

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Centro de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

JULIANA CAVALCANTE DE MOURA

**A consolidação prévia de informação conflitante e não aversiva é necessária
para a reconsolidação da memória de esquia inibitória no hipocampo**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Rio Grande
do Norte, para obtenção do título de
Mestre em Psicobiologia.

Natal

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Centro de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

JULIANA CAVALCANTE DE MOURA

**A consolidação prévia de informação conflitante e não aversiva é necessária
para a reconsolidação da memória de esquia inibitória no hipocampo**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Rio Grande
do Norte, para obtenção do título de
Mestre em Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Martin Pablo
Cammarota

Natal

2016

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Moura, Juliana Cavalcante de.

A consolidação prévia de informação conflitante e não aversiva é necessária para a reconsolidação da memória de esquia inibitória no hipocampo / Juliana Cavalcante de Moura. – Natal, RN, 2016.

30 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Martin Pablo Cammarota.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

1. Memória. – Dissertação. 2. Reativação. – Dissertação. 3. Esquia inibitória. – Dissertação. I. Cammarota, Martin Pablo. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 159.953.2

**A consolidação prévia de informação conflitante e não aversiva é necessária
para a reconsolidação da memória de esquiva inibitória no hipocampo**

Juliana Cavalcante de Moura

Natal, 22 de Março de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Martin Pablo Cammarota

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN

Prof^a. Dra. Lia Rejane Muller Bevilaqua

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN

Prof^a. Dra. Maria Bernardete Cordeiro de Sousa

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN

Agradecimentos

À minha família e ao meu noivo por ter estado sempre ao meu lado, me apoiando e compreendendo as horas diminuídas de momentos juntos que não voltam mais;

Ao professor Martin Cammarota que me aceitou no laboratório e com tanto apreço me orientou, me estimulou e confiou no meu trabalho;

Aos amigos de laboratório que, com muita paciência, me ajudaram com os experimentos e com a escrita da dissertação, além de me ajudarem a tomar as decisões importantes da vida;

Às professoras Dr^a Lia Bevilaqua e Dr^a Maria Bernardete por terem aceitado o convite para participar da banca; e

Ao CNPQ pelo financiamento da bolsa no início do mestrado.

RESUMO

A reativação pode levar as memórias consolidadas a um novo estado de labilidade, tornando-as suscetíveis à incorporação de nova informação através de um processo de reestabilização dependente da expressão gênica e da síntese de novas proteínas conhecido como reconsolidação. A interrupção da reconsolidação usualmente produz amnésia. Contudo, algumas memórias são particularmente resistentes a agentes bloqueadores da reconsolidação, indicando que este processo ocorre somente quando uma série específica de condição é dada. Utilizando ferramentas farmacológicas e comportamentais, neste trabalho demonstramos que a consolidação prévia de informação não aversiva é essencial para a reconsolidação da memória de esquiva inibitória em ratos.

Palavras-chave: Memória, Reativação, Reconsolidação, Esquiva Inibitória

ABSTRACT

Reactivation can render consolidated memories labile again, making them prone to incorporate new information through a gene-expression and protein synthesis dependent restabilization process referred to as reconsolidation. Disruption of reconsolidation usually produces amnesia. However, some memories are particularly resilient to reconsolidation blockers, indicating that this process is not a pervasive quality of memory but happens only when a precise set of conditions occurs. Using pharmacological and behavioral tools we demonstrated that previous consolidation of non-aversive information is essential for aversive memory reconsolidation.

Key Words: Memory, Retrieval, Reconsolidation, Inhibitory Avoidance

Lista de Abreviaturas

AMA – Amanitina

ANI – Anisomiscina

AP5 – Ácido 2-amino-5-fosfopentacético

CA1 – Corno de Amon 1

DMSO – Dimetilsulfóxido

EI – Esquiva Inibitória

i.p. – Intra-peritoneal

MCD – Memória de Curta Duração

MLD – Memória de Longa duração

mRNA – Ácido Ribonucleotídeo Mensageiro

NMDA – N-metil D-aspartato

PTSD – Transtorno de Estresse pós Traumático

Lista de figuras

- Figura 1** - A imagem mostra uma coloração de Nissl de uma seção coronal do cérebro de rato revelando a localização da infusão da cânula na região CA1 do hipocampo dorsal. Barra de escala 500µm.....10
- Figura 2** - Esquema do delineamento experimental.....12
- Figura 3** - A exploração prévia de um campo aberto ou pré-exposição na caixa de treino de EI não influenciam a formação ou a persistência da memória de EI.....13
- Figura 4** - A latência de descida da plataforma diminui gradativamente durante as sessões de pré-exposição na caixa de treino de EI. No dia do treino na tarefa de EI, a latência de descida da plataforma é menor nos animais pré-expostos.....14
- Figura 5** - Esquema do delineamento experimental.....15
- Figura 6** - A inibição da expressão gênica ou da síntese proteica no hipocampo dorsal imediatamente após a sessão de reativação afeta a retenção da memória de EI dos animais que foram submetidos a um aprendizado prévio não aversivo em EI.....16
- Figura 7** - Esquema do delineamento experimental.....18
- Figura 8** - O bloqueio da formação da memória prévia não aversiva conflitante com aquela adquirida durante o treino em EI impede o bloqueio da reconsolidação causado pela infusão de AMA.....18

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. OBJETIVO GERAL.....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. HIPÓTESES	6
4. METODOLOGIA.....	7
4.1. ANIMAIS	7
4.2. CIRURGIA ESTEROTÁXICA	7
4.3. TESTE COMPORTAMENTAL.....	7
4.4. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	9
4.5. CONTROLE HISTOLÓGICO.....	10
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
5. RESULTADOS	12
6. DISCUSSÃO	20
7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS	25

1. Introdução

As memórias são representações mentais de experiências aprendidas que podem promover mudanças no comportamento do indivíduo. Supõe-se que o processamento mnemônico consta de três fases: a codificação, o armazenamento e a expressão. Na codificação podem identificar-se duas etapas, a aquisição e a consolidação. A aquisição compreende a obtenção de informações de um determinado evento e induz um padrão de atividade neural capaz de codificar a informação aprendida e representá-la no que chamamos de engrama. Dependendo do tipo de informação adquirida, a memória pode durar de segundos a poucas horas, tempo suficiente para sua utilização (memória de curta duração (MCD)). Se tal evento tem relevância significativa para o indivíduo, pode se tornar duradoura, modificando e estabilizando a força e resposta sináptica da rede neural envolvida pelo mecanismo de consolidação. O armazenamento é o resultado do processo de aquisição e consolidação que mantém persistente o traço mnemônico (Tronson & Taylor, 2007). As memórias, uma vez consolidadas, podem ser acessadas pelo mecanismo de evocação (Giachero et al., 2013). Nessa fase ocorre a reativação dos circuitos sinápticos formados durante a codificação, na qual o indivíduo é capaz de acessar a informação armazenada e expressá-la comportamentalmente (Tulving et al., 1983). Por muito tempo, a teoria clássica da consolidação levou a acreditar que as informações uma vez adquiridas apresentavam somente uma etapa de estabilização e, assim que consolidadas, não seriam mais passíveis de modificações. No entanto,

nos anos 60 e 70, alguns trabalhos sugeriram que as memórias já consolidadas podiam ser modificadas após a sua evocação (Misanin et al., 1968; Mactutus et al., 1979). Misanin e colaboradores sugeriram que as memórias de longa duração (MLD) são suscetíveis à ação amnésica de diversos tratamentos, tais como eletrochoque e traumas cerebrais, após a sua expressão (Misanin et al., 1968). Anos mais tarde, Przybyslawski & Sara (1997) mostraram que a memória é um processo dinâmico que requer reorganização contínua com função de atualizar as experiências vividas. Nesse trabalho, foi mostrado que a injeção de um antagonista de receptor NMDA, após a evocação da memória espacial, é capaz de afetar a sua retenção. Hoje, sabe-se que a evocação da memória pode desencadear a extinção ou a reconsolidação do traço mnemônico (Alberini, 2011). A extinção é um novo aprendizado capaz de inibir persistentemente a expressão da memória original (Pavlov 1927; Suzuki, 2004; de Oliveira Alvares et al., 2008; Rossato et al., 2010; Radiske et al., 2015)

Utilizando a tarefa de medo condicionado, Nader e colaboradores (Nader, 2000a;b) comprovaram que a injeção intra-amígdala de agentes amnésicos após a evocação da memória em questão induz uma amnésia persistente. Este efeito não foi observado na ausência de expressão da memória. Isso sugeriu que a reativação leva à labilização do traço e à ocorrência de um novo processo de estabilização dependente de expressão gênica e síntese proteica, denominado reconsolidação (Nader et al., 2000; Rossato et al., 2006). A reconsolidação cumpre um papel adaptativo crucial por atuar na manutenção da relevância mnemônica em um ambiente constantemente mutável. Contudo, o processo de reconsolidação parece não ser um

fenômeno ubíquo, senão que sua indução depende da ocorrência de um conjunto preciso de condições durante a reativação da memória. O delineamento dessas condições limitantes é crucial para o entendimento sobre a natureza da reconsolidação e para explicar os mecanismos pelos quais as memórias são atualizadas e modificadas. As condições que determinam a ocorrência da reconsolidação incluem, dentre outras, a idade e a força do traço mnemônico (Milekic & Alberini, 2002; Eisenberg & Dudai, 2004; Frankland et al., 2006; Morris et al., 2006; Eisenberg, 2010), a similaridade do contexto onde a memória foi adquirida e reativada, e a duração da sessão de reativação (Pedreira & Maldonado, 2003; Duvarci & Nader, 2004; Pedreira, 2004; Lee et al., 2006; Tronson et al., 2006). Memórias recentes e/ou fortes são mais suscetíveis a manipulações pós-reativação. A disponibilidade de novas informações durante a reativação também parece ser uma condição limitante (Biedenkapp & Rudy, 2004; Pedreira, 2004; Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Morris et al., 2006). Porém, necessita-se de mais estudos para saber como as distintas condições que restringem a ocorrência da reconsolidação interagem entre si.

A esquiva inibitória (EI) é um paradigma de aprendizado apropriado para o estudo do processamento de memórias aversivas em roedores. A consolidação da MLD associada ao aprendizado deste paradigma requer o envolvimento funcional do hipocampo em distintos momentos após o treino (Cammara et al., 2005). Porém, a inibição da síntese de proteínas no hipocampo durante a expressão não reforçada da memória de EI não causa amnésia (Bevilaqua & Medina, 2004), sugerindo que a reativação deste traço mnemônico não induz sua reconsolidação ou, alternativamente,

que algum fator não conhecido impede a ocorrência desse processo. A resolução deste problema é de substancial interesse, já que um dos sintomas do transtorno de estresse pós-traumático (PTSD) consiste em evitar situações capazes de trazer novamente à tona vivências de caráter aversivo (American Psychiatric Association, 2013). Sabendo disso, o bloqueio da reconsolidação parece ser uma alternativa terapêutica factível para o tratamento de pacientes com PTSD ou outras desordens caracterizadas pela sensação exacerbada de ansiedade e medo (Pitman, 2011; Gamache et al., 2012).

Previamente, nosso grupo demonstrou que uma curta sessão de treino na tarefa de EI induz uma MLD que persiste mais do que 6 semanas (Gonzalez et al., 2014). No entanto, a expressão repetida desta MLD na ausência do choque elétrico que promoveu sua indução leva à extinção da memória. Surpreendentemente, a infusão intra-hipocampal de inibidores da síntese de mRNA e proteínas imediatamente após a expressão da memória de extinção causa o reaparecimento da resposta aversiva previamente aprendida (Rossato et al., 2010; Radiske et al., 2015). Esta observação indica que, ao contrário do que acontece com a memória de EI, a memória de extinção é sim susceptível à ocorrência de um processo reconsolidatório, e sugere que a consolidação prévia de informação não aversiva conflitante com aquela adquirida durante o treino em EI poderia ser uma condição *sine qua non* para que a memória de EI se torne lábil e suscetível à reconsolidação após a sua expressão.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar se a consolidação prévia de informação não aversiva, conflitante com aquela a ser aprendida durante o treino de esquiva inibitória, é necessária para a reconsolidação desta memória.

2.2. Objetivos Específicos

- Estudar a influência do aprendizado prévio sobre a reconsolidação da memória de esquiva inibitória;
- Estudar a natureza da amnésia induzida pela inibição da expressão gênica hipocampal após a reativação da memória de esquiva inibitória nos animais submetidos ao aprendizado prévio não aversivo.

3. Hipóteses

Ao contrário do que ocorre com memória de EI, a memória de extinção é suscetível a reconsolidação (Janine I Rossato et al., 2010). Isto sugere que a coexistência de informação conflitante (aversiva para memória de EI e não aversiva para memória de extinção) a respeito a um mesmo contexto poderia ser condição necessária para desencadear um processo reconsolidatório dependente de hipocampo. Assim, neste trabalho foram testadas as seguintes hipóteses:

- A informação prévia adquirida durante a pré-exposição não interfere na formação ou a persistência da memória de EI;
- A memória de esquia inibitória é resistente aos agentes amnésicos injetados após reativação quando não há informação prévia conflitante;
- A aquisição prévia de informação não aversiva e conflitante com a memória formada durante o treino de EI torna esta última vulnerável aos agentes amnésicos quando injetados após reativação.

4. Metodologia

4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (250-300g) com 3 meses de idade proveniente do biotério do Instituto do Cérebro - UFRN, mantidos em temperatura controladas ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro 06h00min – 18h00min. Alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*. Todos os animais foram manipulados diariamente por 5 minutos, 5 dias consecutivos antes dos testes experimentais.

4.2. Cirurgia Esterotáxica

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0 mm acima do hipocampo, seguindo as coordenadas: AP -4,2 mm, LL $\pm 3,0$ mm, DV -2,0 mm do Atlas de (Paxinos & Watson, 1986). Todo o procedimento foi realizado com animais previamente anestesiados com ketamina (75 mg/Kg) juntamente com Xilazina (10 mg/Kg), administrados intraperitonealmente (i.p). Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia, sem ter ocorrido troca entre os mesmos em cada caixa ao longo de todo o experimento.

4.3. Teste comportamental

A Esquiva Inibitória (EI) é um paradigma de condicionamento ao medo muito utilizado, no qual o estímulo condicionado é a parte segura da caixa, a plataforma, o estímulo incondicionado é um choque nas patas do animal quando o mesmo desce da plataforma e a resposta condicionada é

permanecer na área segura, resultando no aumento da latência de descida da plataforma após a exposição ao estímulo incondicionado (Bevilaqua et al., 2003; Bevilaqua & Medina, 2004). O aparato utilizado na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA consiste em uma caixa nas dimensões 50 x 25 x 25 cm (L x A x C), com uma plataforma no lado esquerdo, medindo 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm de comprimento, e barras metálicas que constituem o assoalho da caixa e podem conduzir corrente elétrica.

Durante a sessão de pré-exposição os animais foram divididos em três grupos. O primeiro, grupo controle, os animais foram somente manipulados. O segundo grupo, passou por uma pré-exposição em um contexto diferente, foram expostos ao campo aberto (Grupo CA) e o terceiro, grupo PRE, foram pré-expostos ao aparato da EI sem reforço algum. Durante a sessão de treino os animais foram colocados na plataforma, e deixados explorar livremente o aparato. No momento em que o animal colocou as quatro patas sobre a grade, recebeu um choque elétrico de 0,8 mA por 2 s. Esse treino gerou uma memória aversiva em relação ao contexto e em apenas uma sessão, os animais foram capazes de aprender a não descer da plataforma evitando o choque. Um dia após o treino os animais foram submetidos a uma sessão de reativação de MLD de EI. A duração da reativação é crucial para labilizar a memória aversiva sem iniciar um processo de extinção. Para isso, um tempo de 40 segundos foi determinado. De acordo com trabalhos prévios esse tempo parece ser incapaz de induzir um processo de extinção da resposta aversiva (Cammarota et al., 2004). Imediatamente após a reativação os animais foram submetidos ao tratamento farmacológico (AMA, ANI ou VEH). O

procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico ao empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para as sessões de treino e teste foram adotados tempos máximos de descida, sendo 30 segundos para a sessão de treino e 500 segundos para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua caixa moradia. Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 30 segundos foram excluídos do estudo. Os testes foram realizados 24h ou 14 dias após a reativação da memória.

4.4. Tratamento farmacológico

Os fármacos utilizados neste estudo foram a Anisomiscina (ANI; 160 µg/µl; Inibidor de síntese proteica), α-Amanitina (AMA; 50uM; inibidor da polimerase II do RNA eucarioto) e AP5 (5ug/ul; antagonista dos receptores NMDA. Os fármacos foram dissolvidos em DMSO ou solução salina 0,9%, armazenados e protegidos da luz, a -20°C até o momento do uso. Instantes antes da administração, uma alíquota era degelada e diluída até a concentração de trabalho com 0,1% de DMSO em salina (pH 7.2). As doses utilizadas foram determinadas baseadas em experimentos pilotos e estudos prévios mostrando o efeito de cada composto sobre o aprendizado ou desempenho comportamental. Para a realização do tratamento farmacológico utilizou-se uma microseringa Hamilton, acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Foram infundidos bilateralmente 0,5 µl/lado dos fármacos ou seu veículo (0,1% DMSO em solução salina 0,9%) a uma velocidade de 0,5 µl/min com o

auxílio de uma bomba de infusão (KDScientific). Ao término, a agulha de infusão era deixada no local por 60 segundos adicionais para evitar refluxo.

4.5. Controle histológico

A verificação do posicionamento anatômico das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam a infusão de 1 μ l de uma solução de azul de metileno 0,1% através das mesmas cânulas utilizadas para aplicação das drogas. Quinze minutos depois da infusão, os animais foram sacrificados por decapitação, seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias. Posteriormente, procedeu-se a análise histológica. Somente animais com a localização correta das cânulas foram considerados na análise estatística dos dados.

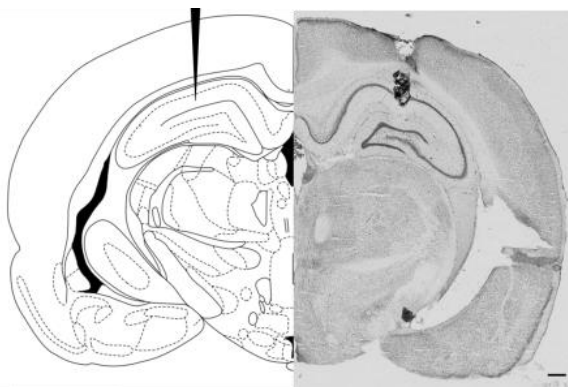


Figura 1 – A imagem mostra uma coloração de Nissil de uma seção coronal do cérebro de rato revelando a localização da infusão da cânula na região CA1 do hipocampo dorsal. Barra de escala 500 μ m.

4.6. Análise estatística

Os dados foram expressos em mediana \pm intervalos interquartis e cada valor refletiu uma média de 8 a 10 animais por grupo. A significância estatística foi determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's de múltiplas comparações. Diferenças foram consideradas significantivas quando $p < 0,05$.

5. Resultados

Ao contrário do que acontece com a memória de esquiva inibitória (EI), a expressão da memória associada à extinção na tarefa de EI inicia um processo reconsolidatório (Rossato et al., 2010; Radiske et al., 2015). Isto permite supor que a consolidação prévia de informação conflitante com aquela adquirida durante uma experiência aversiva é uma condição necessária para a ocorrência de reconsolidação. Para testar essa hipótese realizamos os seguintes experimentos:

Primeiramente, estudamos se o aprendizado não aversivo prévio é capaz de influenciar na força da memória adquirida durante o treino em EI. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em três grupos experimentais. Os animais do primeiro grupo (Grupo Controle) foram apenas manipulados durante 5 dias (5 min/dia). O segundo grupo (Grupo CA) foi submetido a uma sessão diária de exploração a um campo aberto durante 5 dias (5 min/dia). Já o terceiro grupo (Grupo PRE) foi submetido durante 5 dias a uma sessão diária de exposição à caixa de treino em EI (5 min/dia). Durante as sessões de pré-exposição os animais puderam explorar livremente a caixa de EI (Figura 2).

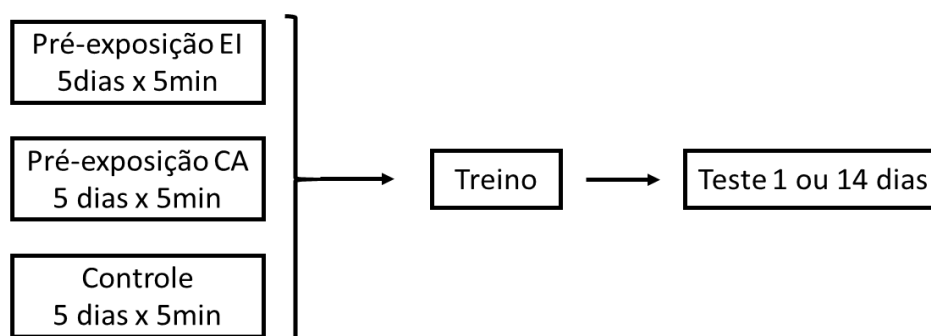


Figura 2 – Esquema do delineamento experimental

Vinte e quatro horas após a última sessão de cada procedimento específico, os animais foram treinados na tarefa de EI e a retenção da MLD associada a esta tarefa foi aferida um ou quatorze dias depois. Nem exploração prévia de um campo aberto nem a pré-exposição à caixa de treino de EI influenciam a formação ou a duração da memória de EI (Figura 4).

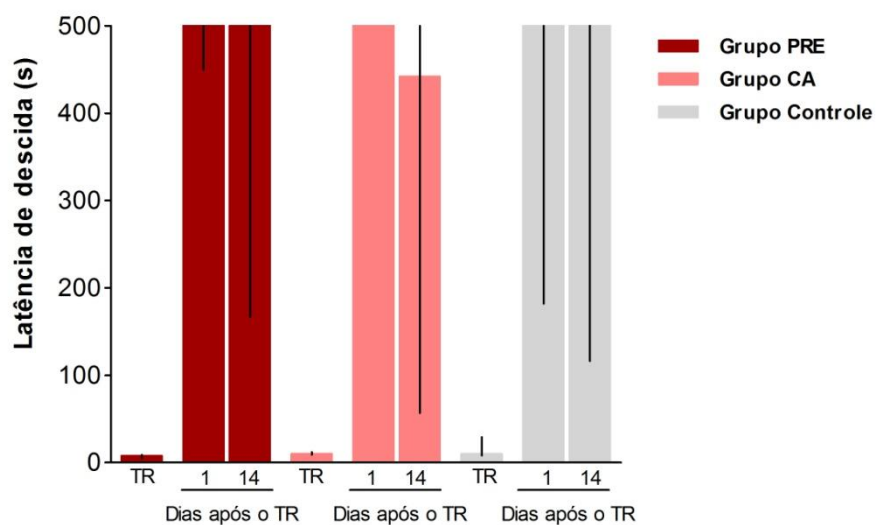


Figura 3. A exploração prévia de um campo aberto ou pré-exposição na caixa de treino de EI não influenciam a formação ou a persistência da memória de EI. Ratos Wistar foram submetidos a uma sessão de pré-exposição durante 5 dias na EI por 5 minutos. Um dia após a última sessão de pré-exposição os animais foram treinados e 24 hs ou 14 dias após foi avaliada a retenção da memória. As barras representam a mediana \pm intervalo interquartil de latência de descida.

A análise das sessões de pré-exposição no aparato de EI mostra que a latência de descida da plataforma diminui gradativamente durante 5 dias (Figura 5A). Isso se reflete na sessão de treinamento, onde a latência de

descida dos animais do Grupo PRE é significativamente menor comparado com o Grupo Controle e Grupo CA (Figura 5B).

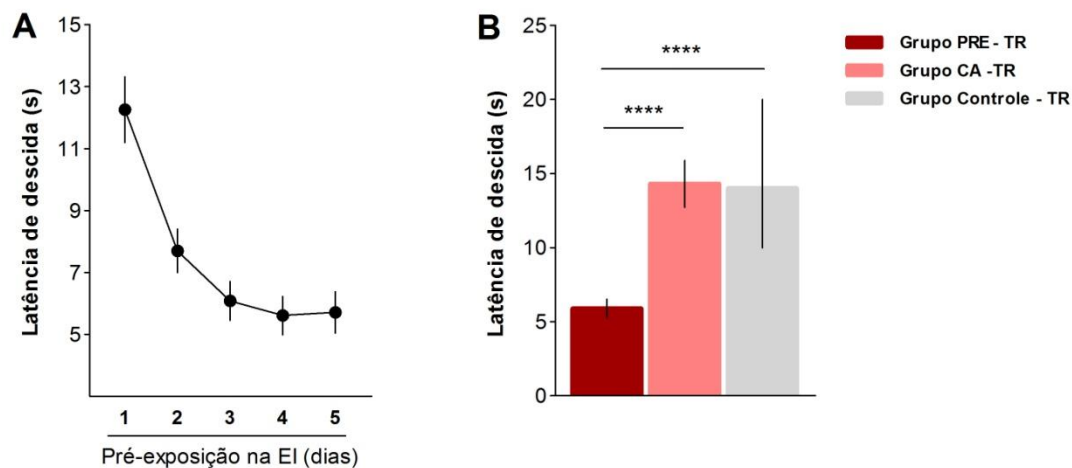


Figura 4. A) A latência de descida da plataforma diminui gradativamente durante as sessões de pré-exposição na caixa de treino de EI. B) No dia do treino na tarefa de EI, a latência de descida da plataforma é menor nos animais do Grupo PRE, comparada com os Grupos Controle e CA. 4A) Ratos Wistar foram submetidos a uma sessão de pré-exposição durante 5 dias na EI por 5 minutos e o tempo de latência de descida da plataforma foi avaliada. 4B) Um dia após a última sessão de pré-exposição os animais foram treinados e novamente medido o tempo de latência de descida. As barras representam a mediana \pm intervalo interquartil de latência de descida. **** $p < 0,001$ vs. Grupo PRE-TR (Teste de Kruskal-Wallis seguido de multiplas comparações).

Em seguida, estudamos o efeito da pré-exposição na possibilidade da ocorrência de reconsolidação da memória de EI. Para tanto, replicamos o procedimento descrito anteriormente (Grupo Controle, Grupo CA e Grupo PRE) e, 24 horas após o treino, os animais foram submetidos a uma

sessão de reativação e imediatamente após receberam infusões de Salina (VEH), AMA (50 μ M) ou ANI (160 μ g/ μ l) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção foi avaliada 1 ou 14 dias mais tarde (Figura 6).

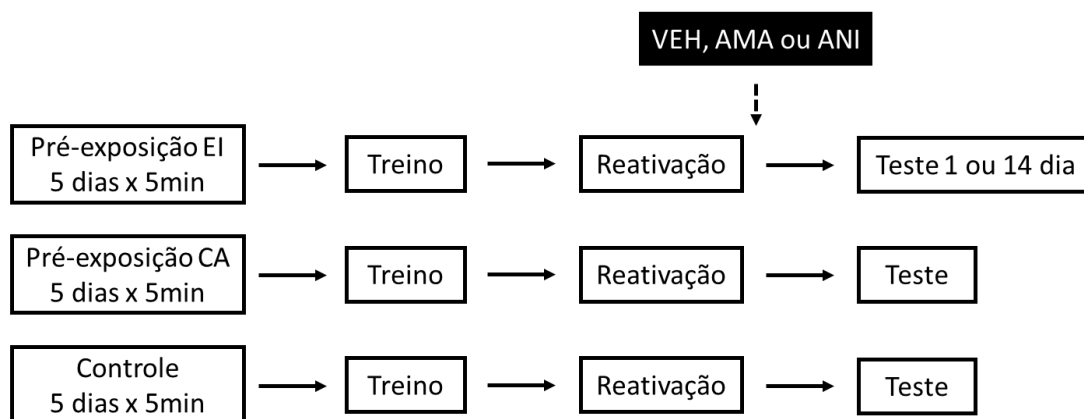


Figura 5 – Esquema do delineamento experimental

A infusão de AMA ou ANI imediatamente após a sessão de reativação não afetou a retenção da memória dos animais do Grupo Controle e do Grupo CA (Figura 7A e 7B) avaliada 24 h após a reativação. Estes tratamentos farmacológicos tiveram um efeito amnésico que se manteve até 14 dias após a reativação no Grupo PRE (Figura 7C e 7D).

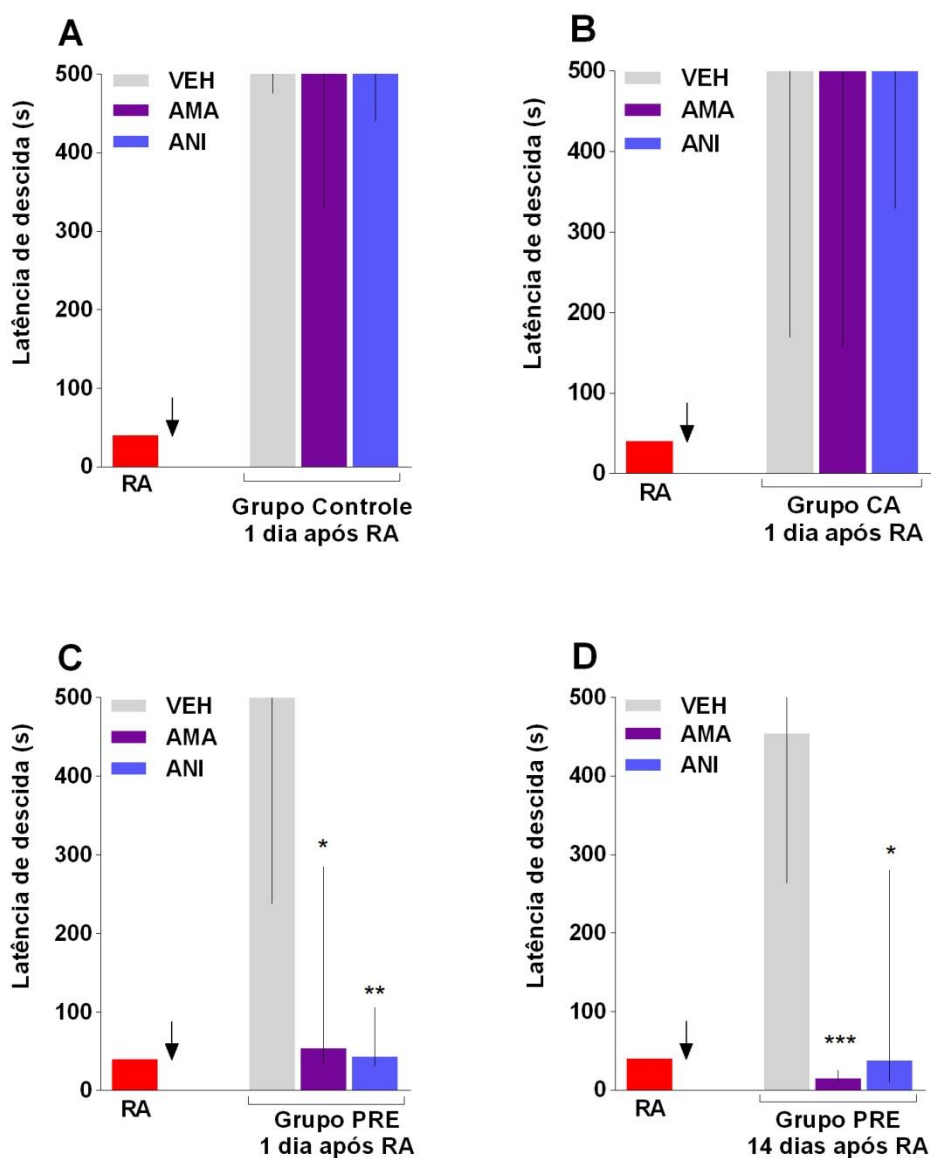


Figura 6. A inibição da expressão gênica ou da síntese proteica no hipocampo dorsal imediatamente após a sessão de reativação afeta a retenção da memória de EI dos animais que foram submetidos a um aprendizado prévio não aversivo em EI (Grupo PRE). 6A) Ratos Wistar foram submetidos a uma sessão diária de manipulação durante 5 dias por 5 min. Um dia após a última sessão de manipulação os animais foram treinados e 24 hs após foram submetidos a uma sessão de reativação. Imediatamente após essa sessão os animais receberam infusões na região CA1 do hipocampo dorsal de VEH, AMA ou ANI e 24 hs ou 14

dias após foram testados. 6B) Ratos Wistar foram submetidos a uma sessão diária de pré-exposição a caixa de campo aberto durante 5 dias por 5 min. Um dia após a última sessão de pré-exposição os animais foram treinados e 24 hs após foram submetidos a uma sessão de reativação. Imediatamente após essa sessão os animais receberam infusões na região CA1 do hipocampo dorsal de VEH, AMA ou ANI e 24 h ou 14 dias após foram testados. 6C) Ratos Wistar foram submetidos a uma sessão diária de pré-exposição na EI durante 5 dias por 5 min. Um dia após a última sessão de pré-exposição os animais foram treinados e 24 hs após foram submetidos a uma sessão de reativação. Imediatamente após essa sessão os animais receberam infusões na região CA1 do hipocampo dorsal de VEH, AMA ou ANI e 24 h após foram testados. 6D) Ratos Wistar foram submetidos a uma sessão diária de pré-exposição na EI durante 5 dias por 5 min. Um dia após a última sessão de pré-exposição os animais foram treinados e 24 hs após foram submetidos a uma sessão de reativação. Imediatamente após essa sessão os animais receberam infusões na região CA1 do hipocampo dorsal de VEH, AMA ou ANI e 14 dias após foram testados. As barras representam a mediana \pm intervalo interquartil de latência de descida.* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Grupo VEH (Teste de Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações).

Finalmente, estudamos se o bloqueio da formação da memória prévia não aversiva conflitante com aquela adquirida durante o treino em EI impede o bloqueio da reconsolidação causado pela infusão de AMA e ANI. Imediatamente após cada sessão de pré-exposição, os animais receberam infusões bilaterais de VEH ou Ácido 2-amino-5-fosfonovaleriânico (AP5; 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$;) na região CA1 do hipocampo dorsal. Um dia após a última sessão

de pré-exposição, os animais foram treinados na tarefa de EI e 24 h após, submetidos a uma sessão de reativação (Figura 8).

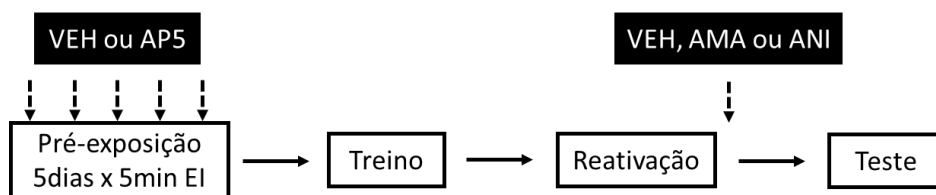


Figura 7 – Esquema do delineamento experimental

A infusão de AMA ou ANI imediatamente após a reativação da memória de EI, não afetou a retenção da memória nos animais que receberam AP5 (Figura 9).

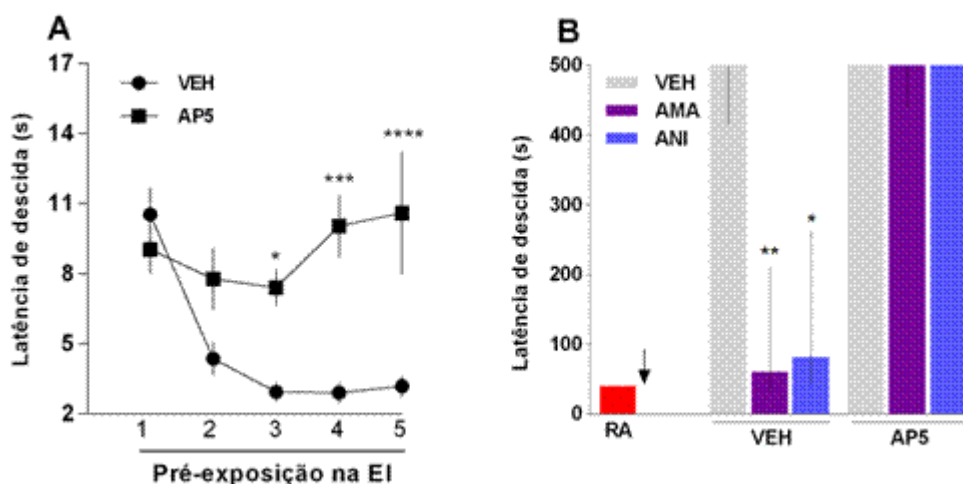


Figura 8. O bloqueio da formação da memória prévia não aversiva conflitante com aquela adquirida durante o treino em EI impede o bloqueio da reconsolidação causado pela infusão de AMA. 8A) Ratos Wistar foram submetidos a 1 sessão de habituação durante 5 dias na EI por 5 minutos. Imediatamente após cada sessão de habituação, os animais receberam na região CA1 do hipocampo dorsal infusões bilaterais de VEH ou do antagonista dos receptores NMDA (AP5). * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$ vs. latência de descida no dia 1 (Teste de

Kruskal-Wallis seguido de múltiplas comparações) 8B) Um dia após a última sessão de habituação os animais foram treinados e 24 hs após foram submetidos a uma sessão de reativação. Imediatamente após essa sessão os animais receberam infusões na região CA1 do hipocampo dorsal de VEH, AMA ou ANI 24 hs e 14 dias após foram testados. As barras representam a mediana \pm intervalo interquartil de latência de descida.* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Grupo VEH (Teste de Kruskal-Wallis seguido de multiplas comparações).

6. Discussão

Sabe-se que, ao contrário do que acontece com a memória de EI, a memória de extinção é suscetível à ocorrência de um processo reconsolidatório (Rossato et al., 2010). No primeiro caso o animal demonstra apenas a informação aversiva, enquanto que no segundo caso existem dois tipos de informações, a aversiva dada pelo treino em EI e não aversiva dada pela extinção. Isso sugere que a existência de duas memórias conflitantes seria uma condição necessária para desencadear a reconsolidação. Hipotetizamos então, que a existência de informação prévia não aversiva conflitante com a memória de EI no momento da reativação permitiria uma condição na qual a memória de EI se torne lábil e suscetível aos agentes bloqueadores da reconsolidação.

Os resultados descritos anteriormente sugerem que, durante a sessão de pré-exposição na caixa de EI, os animais aprendem que é seguro descer da plataforma (Figura 5A e 5B). A consolidação prévia desta informação conflitante com a memória aversiva adquirida no treino de EI é fundamental para a desestabilização da MLD após a reativação. Essa desestabilização é suscetível aos agentes bloqueadores de síntese de proteínas e expressão gênica quando testados 24hs ou 14 dias após a reativação (Figura 7C e 7D).

Contudo, não se pode rejeitar a hipótese de que a pré-exposição à caixa de treinamento pode impedir parcialmente, ou retardar, o subsequente processamento da memória de EI, e, portanto, a amnésia observada poderia ser devido à interferência na consolidação incompleta dessa

memória previamente formada ou pela reativação da memória de EI enfraquecida. No entanto, é improvável que tais efeitos possam ser os responsáveis dos nossos resultados. Em outros trabalhos foi mostrado que, em alguns casos, a pré-exposição ao contexto do treino pode aumentar a força da memória ao invés de diminuí-la (Fanselow, 1990; Pisano et al., 2012), podendo torná-la mais forte e resistente à reconsolidação (Suzuki, 2004; Wang et al., 2009). Nós encontramos que a pré-exposição à caixa de treino não altera a força ou a persistência da MLD na EI (Figura 4), confirmando resultados anteriores que mostraram que nem a intensidade nem a amplitude do estímulo não condicionado da resposta aprendida no momento do treino afeta a probabilidade de reconsolidação memória EI (Bevilaqua & Medina, 2004). Como o conhecimento não aversivo prévio facilita a reconsolidação da MLD de EI se não está alterando a força do traço aversivo? As evidências indicam que a labilização da memória não ocorre quando o resultado da reativação é facilmente previsível (Sevenster et al., 2013). Durante o teste na EI, os animais aprendem a evitar um ambiente no qual receberam um choque. Se a única experiência que tiveram na caixa de treino de EI foi reforçada negativamente, então, quando os animais são re-expostos a esse ambiente, tendem a permanecer na zona segura e inibir o seu comportamento exploratório natural, esperando não receber um estímulo aversivo. Em tal situação, a ausência de choque é o resultado totalmente previsível da reativação da memória e, portanto, não desencadeará a reconsolidação. A pré-exposição à caixa de treinamento na ausência do choque gera um traço de memória que é claramente contrária àquela que

se formou durante o treino de EI e, conseqüentemente, durante a sessão de reativação dois traços opostos competem. Portanto, quando o resultado da reativação já não pode ser facilmente previsto, o traço mnemônico se torna vulnerável a labilização, embora o comportamento seja determinado pela memória de evitamento. Uma previsão testável desta hipótese é que, uma vez consolidada e no controle do comportamento, a memória de extinção de EI também deve ser suscetível a reconsolidação (Rossato et al., 2010).

O aprendizado prévio conflitante é um facilitador específico para a ocorrência de reconsolidação da MLD na EI? Não podemos responder a essa pergunta de forma conclusiva, mas é digno de nota que a maioria, se não todas, as pesquisas significativas sobre reconsolidação de memória envolvem algum tipo de pré-exposição ao aparelho de treinamento. De fato, a exposição prévia ao ambiente de treinamento é um procedimento padrão para os diferentes experimentos que abordam o estudo da reconsolidação, dentre eles, condicionamento de medo auditivo e contextual, treinamento de reconhecimento de objetos, aversão ao gosto condicionado, incluindo condicionamentos em peixes medaka (Eisenberg & Dudai, 2004), a sensibilização a longo prazo do reflexo de retirada do sifão na *Aplysia californica* (Cai et al., 2012) e treinamento de sinal-contexto no caranguejo *Chasmagnathus* (Pedreira et al., 2002). Em nossos experimentos injetamos um antagonista de receptor NMDA imediatamente após as sessões de pré-exposição. Dessa maneira impedimos a formação da memória relacionada ao contexto de EI. Foi possível perceber que para ocorrer um processo reconsolidatório é necessária a formação de uma

memória prévia conflitante com aquela adquirida durante o treino em EI (Figura 9). Durante estas sessões de pré-exposição, os animais certamente adquirem e consolidam informação que entra em confronto com a apresentada no treinamento. Portanto, é provável que estes resultados revelem uma condição limitante universal até então negligenciada.

7. Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que a consolidação prévia de informação adquirida durante a pré-exposição não interfere na formação ou na persistência da memória de EI e, além disso, a torna vulnerável aos agentes amnésicos quando injetados após reativação. Portanto, parece haver a necessidade de uma condição limitante, nesse caso, uma informação prévia conflitante, para que a memória de EI seja passível de sofrer reconsolidação.

A partir desses dados, mais estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos são necessários para compreender a influência de um aprendizado prévio sobre a modificação de um traço mnemônico após sua reativação.

A tarefa de esquiva inibitória é um modelo amplamente utilizado para o estudo de estresse pós-traumático e fobias associadas ao medo. Dada a importância terapêutica que a modulação do processo de reconsolidação poderia ter no tratamento de transtornos de ansiedade, este assunto certamente tem uma relevância clínica para futuras aplicações.

8. Referências

- Alberini, C. M. (2011). The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5(March), 1-12.
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Washington, DC: Author.
- Bevilaqua, L. R. M., & Medina, J. H. (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning & Memory*, 11(5), 572–578.
- Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2003). Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behavioural Pharmacology*, 14(8), 649–652.
- Biedenkapp, J. C., & Rudy, J. W. (2004). Context memories and reactivation: constraints on the reconsolidation hypothesis. *Behavioral Neuroscience*, 118(5), 956–964.
- Cai, D., Pearce, K., Chen, S., & Glanzman, D. L. (2012). Reconsolidation of long-term memory in aplysia. *Current Biology*, 22(19), 1783–1788.
- Cammarota, M., Barros, D. M., Vianna, M. R. M., Bevilaqua, L. R. M., Coitinho, A., Szapiro, G., Izquierdo, I. (2004). The transition from memory retrieval to extinction. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 76(3), 573–582.

- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R. M., Barros, D. M., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Retrieval and the extinction of memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *25*(3-4), 465–474.
- de Oliveira Alvares, L., Pasqualini Genro, B., Diehl, F., Molina, V. A., & Quillfeldt, J. A. (2008). Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience*, *154*(4), 1648–1655.
- Duvarci, S., & Nader, K. (2004). Characterization of Fear Memory Reconsolidation. *The Journal of Neuroscience*, *24*(42), 9269–9275.
- Eisenberg, M. (2010). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*, *1102*(2003), 1102–1104.
- Eisenberg, M., & Dudai, Y. (2004). Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in medaka: Old fears don't die. *European Journal of Neuroscience*, *20*(12), 3397–3403.
- Fanselow, M. S. (1990). Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning & Behavior*, *18*(3), 264–270.
- Frankland, P. W., Ding, H., Takahashi, E., Suzuki, A., Kida, S., & Silva, A. J. (2006). Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *13*(4), 451–457.
- Gamache, K., Pitman, R. K., & Nader, K. (2012). Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*:

Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 37(13), 2789–2796.

Giachero, M., Bustos, S. G., Calfa, G., & Molina, V. A. (2013). A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *20(5)*, 245–255.

Gonzalez, M. C., Kramar, C. P., Tomaiuolo, M., Katche, C., Weisstaub, N., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2014). Medial prefrontal cortex dopamine controls the persistent storage of aversive memories. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8(November)*, 408.

Lee, J. L. C., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26(39)*, 10051–10056.

Mactutus, C. F., Riccio, D. C., & Ferek, J. M. (1979). Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science*, *204(4399)*, 1319–1320.

Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, *36(3)*, 521–525.

Misanin, J. R., Miller, R. R., & Lewis, D. J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a

consolidated memory trace. *Science (New York, N.Y.)*, 160(3827), 554–555.

Morris, R. G. M., Inglis, J., Ainge, J. A., Olverman, H. J., Tulloch, J., Dudai, Y., & Kelly, P. A. T. (2006). Memory Reconsolidation: Sensitivity of Spatial Memory to Inhibition of Protein Synthesis in Dorsal Hippocampus during Encoding and Retrieval. *Neuron*, 50(3), 479–489.

Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000a). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726.

Nader, K., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000b). The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1(3), 216–219.

Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The Rat Brain. The Rat Brain*. Elsevier.

Pavlov, I. P. *Conditioned Reflexes*. New York: Liveright; 1927

Pedreira, M. E. (2004). Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 579–585.

Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38(6), 863–869.

Pedreira, M. E., Pérez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab

Chasmagnathus: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(18), 8305–8311.

Pisano, M. V., Ferreras, S., Krapacher, F. A., Paglini, G., & Arias, C. (2012). Re-examining the ontogeny of the context preexposure facilitation effect in the rat through multiple dependent variables. *Behavioural Brain Research*, 233(1), 176–190.

Pitman, R. K. (2011). Will reconsolidation blockade offer a novel treatment for posttraumatic stress disorder? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5(March), 11.

Radiske, A., Rossato, J. I., Kohler, C. A., Gonzalez, M. C., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2015). Requirement for BDNF in the Reconsolidation of Fear Extinction. *The Journal of Neuroscience*, 35(16), 6570–6574.

Rodriguez-Ortiz, C. J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R., & Bermudez-Rattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 12(5), 533–537.

Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2010). Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21801–21805.

- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem*, 13(4), 431–440.
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2013). Prediction Error Governs Pharmacologically Induced Amnesia for Learned Fear. *Science*, 339(6121), 830–834.
- Suzuki, A. (2004). Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795.
- Tronson, N. C., Wiseman, S. L., Olausson, P., & Taylor, J. R. (2006). Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci*, 9(2), 167–169.
- Tronson, N C & Taylor, J R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(4), 262–275.
- Tulving, E., Voi, M. E. L., Routh, D. A., & Loftus, E. (1983). Ecphoric Processes in Episodic Memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 302(1110), 361–371.
- Wang, S.-H., de Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature Neuroscience*, 12(7), 905–912.