais precisamente essas diferenças temporais. Ao mesmo tempo, utilizamos outro fármaco, para testar a possibilidade de generalizar os resultados para qualquer substância que provoque inativação estrutural, independentemente do seu mecanismo de ação.

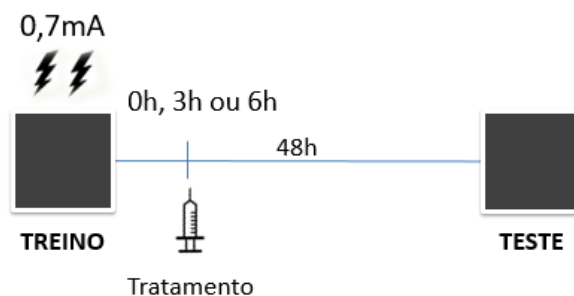
Primeiramente, os animais foram condicionados com o protocolo forte e receberam infusão de lidocaína ou solução salina em diferentes tempos (figura 5a). Uma ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do tratamento ($F(1, 33) = 8,391$; $p = 0,0066$), mas não no fator tempo ($F(2, 33) = 0,3434$; $p = 0,7118$). A análise *post hoc* de Tukey mostrou que apenas os animais tratados com lidocaína imediatamente após o treinamento expressaram menos congelamento em relação ao veículo durante o teste ($p < 0,05$), enquanto o mesmo tratamento não teve efeito 3h e 6h após o treino (figura 5b).

Os dados encontrados mostraram-se independentes do mecanismo de inativação da estrutura, sendo semelhantes para os dois fármacos. Mais importante, esses resultados indicam que a consolidação sináptica da memória do medo contextual em um condicionamento forte é completada em até 3 horas no hipocampo dorsal.

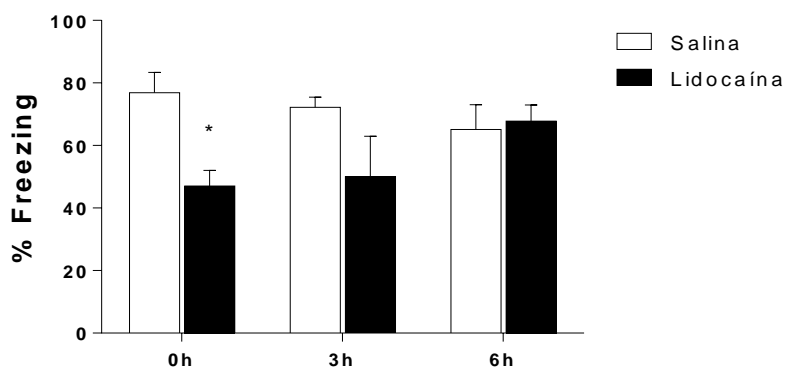
O experimento com intensidade de treino fraca e inativação hipocampal após 6 horas também foi replicado com lidocaína. Nós nos perguntamos quanto tempo levaria para a consolidação sináptica ser concluída com esse protocolo, uma vez que em 6 horas a memória ainda é passível de modulação, e investigamos então o intervalo de 9 horas (figura 5c). A ANOVA de duas vias indicou interação significativa entre os fatores droga x tempo ($F(1, 34) = 4,655$; $p = 0,0381$). O teste *post hoc* de Tukey revelou que a inativação do hipocampo com lidocaína 6h após o treinamento prejudicou a consolidação da memória ($p < 0,05$), mas não 9h mais tarde ($p > 0,05$) (figura 5d).

Em conjunto, os resultados demonstram que a janela temporal da consolidação sináptica da memória com um protocolo forte é concluída em até 3 horas, enquanto com um protocolo fraco, a consolidação é concluída entre 6 e 9 horas. Podemos então propor que estímulos com intensidade maior aceleram a consolidação da memória, tornando o traço mnemônico insensível a interferências, o que por outro lado ocorre lentamente ao longo do tempo a partir de um estímulo fraco.

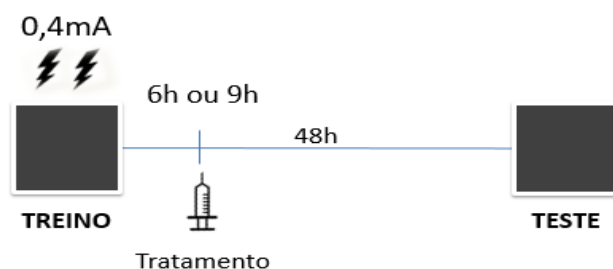
a



b



c



d

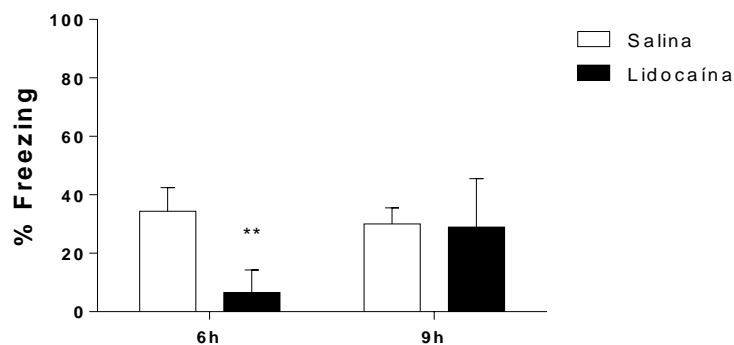


Figura 5. Todos os gráficos apresentam o percentual do tempo de congelamento dos animais na sessão de teste. O desenho experimental é apresentado no topo de cada painel. a) o protocolo de condicionamento forte foi realizado (0,7mA), com infusão dos fármacos na região CA1 do hipocampo dorsal em diferentes tempos pós-condicionamento. b) a infusão de lidocaína em CA1 reduziu a porcentagem de congelamento dos animais se realizada imediatamente após o treino, mas não 3 ou 6 horas depois. c) o protocolo fraco foi realizado (0,4mA) com infusão dos fármacos em diferentes tempos pós-condicionamento, na região CA1 do hipocampo dorsal. d) a porcentagem de congelamento foi reduzida com infusão de lidocaína em CA1 6 horas após o treino e o efeito não foi observado 9h depois. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. $n = 6-8$ animais por grupo. ANOVA de duas vias e teste post hoc de Tukey.

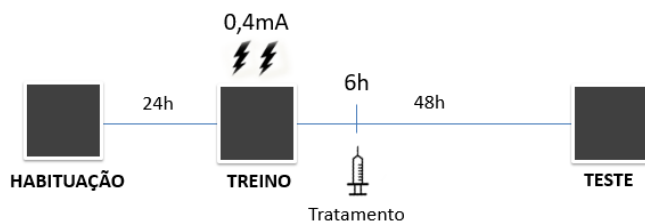
5.3 Uma pré-exposição ao contexto acelera a janela temporal da consolidação sináptica da memória de medo contextual

A partir de evidências encontradas na literatura sobre a influência da familiaridade com o contexto na formação da memória de medo contextual (Fanselow, 2000; Haubrich et al., 2016), nós investigamos se uma exposição prévia ao contexto do condicionamento promove alteração na janela temporal da consolidação sináptica da memória.

Neste protocolo, os animais foram expostos ao contexto do treino, 24 horas antes, para livre exploração durante 5 minutos. No dia seguinte, submetidos ao protocolo fraco de condicionamento de medo contextual. Após serem retirados do aparato, foram recolocados em suas caixas-moradia e, passadas 6 horas, receberam infusão bilateral no hipocampo dorsal, do agonista GABAA muscimol ou de solução salina. O teste ocorreu após 48 horas (figura. 6a).

Na sessão de teste, os animais que tiveram o hipocampo dorsal inativado apresentaram uma taxa de congelamento semelhante ao grupo controle ($t_{(14)}=0.08247$, $p=0,9$) (figura 6b). A janela temporal da consolidação foi reduzida, para menos de 6 horas, em comparação com um protocolo com mesma intensidade de choque, sem pré-exposição ao contexto (ver figura 5b). Esse resultado sugere que o conhecimento prévio do contexto promove uma aceleração na consolidação sináptica da memória de medo contextual.

a



b

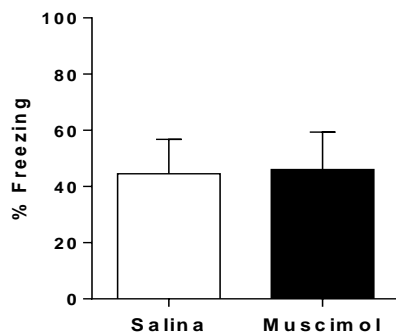


Figura 6. O gráfico apresenta o percentual do tempo de congelamento dos animais na sessão de teste. O desenho experimental é apresentado no topo do painel. a) Os animais foram pré-expostos ao contexto 24 horas antes do condicionamento de baixa intensidade (0,4mA) e infundidos com muscimol ou veículo na região CA1 di hipocampo dorsal 6 horas após. b) não houve diferença nos percentuais de congelamento entre os grupos. n=8 animais por grupo. Teste t de Student para amostras independentes.

5.4 A aceleração da consolidação sináptica da memória de medo contextual é mediada pela via dos glicocorticoides

Os experimentos anteriores levaram ao questionamento acerca de qual mecanismo molecular pode estar envolvido nos resultados obtidos. Um estudo prévio (Pedraza et al., 2015) demonstrou que a inibição da síntese dos glicocorticoides durante o momento do aprendizado promove a manutenção da precisão da memória de medo contextual por mais tempo, sugerindo seu envolvimento na consolidação sistêmica e generalização da memória. Nós então investigamos se a inibição desses hormônios poderia influenciar a janela temporal da consolidação sináptica.

Os animais utilizados neste experimento passaram pelos mesmos procedimentos cirúrgicos descritos acima e foram submetidos ao protocolo forte de condicionamento aversivo ao contexto (0,7mA). Antes do treino (50 minutos), todos receberam uma injeção intraperitoneal de metirapona (50mg/kg), um inibidor da síntese dos glicocorticoides. Após serem treinados, retornaram a suas caixas-moradia e 6 horas depois, receberam infusão bilateral no hipocampo dorsal, do agonista GABAA muscimol ou de solução salina (0,5ul/lado). Foram testados após 48 horas. (figura 7a)

Na sessão de teste, os animais que receberam muscimol apresentaram uma taxa de congelamento significativamente menor do que o grupo controle ($t_{(16)}=2,331$, $p=0,03$), indicando

que a inativação hipocampal causou um prejuízo na consolidação da memória de medo contextual (figura 7b).

Uma vez que observamos a expansão da janela temporal da consolidação sináptica (ver figura 5a para comparação), esse resultado demonstra que a síntese e a liberação de glicocorticoides durante a aquisição da memória é um mecanismo envolvido na duração da consolidação sináptica.

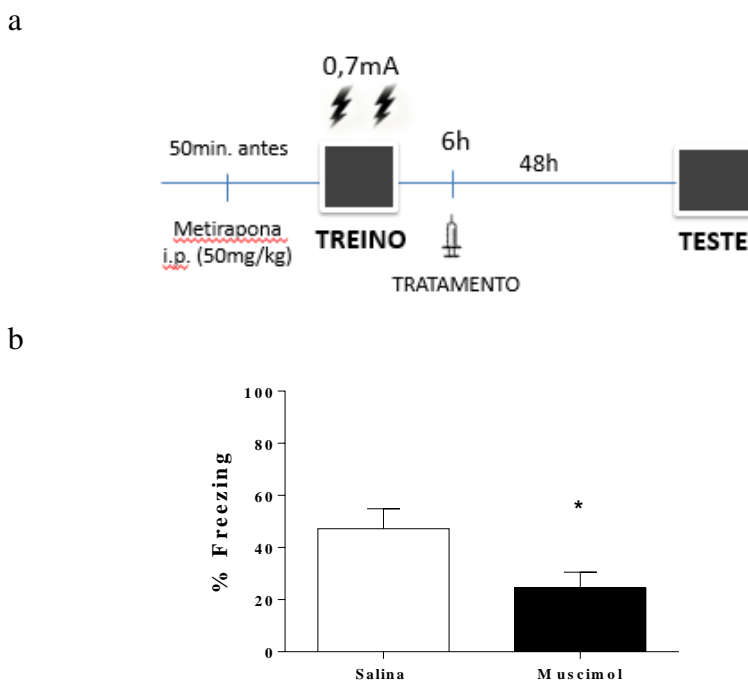


Figura 7. O gráfico apresenta o percentual do tempo de congelamento dos animais na sessão de teste. O desenho experimental é apresentado no topo do painel. a) todos animais receberam uma dose de metirapona 50 minutos antes do condicionamento forte (0,7mA) e receberam muscimol ou veículo 6 horas após, na região CA1 do hipocampo dorsal. b) a inativação hipocampal reduziu a porcentagem de congelamento dos animais, em comparação ao grupo controle. * $p < 0,05$. $n = 8$ animais por grupo. Teste *t de Student* para amostras independentes.

Além destes experimentos nós realizamos outros que, por terem gerado resultados inconclusivos, não estão descritos nessa sessão, constando como apêndice (sessão 8, pág. 51).

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a janela temporal da consolidação sináptica da memória de medo não é algo fixo e pré-determinado para qualquer experiência aversiva. A intensidade do treino e a familiaridade com o contexto são fatores que promovem variações no tempo requerido para que os mecanismos da consolidação ocorram.

Conforme assegurado por uma literatura robusta, nós observamos que o condicionamento de medo contextual está associado com o engajamento hipocampal. A importância da integridade do hipocampo dorsal na memória formada com esse paradigma é bem conhecido e relatado na literatura (Anagnostaras, Maren & Fanselow, 1999; Bast, Zhang & Feldon, 2003; Fanselow & Dong, 2010; Maren, Aharonov, & Fanselow, 1997). Nossos resultados corroboram estudos anteriores, mostrando que seu bloqueio farmacológico imediatamente após o condicionamento de medo prejudica a consolidação da memória (figura 4).

Nós demonstramos que os resultados obtidos não foram devido à ação específica do fármaco utilizado, pois reproduzimos os principais achados com um segundo, cuja farmacodinâmica difere do primeiro (figura 5). Enquanto o muscimol é um agonista dos receptores do tipo GABAA, promovendo sua ativação, a lidocaína é um antagonista dos canais de sódio dependentes de voltagem, impedindo sua ativação e a sinalização neuronal. Ambos culminam na inativação da microrregião onde são administrados, por isso são bons modelos para nosso estudo.

Aumentando o tempo entre a sessão de condicionamento e a inativação hipocampal, observa-se que o efeito das drogas foi progressivamente reduzido. Os estudos pioneiros na área da neurobiologia da memória já observavam efeitos similares e outros mais recentes continuam a corroborar a teoria da consolidação. Um fato interessante é que há diferenças de poucos minutos a várias horas na janela temporal da consolidação, entre os diferentes estudos produzidos em laboratório (Bernabeu et al., 1997; Duncan, 1949; Gold, McDonald & McGaugh, 1974; Jerusalinsky et al., 1992; Müller & Pilzecker, 1900).

Acerca disso, nós observamos que a consolidação ocorre mais rapidamente com um protocolo de condicionamento aversivo mais forte. O efeito da inibição hipocampal após esse protocolo foi observado somente imediatamente após o condicionamento, enquanto não houve diferenças entre os grupos nos tempos de 3 e 6 horas (figura 5a). Além disso, um estímulo mais forte está diretamente relacionado com a formação de uma memória robusta, o que é demonstrado

pela porcentagem de congelamento nos gráficos. Por outro lado, encontramos que o condicionamento aversivo ao contexto com uma intensidade de choque fraca (0,4mA) forma, em geral, uma memória pouco expressiva. Nossos resultados estão em consonância com outros trabalhos que utilizaram choques de baixa intensidade, como o de Maldonado, Martijena e Molina (2011), que obtiveram percentuais de congelamento dos animais de aproximadamente 20 a 30%, aplicando correntes elétricas de 0,3mA. Mais importante, com esse protocolo fraco, o tempo necessário para a conclusão da consolidação estendeu-se entre 6 e 9 horas (figura 5b). Uma análise conjunta dos resultados encontrados até aqui permite propor que o curso temporal da consolidação sináptica no hipocampo é um mecanismo dinâmico, sensível a diferenças na natureza dos estímulos recebidos. Ao avaliar o efeito da inativação do hipocampo realizado em diferentes intervalos pós-treinamento, descobrimos que o aumento da intensidade do estímulo acelera a consolidação da memória que está sendo formada, tornando o traço insensível às interferências mais rapidamente.

Na mesma linha dos nossos estudos, Parent e McGaugh (1994) demonstraram que a inibição da amígdala basolateral prejudica a memória de medo de uma maneira dependente de tempo e da intensidade do condicionamento. Com um pareamento do contexto a um choque mais forte (0,75mA), a inativação dessa estrutura 6 horas após o treino não teve qualquer efeito. O comprometimento da memória foi distinto, porém, para a intensidade de choque mais baixa empregada (0,45mA), sendo observado que 6 horas após o condicionamento fraco, a inativação estrutural ainda prejudicou a consolidação da memória.

De acordo com dados encontrados na literatura sobre a participação dos glicocorticoides na consolidação da memória, investigamos o envolvimento desses hormônios no gradiente temporal da consolidação sináptica, demonstrado no gráfico 4. Nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que os glicocorticoides desempenham uma importante função na janela temporal da consolidação sináptica, acelerando essa fase da memória, em situações de intensa aversividade.

A nível local, rapidamente, mecanismos de plasticidade são estabelecidos com a aquisição da memória de medo no hipocampo. O mesmo ocorre para as substâncias moduladoras da consolidação, que envolvem também outras estruturas. Os hormônios do estresse são amplamente estudados por sua atuação sobre a formação da memória (McGaugh, 2000) e a via dos glicocorticoides foi, recentemente, também implicada na aceleração da generalização da memória e na independência hipocampal (Pedraza et al., 2015).

A ativação noradrenérgica no núcleo basolateral da amígdala é crítica para a mediação da modulação dos glicocorticoides sobre a formação da memória (McGaugh & Roozendaal, 2009). Utilizando o paradigma do condicionamento aversivo ao contexto, foi demonstrado que a intensidade do choque induz um aumento proporcional nos níveis de noradrenalina na amígdala basolateral (Quirarte et al., 1998). Esse aumento na liberação de neurotransmissor em relação proporcional à intensidade do choque pode estar relacionado com diferentes vias intracelulares de sinalização para os diferentes protocolos utilizados em nosso estudo.

É sabido que a noradrenalina age através dos receptores β -adrenérgicos, e seus efeitos são fortemente modulados pela corticosterona (de Quervain et al., 2016). Além disso, há evidências de que além desse hormônio, a proteína quinase PKA atua sobre os mesmos receptores, modulando a ação dos glicocorticoides (Zhou et al., 2012). Um estudo (Bourtchouladze et al., 1998) utilizando diferentes intensidades de condicionamento de medo contextual mostrou que há dois períodos de sensibilidade para inibidores de PKA e de síntese proteica no sistema nervoso central após um treinamento fraco (0,5mA). Quando um choque mais forte foi utilizado (0,7mA), apenas um período foi verificado. O segundo pico coincidiu com o aumento nos níveis de AMPc e de CREB fosforilado no hipocampo, observado após um protocolo fraco (0,3mA) de esquila inibitória (Bernabeu et al., 1997). Um trabalho mais recente corrobora esses resultados, apontando que a infusão intrahipocampal de inibidor de PKA produz efeito imediatamente após um condicionamento aversivo ao tom de alta intensidade (0,7mA), mas não 6 horas após (Ahi, Radulovic & Spiess, 2004).

González-Salinas e colaboradores (2015) indicam que uma intensidade de aprendizado aversivo extremamente alto (4mA) não requer síntese proteica, dado que a memória não é sensível a inibidores de síntese proteica aplicados antes do treino. Esses resultados reforçam nossa hipótese de que treinamentos mais fortes podem recrutar um maior número de vias de transdução de sinal, e mais rapidamente, através dos glicocorticoides, permitindo que um período curto de tempo para a consolidação ocorra. A aceleração da consolidação em intensidades de treino mais fortes pode ser explicada à luz da característica adaptativa desse fato, e vias celulares e moleculares mais diretas podem ser importantes para que esse processo ocorra de forma mais rápida.

Outro estudo que apresenta dados interessantes para nossa discussão (Kishioka et al., 2013) demonstrou que a ativação dos receptores NMDA e a síntese proteica no córtex estriado são requeridas para a consolidação da memória do condicionamento aversivo ao tom, apenas quando

um choque de baixa intensidade é utilizado (0,3mA, 1s). Quando os animais foram treinados com um choque de alta intensidade (1mA), os resultados foram não significativos com a utilização de antagonista de receptores NMDA e inibidor de síntese proteica. Esses dados apoiam nossa visão, sobre a natureza dinâmica dos processos envolvidos na consolidação, demonstrando que uma estrutura pode, então, ser requerida seletivamente de acordo com a força do aprendizado.

Além da intensidade do condicionamento, demonstramos que a familiaridade com o contexto é um fator que também promove variações no tempo requerido para a consolidação. Nos resultados que apresentamos, os animais que foram habituados ao contexto 24 horas antes do treino, durante 5 minutos, expressaram uma janela temporal reduzida de consolidação sináptica da memória de medo (figura 6).

Para um condicionamento contextual efetivo, deve-se primeiramente promover a formação de uma representação do contexto (Fanselow, 2000; Maren, Phan, & Liberzon, 2013). A importância da exploração prévia ao choque é considerada em todos os protocolos que utilizam este paradigma como objeto de estudo. Por isso, os animais recebem a corrente elétrica somente alguns minutos após serem colocados na caixa de condicionamento. Fanselow (1990) conduziu um experimento evidenciando que um choque imediato falha em produzir uma associação entre contexto e choque, e os animais não expressam congelamento no teste da memória. Por outro lado, o autor constatou que uma pré-exposição ao contexto 24 horas antes do treino, com duração de poucos minutos, reduziu o tempo necessário para condicionar os animais ao aprendizado associativo. Outro estudo, com ratos jovens, demonstrou que esse efeito ocorre de forma independente da idade dos animais (Burman et al., 2009). Esses dados salientam que a formação da memória do contexto, com a experiência da habituação, está relacionada positivamente com a consolidação da memória associativa, do mesmo contexto conhecido anteriormente, agora pareado ao choque. Dessa forma, um conhecimento prévio do local onde o evento aversivo ocorreu pode ser útil para a memória de medo, do ponto de vista adaptativo, já que essa condição pode promover uma consolidação sináptica mais rápida da informação aversiva em acréscimo à memória contextual pré-existente.

Cercato e colaboradores (2017) recentemente investigaram alterações morfológicas no hipocampo de ratos após uma sessão habituação em campo aberto durante 5 minutos, similar à realizada em nosso protocolo. Os animais expressaram um aumento em receptores NMDA na região CA1 hipocampal, com duração de até 70 minutos após a sessão de habituação. O mesmo

resultado foi obtido *in vitro*, após estímulo de alta frequência em fatias hipocâmpais na mesma região. Tendo em vista que os receptores NMDA são necessários para o aprendizado e a formação de memória, assim como para a indução de plasticidade sináptica, é possível que essas mudanças estejam relacionadas com a consolidação da memória espacial no hipocampo, e que atuem como um sinal facilitatório para uma plasticidade sináptica futura. O efeito, apesar de transitório, poderia ser uma marcação do engrama que será envolvido na consolidação da memória de medo associada ao contexto. Essa marcação pode ser um “atalho” para que a consolidação da memória de medo contextual ocorra mais rapidamente quando o contexto já é conhecido, como encontrado nos nossos resultados.

Tomados em conjunto, os dados apresentados neste trabalho apresentam uma nova visão sobre a dinâmica temporal da consolidação sináptica da memória de medo contextual. Agora sabemos que diferentes intensidades de treino e a familiaridade com o contexto implicam em velocidades distintas para que os mecanismos neurobiológicos da consolidação ocorram. Esses processos parecem estar relacionados com a força da memória que será formada, e isso pode ser compreendido à luz da função adaptativa da consolidação. Um aprendizado mais fraco e menos significativo está relacionado com a consolidação mais lenta, que pode permitir a modulação seletiva das conexões sinápticas durante uma janela temporal maior. Por outro lado, a consolidação de um evento fortemente aversivo ocorre de forma rápida e robusta, possivelmente com o recrutamento de diversas estruturas corticais e subcorticais, que visam garantir o armazenamento adequado de tal experiência.

Nossos resultados representam a quebra de um dogma para a área da neurobiologia da memória, tendo em vista que a literatura sobre a consolidação da memória costuma considerar a janela temporal um fator fixo. Nós demonstramos, pelo contrário, que o tempo requerido para a consolidação sináptica de medo contextual é algo maleável, dependente de características que podem ampliar ou reduzir o tempo necessário para que os mecanismos moleculares adjacentes ocorram. Um maior conhecimento sobre esses mecanismos pode ajudar a elucidar as características específicas das memórias de medo intensas, como as traumáticas, em comparação às memórias moderadas, gerando novas possibilidades para alvos terapêuticos.

7 REFERÊNCIAS

- Abel, T., Martin, K. C., Bartsch, D., & Kandel, E. R. (1998). Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science*, 279(5349), 338–41. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.338>
- Agostinho, S. (2007). *Confissões*. (L. M. Csernik, Ed.).
- Ahi, J., Radulovic, J., & Spiess, J. (2004). The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behavioural Brain Research*, 149(1), 17–31. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00207-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00207-9)
- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, 28(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.001>
- Alberini, C. M. (2009). Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiology Review*, 89(1), 1–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>. Transcription
- Anagnostaras, S. G., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *The Journal of Neuroscience*, 19(3), 1106–14. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/2027.42/56234>
- Aubry, A., Serrano, P., & Burghardt, N. (2016). Molecular Mechanisms of Stress-Induced Increases in Fear Memory Consolidation Within the Amygdala. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10(October), 191. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2016.00191>
- Ballester, L. G. (1972). Ama y enfermedad en la obra de Galeno. *Cuadernos Hispánicos de Historia de La Medicina E de La Ciencia*, XII.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1968). Arousal and the conversion of “short-term” to “long-term” memory. *Neal E. Miller*, 923–929.
- Bast, T., Zhang, W. N., & Feldon, J. (2003). Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: Effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus*, 13(6), 657–675. <https://doi.org/10.1002/hipo.10115>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2016). *Neuroscience - Exploring the Brain* (4th ed.).
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2007). Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*, 53(2), 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., ... Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling

pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 7041–7046. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21281&tool=pmcentrez&render_type=abstract

- Bindra, D., & Anchel, H. (1963). Immobility as an avoidance response, and its disruption by drugs. *Journal of the Experimental Analysis of ...*, 6(2), 213–8. <https://doi.org/10.1901/jeab.1963.6-213>
- Bliss, T. V. P., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, 232, 331–356.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bollen, E., Puzzo, D., Rutten, K., Privitera, L., De Vry, J., Vanmierlo, T., ... Prickaerts, J. (2014). Improved long-term memory via enhancing cGMP-PKG signaling requires cAMP-PKA signaling. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(11), 2497–505. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.106>
- Bolles, R. C., & Riley, A. L. (1973). Freezing as an avoidance response: Another look at the operant-respondent distinction. *Learning and Motivation*, 4(3), 268–275. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(73\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0023-9690(73)90016-7)
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998). Different Training Procedures Recruit Either One or Two Critical Periods for Contextual Memory Consolidation, Each of Which Requires Protein Synthesis and PKA. *Learning & Memory*, 5, 365–374.
- Bouton, M. E. (1993). Bouton 1993 extinction.pdf. *Psychological Bulletin*, 114(1), 80–99.
- Burman, M. A., Murawski, N. J., Schiffino, F. L., Rosen, J. B., & Stanton, M. E. (2009). Factors governing single-trial contextual fear conditioning in the weanling rat. *Behavioral Neuroscience*, 123(5), 1148–1152. <https://doi.org/10.1037/a0016733>
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences*, 21(7), 294–299. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01214-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01214-9)
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1998). Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2669–2676. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00254.x>

- Cercato, M. C., Vázquez, C. A., Kornisiuk, E., Aguirre, A. I., Colettis, N., Snitcofsky, M., ... Baez, M. V. (2017). GluN1 and GluN2A NMDA Receptor Subunits Increase in the Hippocampus during Memory Consolidation in the Rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*(January), 242. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00242>
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation Enables Memory Updating, Precision-Keeping and Strengthening: Exploring the Possible Biological Roles of Reconsolidation. *Neuroscience*, *244*(April), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>
- de Quervain, D., Schwabe, L., & Roozendaal, B. (2016). Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.155>
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, *55*(1), 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Dudai, Y. (2012). The Restless Engram: Consolidations Never End. *Annual Review of Neuroscience*, *35*(March), 227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150500>
- Duncan, C. P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *42*, 32–44.
- Ebbinghaus, H. (2013). Memory: A Contribution to Experimental Psychology. *Annals of Neurosciences*, *20*(4), 155–156. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5281-2_281
- Fanselow, M. S. (1990). Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning & Behavior*, *18*(3), 264–270. <https://doi.org/10.3758/BF03205285>
- Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research. Special issue: Pavlovian conditioning, behaviour and the brain*. *Behavioural Brain Research*, *110*, 73–81.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, *65*(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Flexner, J. B., Flexner, L. B., & Stellar, E. (1963). Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science (New York, N.Y.)*, *141*(3575), 57–9. <https://doi.org/10.1126/science.141.3575.57>
- Flexner, L. B., Flexner, G. de L. H., & Roberts, R. B. (1965). Loss of memory in mice as related to regional inhibition of cerebral protein synthesis. *Journal of Neurochemistry*, *12*, 535–541.
- Fonseca, R., Vabulas, R. M., Hartl, F. U., Bonhoeffer, T., & Nägerl, U. V. (2006). A Balance of Protein Synthesis and Proteasome-Dependent Degradation Determines the Maintenance of LTP. *Neuron*, *52*, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.015>

- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(2), 119–30. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>
- Gerber, B. (2000). Contextual Modulation of Memory Consolidation. *Learning & Memory*, *7*(3), 151–158. <https://doi.org/10.1101/lm.7.3.151>
- Gibbs, M. E., Hutchinson, D. S., & Summers, R. J. (2010). Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; roles for α - and β -adrenergic receptors. *Neuroscience*, *170*, 1209–1222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.07.052>
- Giese, K. P., & Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & Memory*, *20*(10), 540–52. <https://doi.org/10.1101/lm.028449.112>
- Gold, P. E., McDonald, R., & Mcgaugh, J. L. (1974). Direct cortical stimulation: a further study of treatment intensity effects on retrograde amnesia gradients. *Behavioral Biology*, *10*(Abstract No. 3185A), 485–490. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(74\)92077-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(74)92077-X)
- González-Salinas, S., Medina, A. C., Marín-Vignando, V., Ruiz-López, C. X., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2015). Protein synthesis is not required for acquisition, consolidation, and extinction of high foot-shock active avoidance training. *Behavioural Brain Research*, *287*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.031>
- Hardt, O., Nader, K., & Nadel, L. (2013). Decay happens: The role of active forgetting in memory. *Trends in Cognitive Sciences*, *17*(3), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.01.001>
- Hartley, T., Maguire, E. A., Spiers, H. J., & Burgess, N. (2003). The Well-Worn Route and the Path Less Traveled. *Neuron*, *37*(5), 877–888. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00095-3)
- Haubrich, J., Cassini, L. F., Diehl, F., Santana, F., Fürstenau de Oliveira, L., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2016). Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. *Hippocampus*, *26*(7), 924–932. <https://doi.org/10.1002/hipo.22575>
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. a, & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, *393*(6686), 635–636. <https://doi.org/10.1038/31371>
- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, *96*(2), 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, *68*(3), 285–316. <https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate

- mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research* 103, 103, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00036-4)
- Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2013). The ubiquitin–proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiol*, 105, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.03.009>
- Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B. C., Walz, R., Da Silva, R. C., Bianchin, M., Ruschel, A. C., ... Izquierdo, I. (1992). Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behavioral and Neural Biology*, 58, 76–80. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90982-A](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90982-A)
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147(3), 509–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009>
- Kandel, E. (2012). *Principles of Neuroscience* (4th editio).
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. *Science*, 294(5544), 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Karpova, A. (2006). Involvement of Protein Synthesis and Degradation in Long-Term Potentiation of Schaffer Collateral CA1 Synapses. *Journal of Neuroscience*, 26(18), 4949–4955. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4573-05.2006>
- Kim, J., & Tsien, R. W. (2008). Synapse-Specific Adaptations to Inactivity in Hippocampal Circuits Achieve Homeostatic Gain Control while Dampening Network Reverberation. *Neuron*, 58(6), 925–937. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.009>
- Kim, K., Lakhanpal, G., Lu, H. E., Khan, M., Suzuki, A., Hayashi, M. K., ... Okamoto, K. (2015). A temporary gating of actin remodeling during synaptic plasticity consists of the interplay between the kinase and structural functions of CaMKII. *Neuron*, 87(4), 813–826. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.023>.
- Kishioka, A., Uemura, T., Fukushima, F., & Mishina, M. (2013). Consolidation of auditory fear memories formed by weak unconditioned stimuli requires NMDA receptor activation and de novo protein synthesis in the striatum. *Molecular Brain*, 6(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-17>
- Lee, J. L. C., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 26(39), 10051–10056. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2466-06.2006>
- Lee, J. Q., Zelinski, E. L., McDonald, R. J., & Sutherland, R. J. (2016). Heterarchic reinstatement of long-term memory: A concept on hippocampal amnesia in rodent memory research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 71, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.08.034>
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term

- potentiation. *Biophysical Chemistry*, 13(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Lonergan, M. H., Olivera-Figueroa, L. A., Pitman, R. K., & Brunet, A. (2013). Propranolol's effects on the consolidation and reconsolidation of long-term emotional memory in healthy participants: A meta-analysis. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 38(4), 222–231. <https://doi.org/10.1503/jpn.120111>
- Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M. R. M., Viola, H., Mello, T., Izquierdo, I., ... Medina, J. H. (2001). The Ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, 14, 1820–1826.
- Lucchesi, W., Mizuno, K., & Giese, K. P. (2011). Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Research Bulletin*, 85, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.10.009>
- Lyons, L. C., Gardner, J. S., Gandour, C. E., & Krishnan, H. C. (2016). Role of proteasome-dependent protein degradation in long-term operant memory in *Aplysia*, 24, 59–64. <https://doi.org/10.1101/lm.043794.116>
- Maldonado, N. M., Martijena, I. D., & Molina, V. A. (2011). Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: Reversal by midazolam pretreatment. *Behavioural Brain Research*, 225, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.035>
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: Review An Embarrassment of Riches. *Neuron*, 44, 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1999). Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science*, 285(5435), 1870–1874. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1870>
- Malinow, R., Schulman, H., & Tsien, R. W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 245, 862–6. <https://doi.org/10.1126/science.2549638>
- Maren, S., Aharonov, G., & Fanselow, M. S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, 88(2), 261–274. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00088-0)
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 417–428. <https://doi.org/10.1038/nrn3492>
- McGaugh, J. L. (2015). Consolidating Memories. *Annu. Rev. Psychol.*, 66, 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-014954>
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science (New York, N.Y.)*, 153(3742), 1351–8. <https://doi.org/10.1126/science.153.3742.1351>

- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- McGaugh, J. L., & Petrinovich, L. F. (1965). Effects of drugs on learning and memory. *International Review of Neurobiology*, 8, 139–96. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60757-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60757-6)
- McIntyre, C. K., McGaugh, J. L., & Williams, C. L. (2012). Interacting Brain Systems Modulate Memory Consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1750–1762. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.11.001>
- Merlo, E., & Romano, A. (2007). Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience*, 147, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.022>
- Morris, R. G. M., Davis, S., & Butcher, S. P. (1990). Hippocampal Synaptic Plasticity and NMDA Receptors: A Role in Information Storage? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 329(1253), 187–204. <https://doi.org/10.1098/rstb.1990.0164>
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & Keefe, J. O. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. <https://doi.org/0028-0836/82/250681>
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900). *Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. Zeitschrift für Psychologie* (Vol. 1).
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. *Zeitschrift Für Psychologie*, 1, 300.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Nguyen, P. V., Abel, T., & Kandel, E. R. (1994). Requirement of a Critical Period of Transcription for Induction of a Late Phase of LTP. *Science*, 265, 1104–1107.
- O'Brien, R. J., Kamboj, S., Ehlers, M. D., Rosen, K. R., Fischbach, G. D., & Huganir, R. L. (1998). Activity-dependent modulation of synaptic AMPA recdptor accumulation. *Neuron*, 21(1989), 1067–1078.
- Parent, M. B., & McGaugh, J. L. (1994). Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Research*, 661(1–2), 97–103. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91186-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91186-X)
- Parsons, R. G., & Davis, M. (2012). A Metaplasticity-like Mechanism Supports the Selection of Fear Memories: Role of Protein Kinase A in the Amygdala. *J. Neurosci.*, 32(23), 7843–7851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0939-12.2012.A>

- Pavlov, I. P. (1927). Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of Neurosciences*. <https://doi.org/10.5214/ans.0972-7531.1017309>
- Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Boos, F. Z., Haubrich, J., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2015). The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*, *26*(3), 362–371. <https://doi.org/10.1002/hipo.22527>
- Platão. (1991). *Fédon*. São Paulo: Nova Cultural (seleção de). São Paulo.
- Platão. (2011). *Timeu-Crítias*. (C. de E. C. e Humanísticos, Ed.), *Colecção Autores Gregos e Latinos* (1st ed.).
- Quirarte, G. L., Galvez, R., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiol Learn Mem*, *66*(3), 253–257. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0067>
- Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews. Neuroscience*, *12*(1), 17–30. <https://doi.org/10.1038/nrn2963>
- Riedel, W. J., & Blokland, A. (2015). Cognitive Enhancement. In *Cognitive Enhancement* (pp. 233–271). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417042-1.00010-3>
- Schiff, H. C., Johansen, J. P., Hou, M., Bush, D. E., Smith, E. K., Klein, J. E., ... Sears, R. M. (2016). Neuropsychopharmacology www.neuropsychopharmacology.org b-Adrenergic Receptors Regulate the Acquisition and Consolidation Phases of Aversive Memory Formation through Distinct, Temporally-Regulated Signaling Pathways. *Neuropsychopharmacology Accepted*, *42*(4). <https://doi.org/10.1038/npp.2016.238>
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *20*(11), 11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>
- Sol Fustiñana, M., Federman, N., Freudenthal, R., & Romano, A. (2014). Protein degradation by ubiquitin-proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory. *Learning & Memory*, *21*(9), 478–87. <https://doi.org/10.1101/lm.035998.114>
- Squire, L. R. (1986). Mechanisms of memory, *232*(1983).
- Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, *440*(7087), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nature04671>
- Suassuna, D., Jônatas, B., Azevedo, A., & Sampaio, J. (2005). A relação corpo-natureza na modernidade. *Sociedade E Estado*, *20*(1), 23–38.
- Sweatt, J. D. (2016). Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 179–199. <https://doi.org/10.1111/jnc.13580>

- Szirmai, I., Buzsáki, G., & Kamondi, A. (2012). 120 years of hippocampal Schaffer collaterals. *Hippocampus*, 22(7), 1508–1516. <https://doi.org/10.1002/hipo.22001>
- Turrigiano, G. (2011). Homeostatic synaptic plasticity: Local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005736>
- Wallenstein, G. V, Vago, R., & Walberer, A. M. (2002). Time-dependent involvement of PKA / PKC in contextual memory consolidation, 133, 159–164.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning Induces Long Term Potentiation in the Hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093–1097. <https://doi.org/10.1126/science.1128134>
- Winocur, G., & Moscovitch, M. (2011). Memory Transformation and Systems Consolidation. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 17(5), 766–780. <https://doi.org/10.1017/S1355617711000683>
- Winocur, G., Moscovitch, M., & Bontempi, B. (2010). Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychologia*, 48(8), 2339–2356. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.04.016>
- Wolf, O. T., Atsak, P., Quervain, D. J. de, Roozendaal, B., & Wingenfeld, K. (2016). Stress and memory: A selective review on recent developments in the understanding of stress hormone effects on memory and their clinical relevance. *J Neuroendocrinol.*, 28(8). <https://doi.org/10.1111/jne.12353>
- Yates, F. (1966). *The Art of Memory* (Selected w, Vol. III).
- Zhou, M., Hoogenraad, C. C., Joels, M., & Krugers, H. J. (2012). Combined α -adrenergic and corticosteroid receptor activation regulates AMPA receptor function in hippocampal neurons. *Journal of Psychopharmacology*, 26(4), 516–524. <https://doi.org/10.1177/0269881111424930>

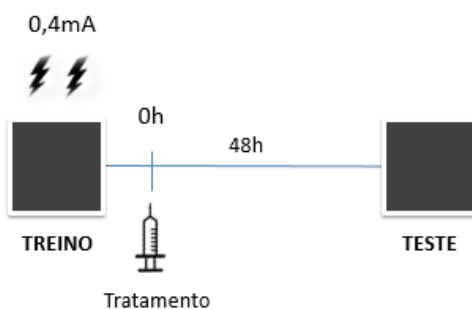
8 APÊNDICE

Resultados de experimentos não conclusivos.

8.1 Inativação hipocampal por lidocaína imediatamente após o condicionamento fraco não apresentou efeito sobre a consolidação da memória

Neste experimento realizamos novamente o protocolo fraco de condicionamento aversivo ao contexto, com o objetivo de replicar com outra droga o resultado encontrado com muscimol e descrito na figura 4c. Para isso, os animais receberam uma infusão de lidocaína ou solução salina na região hipocampal CA1 imediatamente após o treino. Surpreendentemente, não foi encontrada diferença entre os percentuais de congelamento dos grupos durante o teste ($t_{(13)}=1,191$; $p=0,2$).

a



b

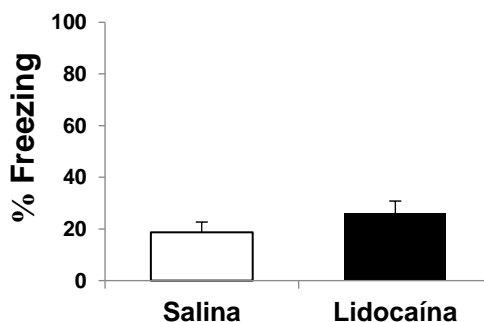


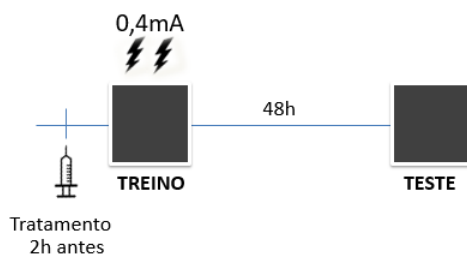
Figura 8. As barras apresentam o percentual do tempo de congelamento dos animais na sessão de teste (freezing). O desenho experimental é apresentado no topo do painel. a) O protocolo de condicionamento fraco foi realizado, com infusão de lidocaína na região CA1 do hipocampo dorsal. O teste de memória ocorreu 48 horas após o condicionamento. b) não foram observadas diferenças nos percentuais de congelamento entre os grupos. $p>0,05$. $n = 18$ animais por grupo. Teste *t de Student* para amostras independentes.

8.2 Inativação hipocampal por lidocaína antes do condicionamento de medo fraco promoveu uma facilitação sobre a consolidação

Após encontrar o intrigante resultado descrito acima, repetimos o protocolo com infusão de lidocaína 2h antes do teste. Esse experimento foi realizado para investigar uma possível alteração transitória da droga sobre a plasticidade local que justificasse a ausência de efeito encontrada. Na sessão de teste, os animais que receberam lidocaína em CA1 apresentaram uma taxa de congelamento significativamente maior do que o grupo controle ($t_{(11)}=2,373$ $p=0,02$). A inativação hipocampal facilitou a consolidação da memória de medo.

Uma hipótese para esse resultado é que possa ter ocorrido um mecanismo de plasticidade sináptica compensatória, visando manter os circuitos neurais estáveis, após a influência desestabilizadora da inativação da estrutura. Isto é, como a lidocaína causa uma brusca diminuição da atividade neuronal local durante um certo tempo, mecanismos homeostáticos podem ter ocorrido em seguida, aumentando a força das conexões sinápticas. Esse fenômeno tem sido relatado em estudos, chamado de “escalamento sináptico” (do inglês, *synaptic scaling*). (J. Kim & Tsien, 2008; O’Brien et al., 1998; Stellwagen & Malenka, 2006; Turrigiano, 2011). Nós não utilizamos outros testes para investigar esses resultados, portanto, não há considerações conclusivas.

a



b

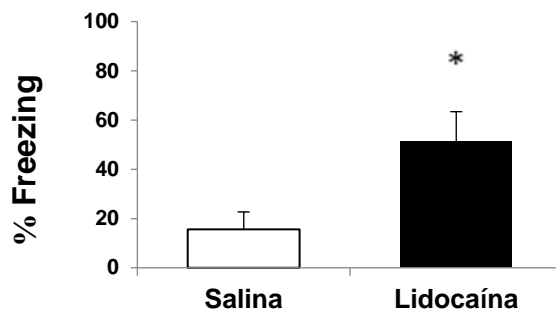


Figura 9. As barras apresentam o percentual do tempo de congelamento dos animais na sessão de teste (freezing). O desenho experimental é apresentado no topo do painel. a) O protocolo de condicionamento fraco foi realizado, com infusão de lidocaína na região CA1 do hipocampo dorsal 2 horas antes. O teste de memória ocorreu 48 horas após o condicionamento. b) a inativação hipocampal facilitou a consolidação da memória, em comparação aos animais do grupo controle. * $p < 0,05$. $n=7$ animais por grupo. Teste *t de Student* para amostras independentes.

8.3 Inativação hipocampal por lidocaína antes da reativação não promoveu efeito sobre a reconsolidação da memória de medo contextual no protocolo fraco

Neste experimento nós testamos o efeito da inativação hipocampal sobre a reconsolidação da memória. Para isso, adaptamos o protocolo de condicionamento fraco (0,4mA), com o objetivo de verificar se ocorreria algum fenômeno semelhante aos experimentos anteriores. Como a reconsolidação está associada com a desestabilização da memória já consolidada, seus protocolos experimentais incluem exposições curtas ao estímulo do aprendizado, chamadas de “reativação”, que promovem uma sinalização molecular semelhante à da consolidação sináptica (Alberini, 2005). Nesse protocolo, os animais foram treinados e após 24 horas foi realizada uma sessão de reativação da memória, onde os animais foram expostos ao mesmo contexto, porém sem choque, durante 4 minutos. Antes dessa sessão (2 horas), lidocaína ou solução salina (0,5ul/lado) foi administrada na região hipocampal CA1. Durante essa sessão, o congelamento foi contabilizado e os animais do grupo droga apresentaram uma taxa menor do que o grupo controle ($t_{(13)}=2,256$ $p=0,04$). Passadas outras 24 horas, ocorreu o teste, durante o qual não foi observada diferença nas taxas de congelamento entre os grupos ($t_{(17)}=1,2582$ $p=0,1$). Esses resultados sugerem que o mecanismo responsável pela facilitação

da consolidação da memória, observada no experimento anterior, possivelmente não ocorre da mesma forma na reconsolidação.

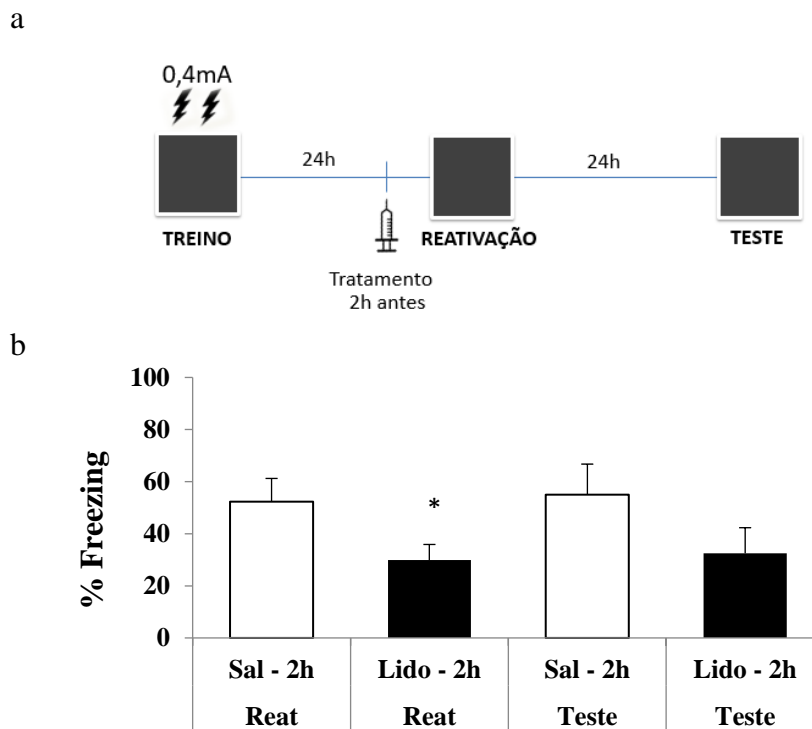


Figura 10. As barras apresentam o percentual do tempo de congelamento dos animais na sessão de reativação e de teste (freezing). O desenho experimental é apresentado no topo do painel. a) no protocolo de condicionamento fraco, a infusão de lidocaína em CA1 2 horas da reativação diminuiu a porcentagem de congelamento dos animais, em comparação aos animais do grupo controle. b) no mesmo protocolo, a infusão de lidocaína em CA1 2 horas antes do teste não apresentou efeito. $n=9-10$ animais por grupo. Teste *t de Student* para amostras independentes.