

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

**PLASTICIDADE DE RECEPTORES COLINÉRGICOS MUSCARÍNICOS M4
HIPOCAMPAIS DECORRENTE DE UMA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA
COMO POSSÍVEL MARCADOR SINÁPTICO DO ENGRAMA: ENSAIOS
FARMACOLÓGICO-COMPORTAMENTAIS**

Autor:

Felipe Diehl

Orientador:

Prof. Dr Jorge Alberto Quillfeldt

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências da UFRGS como
pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Porto Alegre, julho de 2010

Agradeço ao prof. Jorge Alberto Quillfeldt pela sábia orientação, sempre com amizade.

Agradeço a colaboração dos inúmeros amigos e colegas de laboratório que tive o privilégio de conhecer durante estes 10 anos de LPBNC.

Agradeço à Zelma Regina de Almeida por toda a ajuda no laboratório, é uma grande amiga.

Agradeço aos meus pais, e a minha irmã Luisa (colega de neurociências) eles sempre incentivaram os meus estudos.

Agradeço a minha querida Aline, amor da minha vida!

Agradeço à CAPES pela bolsa de Doutorado.

Agradeço à UFRGS, que continue pública e de qualidade.

Agradeço aos professores do programa de Pós-graduação em Neurociências, foram importantes os conhecimentos adquiridos.

Dedico esta Tese em memória de meu avô
Paulo Alberto Röehrig, o maior exemplo da
minha vida.

Índice

Introdução	8
Tipos de memórias	9
O traço de memória (engrama)	11
Estruturas encefálicas envolvidas com a memória	12
Fases da memória	16
Mecanismos de consolidação da memória	18
Mecanismos de evocação e reconsolidação da memória	23
O sistema colinérgico muscarínico e a memória	26
Justificativa de trabalho	35
Objetivos gerais	36
Objetivos específicos	37
Material e Métodos	39
Animais utilizados	39
Procedimento cirúrgico	39
Verificação do posicionamento das cânulas	43
Tratamentos farmacológicos	44
Testes comportamentais	46
Esquiva Inibitória (EI)	46
Condicionamento aversivo contextual (CAC)	48
Análise estatística	50
Resultados	51
Resultados referentes ao objetivo geral 1	51
MT3 e escopolamina intra-hipocampal pós-treino de CAC	51
MT3 e escopolamina intra-hipocampal pré-teste de CAC	52
MT3 e escopolamina intra-hipocampal pós-reativ. (3 min.) de CAC	53
MT3 e escopolamina intra-hipocampal pós-reativ. (25 min.) de CAC	54
MT3 e escopolamina intra-hipocampal pré-teste 24 h após uma reativ.	55
MT3 e escopolamina intra-hipocampal sem reativação de CAC	56
Resultados referentes ao objetivo geral 2	57
MT3 e escopolamina intra-amígdala pós-treino de CAC	57
MT3 e escopolamina intra-amígdala pós-reativação (3 min.) de CAC	58

MT3 e escopolamina intra-amígdala sem reativação de CAC	59
Resultados referentes ao objetivo geral 3	60
MT3 intra-hipocampal imediatamente pós-treino de EI	60
MT3 intra-hipocampal 45 minutos pós-treino de EI	62
MT3 intra-hipocampal 90 minutos pós-treino de EI	63
MT3 intra-hipocampal 180 minutos pós-treino de EI	64
MT3 intra-hipocampal 360 minutos pós-treino de EI	65
Escopolamina intra-hipocampal imediatamente pós-treino de EI	66
Escopolamina intra-hipocampal 90 minutos pós-treino de EI	67
Escopolamina intra-hipocampal 180 minutos pós-treino de EI	68
Resultados referentes ao objetivo geral 4	69
DRB intra-hipocampal pós-treino de EI	69
DRB pós-treino e MT3 pré-teste de EI intra-hipocampais	70
Discussão	71
Conclusões	85
Referências bibliográficas	89

Anexos I:

Diehl F, Oliveira LF, Sánchez G, Camboim C, De Oliveira Alvares L, Lanziotti VB, Cerveñansky C, Kornisiuk E, Jerusalinky D, Quillfeldt JA. (2007). Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. *Behav Brain Res* 177: 227–231.

Anexo II:

Diehl F, Haubrich J, Engelke DS, de Freitas Cassini L, de Oliveira Álvares L, Shaeffer-Teixeira R, Cerveñansky C, Kornisiuk E, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Differential role of the hippocampal muscarinic M4 receptors in the consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction of aversive memories. Submetido ao periódico *Learning and Memory*.

Siglas e Abreviaturas

ACo – acetilcolina
ADN – ácido desoxirribonucléico
AMPc – adenosina monofosfato cíclico
AP – coordenada estereotáxica antero-posterior
ARN – ácido ribonucléico
ARNm – ácido ribonucléico mensageiro
BDNF – neurotrofina “brain-derived neurotrophic factor”
CA1, CA3 – regiões do hipocampo Corno de Amon 1 e 3
CAC – condicionamento aversivo contextual
CAMKII – cálcio calmodulina cinase II
DLD – depressão de longa duração
DMSO – dimetilsulfóxido
DRB – 5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosil-benzimidazol
DV – coordenada estereotáxica dorso-ventral
EI – esquiva inibitória
Escopo – escopolamina
GD – região do hipocampo giro denteado
GMPc – guanosina monofosfato cíclico
IP3 – inositol trifosfato
LL – coordenada estereotáxica látero-lateral
M1, M2, M3, M4, M5 – receptores muscarínicos (1-5)
MAPK – “Mitogen-activated protein (MAP) kinases”
MCD – memória de curta duração
MLD – memória de longa duração
MT1, MT2, MT3, MT7 – toxinas muscarínicas (1, 2, 3 e 7)
NMDA – N-metil-d-aspartato
PKA – proteína cinase dependente de AMPc
PKC – proteína cinase dependente de cálcio
PKG – proteína cinase dependente de GMPc
PKMζ – proteína cinase M zeta
PLD – potenciação de longa duração
TFS – “tampão fosfato salino” (solução salina tamponada com fosfato)
TR – treino
TT – teste

Resumo

O sistema colinérgico muscarínico desempenha uma função central na memória, mas o papel de cada subtipo de receptor é pouco compreendido separadamente. As toxinas muscarínica (MTs) extraídas da peçonha das serpentes *Dendroaspis sp* são ferramentas farmacológicas seletivas aos diferentes subtipos de receptores muscarínicos. O subsistema M4 muscarínico modula os processos de consolidação e evocação. Recentemente, tem se dado atenção aos processos subsequentes à evocação e vários trabalhos demonstraram que a reconsolidação e a extinção da memória compreendem etapas importantes na formação do processo. O objetivo desse trabalho é investigar o envolvimento do subsistema M4 colinérgico muscarínico hipocampal na consolidação, evocação, reconsolidação e extinção da memória, além de investigar os receptores M4 da amígdala basolateral na consolidação e reconsolidação. Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que os receptores M4 mudavam seu papel modulatório entre a consolidação e evocação, portanto, neste trabalho investigamos, também, em que momento do processo de consolidação ocorre essa mudança e se essa alteração é dependente de transcrição gênica. A toxina MT3, antagonista seletiva ao receptor M4, e a escopolamina, antagonista inespecífico, foram as ferramentas farmacológicas utilizadas e seus efeitos foram estudados na tarefa de condicionamento aversivo contextual (CAC) e esquiva inibitória (EI). Quando infundidos no hipocampo antes do treino CAC, ambos os fármacos foram amnésicos sobre a consolidação, entretanto, somente MT3 foi efetiva quando infundida antes do teste, sendo o efeito oposto, facilitatório. Além disso, somente a MT3 intra-hipocampal foi facilitatória sobre a reconsolidação e bloqueou a extinção da tarefa de CAC. Infundidas na amígdala basolateral os antagonistas foram amnésicos sobre a consolidação e a reconsolidação de CAC. Os experimentos com a esquiva inibitória demonstraram que a MT3 intra-hipocampal é amnésica somente quando infundida imediatamente após o treino. Porém, modifica seu efeito quando administrada 90 e 180 minutos após o treino, passando a ser facilitatória. A administração de um inibidor de transcrição gênica (DRB) imediatamente após o treino de EI reverte o efeito facilitatório da MT3 pré-teste. Os resultados sugerem uma modulação positiva do sistema colinérgico muscarínico hipocampal durante a consolidação e a extinção da memória de CAC, porém, uma ação contrária é observada durante a evocação e reconsolidação. Os resultados em conjunto sugerem que os receptores M4 hipocampais sofram alterações plásticas durante o processo de consolidação passando a controlar negativamente a atividade excitatória dos neurônios glutamatérgicos, fenômeno que parece não ocorrer na amígdala basolateral.

Abstract

The cholinergic muscarinic system plays a central role in learning and memory, yet little is known about the specific roles of each receptor subtype. Muscarinic toxins (MTs) from *Dendroaspis* snakes venom are selective for muscarinic receptor subtypes. The hippocampus M4 subsystem, for instance, was shown to take part in the modulation of memory consolidation and retrieval. The memory phenomenon, by its turn, is being recently unveiled as a much more complex set of processes than previously thought, encompassing post-retrieval situations such as reconsolidation and extinction, each with its particular mechanisms. The scope of this study is to explore the involvement of the hippocampal cholinergic M4 muscarinic subsystem on the consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction of memories, moreover to investigate the role of M4 subsystem of basolateral amygdala on the consolidation and reconsolidation. Last works shown a different modulatory role of hippocampal M4 receptors about consolidation and retrieval processes, therefore This work aims to investigate the muscarinic cholinergic modulation at hippocampal circuits by M4 receptors, along different periods of memory consolidation for an inhibitory avoidance task, and verify if the change effect of pre-test MT3 are dependent of mRNA synthesis. MT3, a very selective M4 antagonist, and the less selective antagonist scopolamine were infused bilaterally into the rat CA1 area, and their effects studied in a contextual fear conditioning task (CFC) and inhibitory avoidance task (IA). When infused immediately after training, both treatments caused disruption of the memory consolidation, however, only MT3 was effective when infused before the test session, and the effect, was the opposite, i.e., memory facilitation. Moreover, only MT3 enhanced the reconsolidation of CFC following its infusion into the hippocampus or blocked its extinction. Infused into the basolateral amygdala, muscarinic antagonists shown an amnesic effect about the consolidation and reconsolidation of CFC memory. In the IA experiments, MT3 infused immediately after training was amnesic upon the consolidation process, while an “opposite effect” –memory facilitation– was observed in the 90-180min time window. The DRB was amnesic too upon the consolidation, showing that the transcriptional process is essential to the memory. Moreover, the DRB reverted the facilitatory effect of pre-test MT3. These results suggest an endogenous positive modulation of the cholinergic muscarinic system present during the consolidation or the extinction of an aversive memory, but an opposite action during memory retrieval or memory reconsolidation. Moreover, these results suggest that M4 receptors are likely expressed at different hippocampal localizations where they underlie different processes and plasticity events, may be over expressed upon glutamatergic excitatory cells.

INTRODUÇÃO

O aprendizado é o processo de aquisição de informações provenientes tanto do ambiente quanto de representações introspectivas deste, enquanto memória é a capacidade de reter essas informações. A memória pode ser considerada o fator biológico que mais caracteriza um indivíduo como uma entidade particular, diferente de todos os outros seres vivos (inclusive entre aqueles que apresentam ADNs idênticos). Nos seres humanos, em particular, a história de uma pessoa, a coleção pessoal de lembranças, juntamente com as características comportamentais genéticas, forma o arcabouço essencial para a construção de uma personalidade.

Durante a evolução da vida na Terra, o surgimento da capacidade de aprender e formar novas memórias permitiu que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver novos problemas, deste modo tornando os organismos mais adaptáveis a um ambiente sempre em modificação. A capacidade de formar memórias é uma característica filogeneticamente antiga e conservada na escalada zoológica, uma vez que é observada desde os invertebrados.

A memória está relacionada a uma função do Sistema Nervoso Central, onde o encéfalo está constantemente criando e evocando memórias, sendo que a memória não é apenas a capacidade de repetir, mas sim de variar a resposta frente a uma nova aprendizagem. A aprendizagem transforma as experiências em memórias e é o processo pelo qual humanos e outros animais captam conhecimentos (Kandel et al., 2000).

As memórias podem ser consideradas como uma interpretação do mundo, pois nas memórias de um indivíduo existe a exclusão de fatos triviais ou pouco significantes, assim como pode ocorrer à incorporação de informações irreais. Portanto, existe um

processo de tradução entre a realidade das experiências e a formação da respectiva memória. Nos processos de tradução, são utilizadas complexas redes de neurônios e os códigos e os processos utilizados não são idênticos à realidade da qual extraem as informações. Durante a consolidação das memórias, estas células convertem a realidade em um complexo código de sinais elétricos e bioquímicos. Na evocação, ao trazer de volta essa informação ao meio, os neurônios reconvertem sinais bioquímicos ou estruturais em elétricos, de maneira que novamente os sentidos e a consciência possam interpretá-los como pertencendo ao mundo real (Izquierdo, 2002).

A memória só pode ser medida em animais com a observação de comportamentos modificados durante a evocação (Quillfeldt, 1994), por exemplo: quando um animal adquire a capacidade de suprimir uma resposta inata como a de explorar um ambiente novo, ou passa a apresentar comportamentos “artificiais” como aprender a pressionar uma alavanca para conseguir uma recompensa. Já nos seres humanos, alguns tipos de memórias podem ser verbalmente declaradas. O aprendizado pode ser mensurado observando a mudança de desempenho numa tarefa através do treinamento repetitivo, o que pode ser observado nas suas “curvas de aprendizado” (Kandel et al., 2000).

Tipos de Memórias:

O melhor entendimento teórico e experimental do complexo conceito de memória nos leva a adotar a uma classificação por diferentes critérios, como, por exemplo, de acordo com o tempo que duram e com o seu conteúdo.

Segundo o critério temporal, as memórias são classificadas de acordo com o tempo que permanecem disponíveis para a evocação após a aquisição. Conceitua-se uma memória de longa duração (MLD), se uma memória pode ser evocada dias, semanas ou anos após formada. Entretanto, se ela puder ser evocada apenas por um curto período (algumas horas) após a aquisição, é chamada memória de curta duração (MCD) (Izquierdo et al., 1998; McGaugh, 1966, 2000).

Um dos maiores questionamentos levantados no estudo do funcionamento da memória é se a MCD é um passo necessário para o estabelecimento da MLD, ou uma forma separada de memória. Uma forma possível de responder a esta questão foi a de demonstrar o bloqueio MCD sem alterar a formação de uma MLD para uma mesma tarefa no mesmo animal (Izquierdo et al., 1998). Nestes trabalhos, agonistas e antagonistas seletivos de vários receptores e de proteínas cinases foram administrados no hipocampo, córtex entorrinal, córtex parietal posterior seletivamente afetaram a MCD sem causar qualquer alteração na formação da MLD. Em conclusão a esses trabalhos, parece que MCD e MLD operam através de mecanismos separados, porém simultâneos. Entretanto, muitos mecanismos moleculares parecem ser necessários tanto para a formação de uma MCD quanto de uma MLD (Izquierdo et al., 1998).

Quanto ao conteúdo, podemos classificar memórias em explícitas (declarativas), ou implícitas (procedurais). As memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos são chamadas de explícitas ou declarativas. Entre elas, aquelas que registram fatos são denominadas de memórias episódicas, e as de conhecimentos gerais, são as memórias semânticas. Essas memórias são facilmente trazidas à consciência e podem ser facilmente transmitidas de forma verbal (em humanos) (Squire, 1992).

Denominam-se memórias procedurais ou implícitas as memórias de capacidades motoras ou sensoriais, também chamados de hábitos. As memórias de procedimentos

são adquiridas de maneira inconsciente e não são fáceis de descrever (é mais fácil de demonstrá-las). Por exemplo, são as memórias de como andar de bicicleta, dirigir um carro, nadar, ou conhecer as regras gramaticais de um determinado idioma (Setlow, Roozendaal e McGaugh, 2000; Ungerleider et al., 2002).

Os diversos tipos de memórias apresentam mecanismos de formação e estruturas cerebrais envolvidas distintas entre si. Porém, nesse trabalho empregaremos apenas os mecanismos de memória declarativa de longa duração.

O Traço de Memória (engrama):

A possibilidade que a memória possa persistir devido á ocorrência de mudanças estruturais das conexões sinápticas no Sistema Nervoso tem sido especulada desde os antigos filósofos gregos. Mas a constatação fenomenológica e experimental dessa teoria começa no fim do século dezenove, quando Cajal e Sherrington propuseram que a ativação repetida de um neurônio leva a mudanças metabólicas que causam uma aproximação com outro neurônio, formando pontes associativas entre eles. Essas pontes dependentes de estímulo constituem uma base fisiológica da memória (Lamprecht e LeDoux, 2004; McGaugh, 2000).

Estas e outras especulações preliminares influenciaram o desenvolvimento da teoria de Hebb. Ele postulou que quando um axônio de uma célula está próximo o suficiente para excitar outra célula e repetida ou persistentemente participa no seu disparo, algum processo de crescimento ou mudança metabólica ocorre em uma ou em ambas as células, de modo que a eficiência de disparo entre ambas é aumentada (Hebb,

1949). O conceito teórico apresentado nesse postulado permanece útil como sendo o possível substrato celular do engrama ou traço de memória (Lamprecht e LeDux, 2004).

A busca história, de mais de um século, do substrato físico da memória envolveu inúmeros trabalhos com diferentes modelos experimentais, entre eles: comportamentais, farmacológico-comportamentais e eletrofisiológicos. Esses trabalhos são responsáveis pelo entendimento de que durante a aprendizagem, mudanças fisiológicas reversíveis acontecem nos contatos sinápticos dos neurônios do encéfalo, estas mudanças devem ser estabilizadas ou consolidadas para que o traço de memória possa persistir. As mudanças temporárias reversíveis são relacionadas com os processos de formação de memórias de curta duração, e as mudanças sinápticas mais persistentes são responsáveis pela formação de um traço mais duradouro de uma memória de longa duração. Acredita-se que a estabilização desse traço é dependente da expressão gênica, controlada pelo estímulo, e da síntese protéica resultante (Dudai, 2004; Lamprecht e LeDux, 2004; McGaugh, 2000).

Estruturas encefálicas envolvidas com a memória:

O fisiologista russo Ivan Pavlov afirmava que os processos cognitivos estavam centrados no neocórtex (Lorenzini et al., 1999). Hoje é de conhecimento que algumas regiões específicas do encéfalo são responsáveis pelo processamento de diferentes tipos de memórias (Quillfeldt et al., 1996).

O estudo com humanos que sofreram a destruição bilateral do lobo temporal, demonstrou que essa região é importante para a formação de novas memórias declarativas, porém as lesões não causavam amnésia retrograda de longa duração

(Scoville e Millner, 1957). Trabalhos envolvendo métodos que causavam a destruição ou o bloqueio farmacológico mais preciso de algumas estruturas em animais, tornaram-se exemplos de um modelo consagrado para desvendar os mecanismos da memória (McGaugh e Izquierdo, 2000). Esses trabalhos apontam que o processamento de memórias declarativas é dependente de estruturas como o hipocampo e a amígdala (Fuster, 1997).

O hipocampo e a amígdala são interconectados por vias aferentes e eferentes indiretas via, principalmente, o córtex entorrinal, que também tem conexões com o córtex parietal posterior e córtex pré-frontal. Todas essas estruturas desempenham papéis de forma integrada na memória (Quillfeldt et al., 1996; Izquierdo et al., 1997; Lorenzini et al., 1999).

Contudo, a contribuição de cada estrutura e região específica não é idêntica. O hipocampo processa principalmente informações espaciais e contextuais. A amígdala é um importante núcleo modulador da atividade hipocampal e sua função apresenta, como principal substrato, informações com fortes componentes emocionais e aversivas. O estresse é um fator importante no processamento integrado entre hipocampo e amígdala (Pitkanen, Savander e Ledoux, 1997; McGaugh, Roozendaal e Ahill, 1999).

O córtex entorrinal está encarregado de integrar as informações provenientes do hipocampo e da amígdala. Assim, o córtex entorrinal participa do processamento e armazenamento de diferentes conteúdos cognitivos, tanto aversivos contextuais como espaciais (Quillfeldt et al., 1994; 1996; Izquierdo et al., 1997).

O hipocampo é um importante centro de plasticidade sináptica e sua atividade é amplamente modulada por outras regiões encefálicas, como por exemplo: a amígdala e os núcleos colinérgicos do septo medial e o núcleo basalis de Meynert (Parent e Baxter, 2004). O hipocampo é composto por duas áreas, dobradas uma sobre a outra.

Uma é chamada de Giro Denteado, enquanto a outra é denominada de Corno de Amon. O Corno de Amon apresenta duas subregiões principais CA3 e CA1 (Cooper e Lowenstein, 2001).

O córtex entorrinal é uma grande via de entrada de informações ao hipocampo, através de um feixe de axônios chamado de via perforante. Esses axônios estabelecem sinapses com os neurônios granulares do giro denteado. Os neurônios do giro denteado projetam axônios através das fibras musgosas que fazem sinapses com os neurônios piramidais de CA3. As células de CA3 projetam axônios que se ramificam. Um ramo deixa o hipocampo pelo fórnix e o outro, chamado de colateral de Schäffer, forma sinapses com os neurônios piramidais de CA1, que, por sua vez, comunicam-se com o córtex entorrinal. O circuito trisináptico básico do hipocampo apresenta contatos sinápticos extremamente plásticos e suscetíveis à modulação tanto por agentes endógenos como por fármacos infundidos, além de suas vias constituírem objetos de estudo de diferentes protocolos eletrofisiológicos (Cooper e Lowenstein, 2001).

A via septo-hipocampal é uma importante entrada colinérgica ao hipocampo, provavelmente projetando para as regiões dendríticas proximais de neurônios piramidais e para os interneurônios. Um pequeno número de neurônios colinérgicos intrínsecos também estão presentes no hipocampo. É sabido que a liberação de acetilcolina causa certas ações, incluindo excitação, desinibição, e inibição pré-sináptica nas células piramidais do hipocampo. Portanto, os neurônios aferentes do septo podem efetivamente alterar a atividade hipocampal (Rouse et al., 1999). O sistema septo-hipocampal, com a circuitaria interna da formação hipocampal, mais as conexões com regiões associativas do córtex, com a amígdala e com o núcleo basalis de Meinert, sugere fortemente um possível substrato morfológico para os processos superiores da memória. (Hasselmo, 1999; 2006).

Cada etapa do processamento da memória parece envolver diferentes mecanismos e diferentes áreas do Sistema Nervoso Central. De acordo com Quillfeldt et al., 1996, a formação da memória requer a atividade integrada sequencial de diferentes áreas: como o hipocampo, a amígdala (basolateral), o córtex entorrinal e o córtex posterior parietal também são necessários para a evocação da esquia inibitória 24 horas após o treino. Com outros intervalos entre treino e teste, porém, estas estruturas têm participação diferenciada: o hipocampo juntamente com a amígdala é necessário apenas até 26 dias após o treino, o córtex entorrinal apresenta função somente até 30 dias, e o córtex posterior parietal é necessário de dois a três meses após o treino para a evocação em ratos.

É possível que o nível de atenção, dependente da atividade cortical, dado a uma determinada nova experiência leve a ativação da formação hipocampal, que sofreria alterações plásticas, fazendo com que a nova informação possa ser armazenada de forma mais definitiva nas estruturas corticais mais ascendentes. O hipocampo parece constituir um local transitório onde a informação seria temporariamente armazenada (Fuster, 1997).

Outras áreas encefálicas como o teleencéfalo basal, principalmente o estriado, o cerebelo e os córtices motores também participam do processamento de memórias com conteúdo procedural ou implícito. Talvez, atuando de forma paralela e independente de estruturas límbicas ou dos lobos temporais (Fuster, 1997).

Fases da Memória

A memória de uma experiência não é algo que se estabelece instantaneamente no encéfalo de um indivíduo. É necessário um tempo, no qual a memória vai sendo preparada para se tornar algo mais permanente. Durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, elas são suscetíveis à interferência de outras memórias, drogas ou outros tratamentos (McGaugh, 1966; 2000).

O processamento da memória divide-se nas fases de aquisição, consolidação/armazenamento e evocação (Quillfeldt, 1994). Apesar de possuir etapas bem caracterizadas, a memória pode sofrer constantes transformações quando evocada, seja por estímulos diretamente relacionados com o episódio de aprendizagem, como tarefas repetitivas, seja por associação de outras informações colocadas no momento da evocação. Ou seja, uma memória consolidada pode ser labilizada após uma evocação e a fase de reconsolidação surge como o mecanismo pelo qual uma memória pode ser atualizada a fim de persistir (Nader et al., 2000; Sara, 2000).

A aquisição refere-se ao período de tempo em que o indivíduo responde aos estímulos que levarão à formação de uma memória, é dependente do grau de atenção relacionada com a nova informação (McGaugh, 2000). A consolidação é o período em que o traço de memória é instável, e está sendo complementado e modulado por várias informações sobre o ambiente (Dudai, 2004; McGaugh, Rosendaal e Cahill, 1999; McGaugh, 2000). Para a formação de uma memória de longa duração, está envolvida uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas encefálicas que compreendem diversas fases (Izquierdo e Medina, 1997). Por fim, o armazenamento, é o processo através do qual o traço de memória, mais consistente, é guardado de maneira mais permanente (Izquierdo et al, 1997).

O aprendizado adquirido a partir de um novo estímulo pode ser alterado das mais variadas formas, se uma ou mais das etapas de formação da memória for manipulada. A interferência pode ocorrer antes da exposição a uma nova experiência, ou nos momentos iniciais da aquisição, ou, ainda, algumas horas após. Em qualquer um desses momentos o processo de consolidação da memória é suscetível a alguma alteração (McGaugh, 1966). Já o processo de evocação pode ser interferido com tratamento aplicados minutos antes do teste (Izquierdo et al., 1997; Barros et al., 2001). Uma manipulação aplicada logo após o teste, durante a reabilitação, age, principalmente, na fase de reconsolidação (Figura 1) (Nader et al., 2000).

Como podemos estudar a memória?

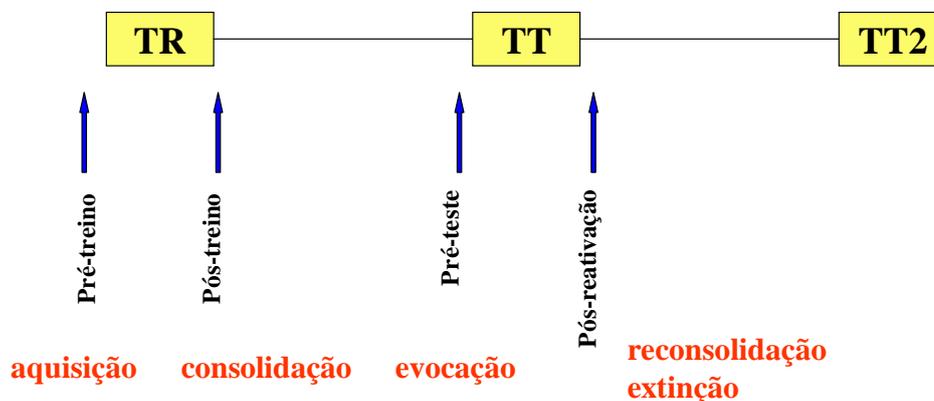


Figura 1: Esquema representativo de um desenho experimental de uma tarefa com uma única sessão de treino e as fases da memória que podem ser estudadas com este protocolo.

Mecanismos do processo de consolidação da memória:

A consolidação é definida como sendo o processo de estabilização dependente de tempo que eventualmente leva ao armazenamento permanente de uma nova memória adquirida. O termo consolidação é utilizado para definir dois processos diferentes: consolidação sistêmica, que envolve o processamento de memórias dependentes de hipocampo que, com o passar do tempo (anos em humanos e semanas em ratos) tornam-se independentes do hipocampo, ou seja, reflete o mecanismo pelo qual memórias remotas são armazenadas de forma difusa e mais permanente no neocórtex e não necessitam mais do hipocampo para serem evocadas; e consolidação sináptica que é a estabilização dependente de tempo (horas) das modificações na eficiência sináptica que ocorrem em seguida à aquisição (Nader e Hardt, 2009). Este trabalho está focado exclusivamente no estudo desse último processo.

Os mecanismos de consolidação de memórias de longa duração, a fase de formação da memória mais bem estudada, começaram a ser desvendado nos últimos 20 anos em consequência da descoberta de um processo eletrofisiológico chamado Potenciação de longa duração (PLD). Esta consiste no aumento persistente da resposta de neurônios a uma breve estimulação tetânica de um axônio ou conjunto de axônios que fazem sinapses com elas. Em seguida, foi descrita a Depressão de Longa Duração (DLD), outro fenômeno eletrofisiológico que consiste na inibição persistente de uma determinada resposta sináptica como consequência, também, da estimulação repetida, porém de baixa frequência, de uma via aferente (Bliss e Collingridge, 1993; Lamprecht e LeDoux, 2004).

Esses foram os processos eletrofisiológicos observados cuja a duração podia ser medida em horas, semanas ou meses. Essa longa duração, análogo ao próprio fenômeno

da memória, levou muitos a considerá-los como possíveis bases dos processos de formação e armazenamento da memória (Stevens, 1998).

Porém, trabalhos posteriores demonstraram que os mecanismos envolvidos com o processo de consolidação não são completamente idênticos à potenciação de longa duração, mesmo que, na sub-região CA1, utilizem muitos processos em comum (Stevens, 1998).

A explicação mais provável para os fenômenos de PLD, DLD e consolidação de memórias declarativas de longa duração é que as células nervosas, mais particularmente, as células piramidais da região CA1 do hipocampo, sofrem modificações plásticas. Denomina-se “plasticidade sináptica” o conjunto de processos fisiológicos, no nível celular e/ou molecular, que explica a capacidade dos neurônios de mudar suas respostas com relação a determinados estímulos da experiência (Bliss e Collingridge, 1993; Lamprecht e LeDoux, 2004).

A farmacologia tem se revelado um importante aliado nos estudos comportamentais, sobretudo na pesquisa dos processos da memória (McGaugh & Izquierdo, 2000). Os tratamentos realizados após o treino são os mais adequados para estudar a memória de qualquer tarefa, podendo resultar em facilitação ou prejuízo desta (McGaugh, 1966, 2000). A existência de sistemas endógenos que, quando manipulados experimentalmente, afetam o desempenho dos animais no teste, sugere que muitos destes sistemas estejam fisiologicamente envolvidos na consolidação da memória.

Há alguns anos, os sistemas moduladores mais estudados eram aqueles envolvidos com a resposta de adaptação ao estresse, compreendendo os sistemas mediados por catecolaminas como a noradrenalina e a adrenalina, e por neuropeptídeos como a β -endorfina e vasopressina (Izquierdo et al., 1993). Atualmente, existe um consenso da atividade de sistemas de neurotransmissores efetores, como o aminoácido

excitatório glutamato e o inibitório GABA, que são modulados pelos outros sistemas, em especial pelo sistema colinérgico.

O principal candidato a promotor da plasticidade sináptica no processo de consolidação da memória é a ativação do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo NMDA, que permite o influxo de Ca^{++} na célula. Esse é o receptor mais complexamente regulado que se conhece, pois ele necessita da ligação do neurotransmissor glutamato (ou aspartato) e da ligação da glicina (considerada um coagonista do receptor) ao seu sítio específico; além disso, apresenta sítios de ligação para poliaminas (espermina e espermidina) (Dingledine e McBain, 1999). O influxo de cálcio nas células origina uma cascata de sinalização com a ativação de várias proteínas-quinase, entre elas a proteína quinase dependente de cálcio (PKC) e a cálcio-calmodulina quinase tipo II (CAMK II). A atividade dessas enzimas favorece a fosforilação de diversos tipos de receptores ao glutamato, ativando-os por várias horas (Izquierdo e McGhaugh, 2000).

Simultaneamente à ativação do receptor NMDA, ocorre a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, de receptores colinérgicos muscarínicos e de noradrenérgicos β , que modulam a ação dos anteriores. Deste modo também ocorre a produção de outros segundos mensageiros, como o GMPc e o AMPc, que ativam outras proteínas quinase, como a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e as proteínas cinases ativáveis por agentes mitógenos (MAPK) (Dudai, 2004).

Essas cinases fosforilam uma série de outras proteínas, e ao fim da cascata, levam a mudança nos níveis de expressão na atividade de várias proteínas, como, por exemplo, a ativação da P-CREB nuclear, que participa em processos que levam à síntese de muitas proteínas (Dudai, 2004).

A proteína cinase dependente de GMPC (PKG) está envolvida na produção de mensageiros retrógrados, pois ativa três enzimas: a óxido nítrico sintetase, que produz NO; a hemeoxigenase, que produz monóxido de carbono; e a enzima que produz o fator de ativação plaquetário (PAF). O NO e o CO são gases que se difundem através da membrana, migrando para a terminação pré-sináptica; o PAF é um lipídio que também atravessa a membrana dendrítica, dirigindo-se à terminação axonal. Estas três substâncias aumentam a eficiência da sinapse através de mecanismos que promovem o aumento da liberação do neurotransmissor glutamato (Dudai, 2004).

O armazenamento de longa duração de informações é um aspecto característico do funcionamento do encéfalo (Bekinschtein et al., 2006). As memórias podem durar por horas (memórias de curta duração), ou por dias, ou por semanas, ou por toda a vida (memórias de longa duração) (Bekinschtein et al., 2008). Memórias de longa duração necessitam de expressão gênica e síntese protéica dentro de um processo de estabilização que ocorre na consolidação em áreas restritas do encéfalo, como o hipocampo ou a amígdala basolateral. Para uma memória persistir, a intensidade do estímulo presente no momento da aquisição deve ser forte o suficiente para fazer com que as modificações moleculares das vias que processam a nova informação sejam resistentes à renovação natural das proteínas sinápticas fazendo perdurar as conexões entre as células. Em outras palavras, a persistência de uma memória deve ser modulada por diversos fatores (estresse, estado de ânimo); porém, pouco é conhecido acerca dos mecanismos moleculares que possibilitam que algumas memórias persistam mais que outras (Bekinschtein et al., 2006).

Recentemente, foi descrito o requerimento tardio (12 horas após o treino), dentro do processo de consolidação, de transcrição gênica e a expressão de BDNF, que regula a estrutura e função neuronal com particular importância na plasticidade sináptica, no

hipocampo como mecanismos mediadores da persistência da memória de longa duração (Bekinschtein et al., 2006). Além disso, foi proposto que a ativação da área tegmental ventral (especificamente ativada durante uma experiência com um relevante componente motivacional) imediatamente e 12 horas após o treino culmina na ativação dopaminérgica no hipocampo e o aumento dependente de BDNF (12 horas após o treino) determinando, também, a manutenção da memória de longa duração (Rossato et al., 2009).

Outro forte candidato a favorecer a persistência da memória é a atividade fosforilante persistente de uma isoforma de PKC chamada proteína cinase M zeta (PKM ζ), que recentemente tem sido descrita como sendo um fator crítico para a manutenção de memórias aversivas de longa duração no hipocampo, na amígdala e no neocórtex. A PKM ζ tem uma atividade automática e persistente, pois não apresenta o sítio regulatório da PKC, sendo composta somente pelo domínio catalítico da PKC ζ . No cérebro, a PKM ζ é gerada por um gene específico que produz somente o domínio ζ catalítico. Durante uma potenciação de longa duração, o estímulo tetânico induz o aumento de síntese de PKM ζ que favorece a manutenção da potenciação da transmissão sináptica de longa duração (Hernandez et al., 2003; Shema et al., 2007; Yao et al., 2008; Serrano et al., 2008).

Enfim, o armazenamento de memórias se deve, também, a alterações morfológicas das sinapses envolvidas. A ativação plástica de algumas vias nervosas, envolvendo o hipocampo e suas conexões, causa alterações ao metabolismo celular e modificações morfológicas das sinapses por meio de uma série de passos moleculares, na subregião do giro denteado, especialmente, a plasticidade pode ocorrer, inclusive, com neurogênese (McEwen, 1999).

Mecanismos de evocação e reconsolidação da memória:

Como já dito anteriormente, em modelos animais, a única forma de medir uma memória é verificarmos a alteração de um comportamento durante a evocação, onde ocorre a reativação das redes sinápticas de cada memória (Quillfeldt et al., 1994). A evocação será, então, mais fidedigna quanto mais componentes do estímulo condicionado sejam apresentados na hora do teste. Recriar uma memória para evocá-la, implica em conchamar à ação o maior número de sinapses pertencentes aos estímulos condicionados dessa memória.

Na evocação simultaneamente à ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA, as vias de sinalização da PKA, PKC e MAPK são necessários em CA1, córtices entorrinal, parietal e cíngulo anterior. Diferentemente da consolidação, a CAMK II não é importante para a evocação (Izquierdo et al., 1998; Szapiro et al., 2002).

A evocação constitui um processo molecular complexo que ocorre simultaneamente em várias áreas cerebrais, e que obedece a mecanismos bioquímicos próprios. A participação de enzimas como a PKA, PKC e MAPK sugere que outros sistemas de neurotransmissores, e outros receptores metabotrópicos, participam do processo. Além disso, essas são as três principais vias enzimáticas em todos os fenômenos plásticos conhecidos nos tecidos nervosos, indicando que o processo de evocação da memória não é simplesmente uma consequência da consolidação, mas um processo novo e diferenciado (Szapiro et al., 2002).

Após a consolidação, uma memória pode permanecer estavelmente armazenada e eventualmente ser evocada quando necessária, mas isso não significa que esta memória estará cristalina e indefinidamente gravada, insensível a todo o tipo de evento

pós-consolidação. Ao invés disso, as memórias consolidadas tornam-se labilizadas quando reativadas, o que ocorre quando evocadas. Durante essa nova fase de fragilidade, essas memórias podem sofrer interferência de diversos tratamentos, comportamentais e farmacológicos, inclusive a memória pode ser bloqueada com a administração de bloqueadores de transcrição gênica, de forma semelhante ao que ocorre na fase inicial de consolidação. Esta similaridade particular ao início do processo de consolidação levou a quase totalidade da comunidade científica a chamar esta fase que ocorre imediatamente após a evocação de reconsolidação. Portanto, através dessa “nova consolidação” uma memória labilizada pela evocação pode ser novamente estabilizada (Alberini, 2005; Dudai e Eisenberg, 2004; Nader et al., 2000; Sara, 2000; Suzuki et al., 2004; Tronson e Taylor, 2007).

Apesar de existir uma sobreposição entre consolidação e reconsolidação quanto à função de armazenamento de memórias e quanto à necessidade de síntese protéica subjacente, a reconsolidação não é apenas uma simples repetição da consolidação (Tronson e Taylor, 2007). Sistemas de neurotransmissores e cascatas bioquímicas envolvidas podem apresentar diferenças, por exemplo: os receptores CB1 canabinóides hipocampais apresentam papéis contrários entre consolidação e reconsolidação (de Oliveira Álvares et al., 2008); além disso, ocorrem diferenças na expressão de fatores de transcrição (c-Fos) entre os dois processos em diferentes estruturas encefálicas (Lee et al., 2004).

A reconsolidação pode corresponder ao mecanismo pelo qual memórias antigas possam ser integradas a novas memórias, ou que memórias antigas possam ser atualizadas ou mesmo substituídas por novas memórias cujo significado seja conflitante, mas que apresentem melhor representatividade sob novas condições. Além disso, a reconsolidação pode também ser considerada como uma fase de um processo mais

extenso de consolidação, onde a estabilidade de um traço mnemônico não seria apenas uma consequência da intensidade da aprendizagem, mas também do número de vezes que este traço é reativado. Do ponto de vista adaptativo desse processo, fica evidente como a relevância comportamental de uma memória está diretamente correlacionada com o maior número de vezes que ela é reativada, a estabilização desse traço está intimamente relacionada aos episódios de evocação e reconsolidação (Alberini, 2005).

Entretanto, a reconsolidação não pode ser considerada uma propriedade universal da memória. Sob condições especiais, as memórias podem não ser facilmente labilizadas através de uma reativação, isso ocorre, por exemplo, com memórias remotas, ou memórias de longuíssima duração. Essas memórias estão armazenadas de forma difusa e definitiva em estruturas como o neocórtex, e as reativações não são suficientes para labilizá-las e conseqüentemente reconsolidá-las (Nader e Hardt, 2009).

Além disso, em condições experimentais – como na tarefa de Condicionamento Aversivo Contextual (CAC) que segue um modelo Pavloviano onde uma sessão de treino pareando um estímulo condicionado (choque nas patas de um rato) com estímulo incondicionado (contexto) produz uma memória aversiva bastante robusta e medida através de respostas de congelamento (“freezing”) – a intensidade do treinamento (intensidade e/ou quantidade de choques) utilizada também é determinante para o estudo da reconsolidação (Bustos et al., 2006; 2009). Um treinamento muito intenso torna as memórias pouco suscetíveis à labilização com uma reativação, uma estratégia aplicável nesse caso é a de utilizar uma reativação mais duradoura, ou, ainda, utilizar várias reativações.

A natureza das reativações utilizadas experimentalmente determina os objetivos do trabalho. Em protocolos de treinamentos brandos, as reativações curtas (2-5 minutos) são suficientes para labilizar as memórias e tratamentos farmacológicos (inibidores de

transcrição) infundidos em estruturas como o hipocampo dorsal e a amígdala basolateral de ratos imediatamente após a reativação são amnésicos sobre a reconsolidação da memória (Nader e Hardt, 2009). Entretanto, reativações mais longas (15-30 minutos) causam a extinção da memória da tarefa. A extinção corresponde a uma nova memória formada que compete e atrapalha a expressão da memória original, por exemplo: na tarefa de CAC, um contexto que originalmente causava muito medo num rato parece tornar-se menos nocivo ao animal após uma longa sessão de reativação. O animal aprende, assim, que o contexto não é tão desagradável. Portanto, a formação de uma nova memória (consolidação da extinção) interfere com a reconsolidação da memória original sob condições especiais (Nader e Hardt, 2009)

O Sistema Colinérgico Muscarínico e a memória

O sistema colinérgico desempenha um papel essencial nos processos aprendizado e memória (Winkler et al., 1995). O neurotransmissor acetilcolina (ACh) liga-se a duas classes de receptores: os receptores colinérgicos nicotínicos, de ação ionotrópica, e os receptores colinérgicos muscarínicos, de ação metabotrópica (Kandel et al., 2000).

A síntese de acetilcolina ocorre nos terminais nervosos a partir de dois precursores, a colina e a acetil-coenzima A, fornecidas pela clivagem de fosfolípídeos e a partir do metabolismo oxidativo na mitocôndria. A colina acetiltransferase catalisa a síntese de acetilcolina que, por sua vez, pode interagir com receptores colinérgicos pré e pós-sinápticos. A acetilcolinesterase, localizada na fenda sináptica, hidroliza a acetilcolina e colina e acetato (Taylor e Brown, 1999)

A anatomia do sistema colinérgico central envolve três grupos de neurônios principais: o sistema motor, que inclui os motoneurônios da medula espinhal e núcleos dos nervos dos pares cranianos; os neurônios colinérgicos estriatais, que participam do controle motor extrapiramidal; e os neurônios da coluna colinérgica rostral do prosencéfalo basal, incluindo o complexo septo medial, que projeta axônios ao hipocampo, e o núcleo basal, que projeta à amígdala, demonstrando envolvimento com aprendizado e memória (Singh, 1985).

Os receptores muscarínicos pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Esse sistema é composto de cinco subtipos de receptores (M1 a M5), cada qual codificado por um gene específico, sendo que os receptores M1 ao M4 são expressos no neocórtex (Kimura e Baughman, 1997).

A ACo ao ligar-se ao receptor muscarínico, dispara um sinal da membrana ao citoplasma, cuja latência de ativação é lenta (100-250 ms) em comparação com um receptor ionotrópico (5 ms). Quando ocorre a ativação de um receptor muscarínico, a proteína G, composta por três subunidades ($G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$), tem suas subunidades desacopladas devido a atividade de $G\alpha$ que desliga-se do GDP e liga-se ao GTP, estimulando uma cascata de sinalização intracelular (Selbie e Hill, 1998).

Dependendo do tipo de receptor metabotrópico e do tipo de proteína G associada, a subunidade $G\alpha$ pode produzir efeitos diversos:

- ativação da fosfolipase C, formando inositol-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG);
- ativação da adenilil ciclase, aumentando os níveis de AMPc;
- inibição da adenilil ciclase, diminuindo os níveis de AMPc;
- ativação da fosfolipase A2, formando ácido araquidônico (Selbie e Hill, 1998).

Já foi demonstrado que os subtipos de receptores muscarínicos M1, M3 e M5, preferencialmente, são associados à subunidade $G\alpha$ da família Gq/G11, resultando na

estimulação de diferentes isoformas de PLC. Entretanto, os receptores M2 e M4 acoplam-se à classe Gi/G0, envolvida na inibição da adenilil ciclase e na inibição da cascata da PKA (Jerusalinsky e Harvey, 1994). Quando localizados no terminal pré-sináptico, os receptores M2 e M4 controlam negativamente a liberação de neurotransmissores (GABA, glutamato e acetilcolina) através da ativação de canais de potássio que hiperpolarizam a célula inibindo a ativação de canais de cálcio, necessários para a exocitose dos neurotransmissores (Taylor e Brown, 1999)

A importância da modulação colinérgica muscarínica nos processos cognitivos pode ser ilustrada por algumas características patológicas presentes na doença de Alzheimer, como, por exemplo, a degeneração dos neurônios colinérgicos do núcleo basalis de Meinert que causa uma diminuição significativa da acetilcolina liberada na amígdala, hipocampo e neocórtex e uma conseqüente diminuição da modulação dos receptores muscarínicos sob as funções neuronais nessas estruturas (Coyle et al., 1983; Levey, 1996; Wilkinson et al., 2004; Thathiah e De Strooper, 2009). Em especial interesse, ocorre uma diminuição significativa na expressão de receptores M4 no hipocampo de pacientes com a doença de Alzheimer quando comparado com o hipocampo de pessoas que não tiveram essa doença (Mulugeta et al., 2003).

O principal papel do sistema colinérgico muscarínico sobre a memória parece ser o de desempenhar um efeito modulatório (Segal e Auerbach, 1997). Os diferentes subtipos de receptores muscarínicos são importantes para a regulação independente de respostas excitatórias e inibitórias via outros neuromoduladores e segundos mensageiros (Kimura e Baughman, 1997). Antagonistas colinérgicos atenuam a influência no armazenamento da memória pela atividade opióide, GABAérgica e β -adrenérgica, sugerindo uma modulação colinérgica da memória sobre todos esses sistemas (Introini-Collison et al., 1996).

Um considerável número de trabalhos tem corroborado com a idéia clássica de que agonistas colinérgicos muscarínicos são facilitatórios quanto à retenção da memória de tarefas comportamentais em ratos e que antagonistas, entretanto, são amnésicos. A administração intraperitoneal de escopolamina, um antagonista colinérgico muscarínico inespecífico, diminui o aprendizado espacial e este efeito é revertido pelo agonista inespecífico oxotremorina (Lamberty e Gower, 1991). Muitos desses estudos foram realizados com a administração sistêmica dos fármacos e, portanto, não demonstraram com muita clareza o papel exclusivo de uma determinada estrutura encefálica (Rogers and Kesner, 2003, 2004; Hasselmo, 1999; 2006). Porém, vários grupos já demonstraram que a infusão intra-hipocampal do antagonista inespecífico escopolamina têm um evidente efeito amnésico sobre a consolidação da memória da tarefa de Esquiva Inibitória e que a infusão na mesma estrutura do agonista inespecífico oxotremorina é facilitatório sobre a retenção dessa tarefa (Baratti et al., 1979; Izquierdo et al., 1992; Wallenstein e Vago, 2001). A utilização desses fármacos inespecíficos, porém, não permitiu determinar claramente qual subtipo de receptor muscarínico é mais importante. No entanto, o clássico efeito sistêmico dos fármacos foi replicado com a infusão local no hipocampo e isso se deve, possivelmente, ao receptor M1 que é o mais abundante nesta estrutura (Levey et al., 1991) e o alvo preferencial da escopolamina e oxotremorina (Freedman et al., 1988; Caulfield e Birdsall, 1998).

O papel principal exercido pelos receptores M1 na consolidação da memória pode ser devido a sua colocalização com receptores NMDA nos neurônios piramidais do hipocampo, e a coativação desses receptores resulta numa amplificação de corrente através dos receptores NMDA (Figueredo et al., 2008). Além disso, os receptores M1 são requeridos para a ativação de MAPK, PKC e CAMKII, enzimas importantes envolvidas com plasticidade sináptica (Segal e Auerbach, 1997).

Tem-se encontrado diversos fármacos extraídos da natureza que mimetizam muitas substâncias endógenas. Certas toxinas, em especial, apresentam-se como valiosas ferramentas farmacológicas para a pesquisa básica e para a descoberta de alvos de agentes terapêuticos, graças ao seu grande poder seletivo sobre os receptores (Harvey et al., 1998). Da peçonha de serpentes do gênero *Dendroaspis* (mambas) foram descobertas neurotoxinas com atividade seletiva aos receptores muscarínicos, que foram batizadas de Toxinas Muscarínicas (MTs). As toxinas MT1, MT2, MT3 e MT7 foram extraídas do veneno da mamba verde africana (*Dendroaspis angusticeps*). A MT1 e a MT2 são agonistas de receptores M1 e antagonistas de receptores M4, mas com pouca seletividade sobre esses receptores (Jerusalinsky e Harvey, 1994). A MT3 apresenta 214 vezes mais afinidade ao receptor M4 que para o receptor M1, sendo um antagonista seletivo para o receptor M4. A MT7 bloqueia com grande afinidade o receptor M1 (Olianas et al., 1997).

Resultados anteriores demonstraram que a administração intra-hipocampal pós-treino da MT2, na esQUIVA inibitória, em doses de 0,30 e 2,00 µg/lado, causou um efeito facilitatório sobre a retenção da memória, porém somente com a dose mais baixa (Jerusalinsky et al., 1998; Ferreira et al., 2003). Como a MT2 se liga aos receptores M1 e M4, mas com maior afinidade pelo M1, em uma baixa concentração o efeito possivelmente se deve a que a toxina atingiu principalmente o M1, um receptor excitatório; a inefetividade da dose maior poderia ser atribuída ao recrutamento concomitante tanto de receptores M1, quanto de M4, cuja resposta a um agonista é oposta (Ferreira et al., 2003).

A administração intra-hipocampal pré-teste de MT3, o antagonista colinérgico muscarínico que é o mais seletivo disponível para os receptores do tipo M4, na tarefa de esQUIVA inibitória, também causou um efeito facilitatório sobre a evocação desta tarefa

(Diehl et al., 2007). Porém, este efeito é contrário ao encontrado com a infusão pós-treino (efeito amnésico sobre a consolidação) (Ferreira et al., 2003). Estes achados permitem-nos inferir a existência de mecanismos opostos de modulação muscarínica dos processos de consolidação e de evocação de memórias aversivas (hipótese a ser testada nesse trabalho).

Durante o meu mestrado foi demonstrado que o bloqueio inespecífico de receptores colinérgicos muscarínicos através da infusão de escopolamina e pirenzepina na região hipocampal dorsal produzia um efeito facilitatório sobre a evocação de uma memória com forte componente aversivo, como a Esquiva Inibitória. Adicionalmente, verificamos que a atividade de um agonista menos seletivo como a oxotremorina apresenta um efeito amnésico, ainda que pouco robusto, porém consistente com os resultados encontrados com os antagonistas muscarínicos. De uma forma geral, podemos inferir que as aferências colinérgicas que modulam a atividade hipocampal (especialmente de CA1) promovem a inibição da evocação da memória (Diehl, 2006).

Por outro lado, estas Toxinas Muscarínicas constituem ferramentas farmacológicas importantes, uma vez que são capazes de bloquear ou ativar receptores colinérgicos muscarínicos específicos. Assim como a escopolamina, a MT3 (dose de 2,0 µg/lado), antagonista seletivo para o receptor M4, teve um efeito facilitatório sobre a evocação da esquiva inibitória. Demonstrando que esse receptor, particularmente, é responsável pela modulação muscarínica sobre neurônios excitatórios efeores na região hipocampal dorsal de forma mais robusta que os outros receptores colinérgicos muscarínicos (Diehl et al., 2007).

A MT2, agonista seletivo para o receptor M1, também apresentou um efeito facilitatório no processo de evocação, o que também está de acordo com resultados anteriores, que demonstraram esse mesmo efeito com infusão pós-treino; tal efeito se

deu apenas com a dose mais baixa (0,75 µg/lado), a mais seletiva para o receptor M1 (Diehl, 2006). Como os receptores colinérgicos muscarínicos M1 tem uma atividade metabotrópica “excitatória”, que ativa determinadas cascatas enzimáticas, é plausível supor que os mesmos estejam modulando positivamente, tanto os processos de consolidação, quanto os de evocação o que explicaria nossos achados.

Nossos resultados, ademais, mostraram que a MT3 e causou um efeito facilitatório na evocação da tarefa de esQUIVA inibitória, quando administrada 20 minutos antes do teste, mas nenhum efeito foi encontrado na tarefa menos aversiva, a habituação ao campo aberto; já o número inalterado de cruzamentos feitos pelo animal nesta tarefa, mesmo aplicando-se as doses que foram efetivas no experimento de esQUIVA inibitória, contudo, dá suporte à idéia de que o efeito de ambos os fármacos nesta tarefa seja basicamente cognitivo, e não motor ou exploratório (Diehl et al., 2007).

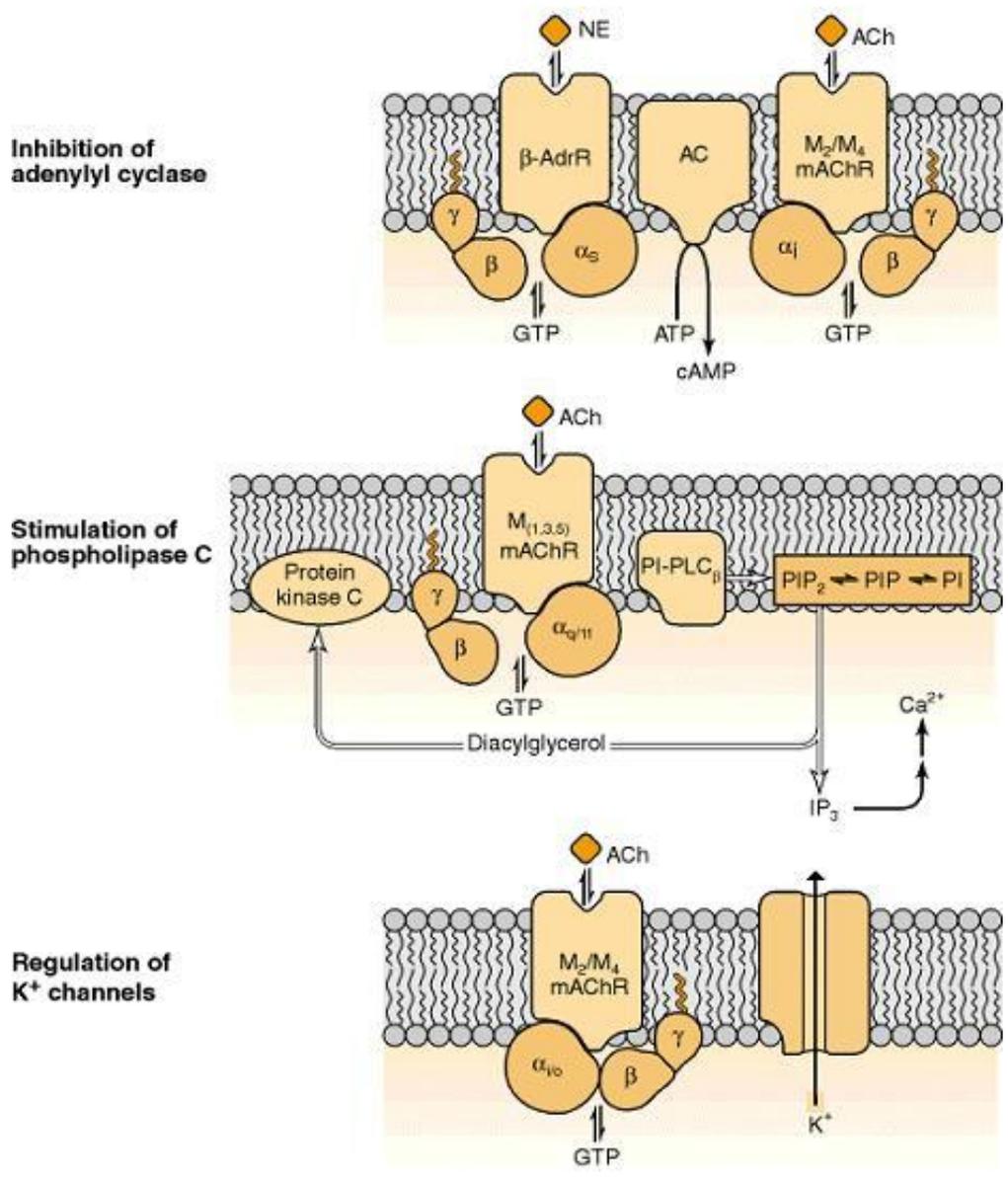


Figura 2 – esquema dos receptores colinérgicos muscarínicos (Taylor e Brown, 1999).



Figura 3: serpente mamba verde africana (*Dendroaspis angusticeps*)

JUSTIFICATIVA DE TRABALHO

Os nossos estudos têm se concentrado muito no papel do sistema colinérgico muscarínico hipocampal sobre os processos de consolidação e evocação da memória da tarefa de Esquiva Inibitória. O presente trabalho tem o objetivo de replicar os resultados anteriores usando a tarefa de Condicionamento Aversivo Contextual, além de estudar os processos de reconsolidação e extinção, sendo estes pontos chaves e inéditos na construção do conhecimento acerca da função dos receptores muscarínicos sobre a memória, com especial interesse no papel dos receptores M4 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral.

Os receptores M4 modulam a atividade de outros sistemas efetores, inibitórios e excitatórios (Rouse et al, 1999). Existem evidências experimentais de que, durante o processo de consolidação, ocorre uma ação modulatória desses receptores sobre interneurônios inibitórios GABAérgicos. O presente trabalho tem o objetivo de verificar com um pouco mais detalhamento como ocorre a mudança de efeito da MT3 intra-hipocampal durante o processo de consolidação, o que explicaria o efeito diferenciado do tratamento feito antes da evocação. Este estudo visa definir a janela temporal em que tal efeito se daria – mediante a infusão intra-hipocampal de MT3 em diferentes períodos pós-treino

Outro de nossos objetivos baseia-se no fato de que os fenômenos de plasticidade sináptica relacionados com o processamento de memórias de longa duração são dependentes de síntese protéica (McGaugh, 2000): verificaremos se a eventual plasticidade dos receptores M4 necessita / depende da transcrição gênica de novos receptores em locais onde ainda não estavam expressos (no caso, sobre os neurônios

glutamatergicos); para tanto, empregamos inibidores de transcrição, como, por exemplo, o DRB - Diclororribofuranosilbenzimidazol (2R, 3R, 4S, 5R) -2 - (5,6 - dichlorobenzoimidazol) - (Igaz et al. 2002).

OBJETIVOS GERAIS

1- Estudar o efeito da infusão intra-hipocampal de MT3 ou escopolamina sobre os processos de consolidação, evocação, reconsolidação, consolidação da extinção e evocação da extinção da memória da tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC).

2- Estudar o efeito da infusão intra-amígdala de MT3 ou escopolamina sobre os processos de consolidação e reconsolidação da memória da tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC).

3- Estudar em que momento da consolidação ocorre a mudança dos receptores M4 através da infusão intra-hipocampal de MT3 (2,0 µg/lado) e escopolamina (2,0 µg/lado) em diferentes momentos pós-treino (imediatamente, 45 minutos, 1 hora e 30 minutos, 3 horas ou 6 horas após o treino) com o teste ocorrendo 24 horas após na tarefa de Esquiva Inibitória (EI).

4- Estudar a dependência de transcrição gênica para a plasticidade dos receptores M4, através da infusão intra-hipocampal de uma dose sem efeito próprio de um inibidor de transcrição gênica (DRB) imediatamente após o treino, juntamente com a infusão pré-teste (24 horas após) de MT3 (2,0 µg/lado) na tarefa de Esquiva Inibitória.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estudar o efeito dos antagonistas escopolamina e MT3 intra-hipocampais infundidas imediatamente após o treino de CAC.
- 2- Estudar o efeito dos antagonistas escopolamina e MT3 intra-hipocampais infundidas 20 minutos antes do teste de CAC.
- 3- Estudar o efeito dos antagonistas escopolamina e MT3 intra-hipocampais infundidas imediatamente após uma reativação (3 minutos) de CAC.
- 4- Estudar o efeito dos antagonistas escopolamina e MT3 intra-hipocampais infundidas imediatamente após uma reativação (25 minutos) de CAC.
- 5- Estudar o efeito dos antagonistas escopolamina e MT3 intra-hipocampais infundidas 20 minutos antes do teste 24 horas após uma reativação (25 minutos) de CAC.
- 6- Estudar o efeito dos antagonistas escopolamina e MT3 intra-amígdala basolateral infundidas imediatamente após o treino de CAC.
- 7- Estudar o efeito dos antagonistas escopolamina e MT3 intra-amígdala basolateral infundidas imediatamente após uma reativação (3 minutos) de CAC.
- 8- Estudar o efeito da MT3 intra-hipocampal imediatamente após o treino de EI.
- 9- Estudar o efeito da MT3 intra-hipocampal 45 minutos após o treino de EI.
- 10- Estudar o efeito da MT3 intra-hipocampal 90 minutos após o treino de EI.
- 11- Estudar o efeito da MT3 intra-hipocampal 180 minutos após o treino de EI.
- 12- Estudar o efeito da MT3 intra-hipocampal 360 minutos após o treino de EI.
- 13- Estudar o efeito da escopolamina intra-hipocampal imediatamente após o treino de EI.
- 14- Estudar o efeito da escopolamina intra-hipocampal 90 após o treino de EI.

- 15- Estudar o efeito da escopolamina intra-hipocampal 180 minutos após o treino de EI.
- 16- Estudar o efeito do inibidor de transcrição gênica (DRB) – curva dose-resposta – intra-hipocampal imediatamente após o treino de EI.
- 17- Estudar o efeito do DRB (subdose) imediatamente após o treino e MT3 intra-hipocampais pré-teste de EI.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados:

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, com idade igual ou superior a 60 dias (pesos entre 250 e 300 g). Os animais são produzidos no CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e mantidos no Ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (Depto. Biofísica, IB), acondicionados em gaiolas de plexiglass de dimensões 65 x 25 x 15 cm, em cujo assoalho espalha-se maravalha seca e limpa, trocada a cada dois dias (a maravalha é composta por restos do corte de madeira, principalmente uma serragem grossa e lascas). A área é climatizada (22-26°C, humidade constante) e submetida a um ciclo de iluminação de 12h claro / 12h escuro (luzes acesas das 6 às 18 h durante todo o ano). Ração padronizada e água fresca são fornecidas *ad libitum*.

Procedimentos cirúrgicos:

Neste trabalho, as estruturas de interesse foram: o hipocampo dorsal e a amígdala basolateral. As coordenadas destas estruturas foram obtidas, inicialmente, a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1997), de acordo com a faixa de peso dos animais utilizados. Como sempre há variações na forma e nas dimensões do crânio e do cérebro de linhagens de ratos criadas em diferentes localidades, tínhamos de ajustar as

coordenadas fornecidas pelo Atlas à realidade de nossos animais. Assim, para cada estrutura, fizemos uma série de injeções-piloto de 0,5 µl (em cada lado) do corante azul de metileno diluído a 4% em solução salina. A seguir, verificamos histologicamente as diferenças entre as posições atingidas e as posições desejadas. As coordenadas corrigidas são similares às empregadas em estudos prévios nossos ou de outros autores. As coordenadas finais (para a posição da ponta da cânula, 1 mm acima do verdadeiro "alvo" nos ratos operado no hipocampo e 2 mm acima nos animais operados na amígdala basolateral), medidas a partir do bregma, foram as seguintes (AP: ântero-posterior; LL: látero-lateral; DV: dorso-ventral; sempre com inclinação da cabeça de - 0,33 cm):

Hipocampo dorsal	AP = - 0,40 cm
	LL = + /-0,30 cm
	DV = - 0,15 cm

Amígdala	AP = - 0,22 cm
	LL = +/- 0,50 cm
	DV = - 0,60 cm

Em nosso trabalho, foram fixadas cânulas intracerebrais e, através destas, injetadas as substâncias através um tipo de agulha mais fina ("mizzy", de calibre 30), introduzida por dentro da primeira. Era importante que a ponta da agulha saísse mais à frente da cânula, o que evitava que a droga que sai pela ponta da "mizzy" subisse por capilaridade no espaço entre esta e a cânula que a envolve, alterando a quantidade

efetivamente administrada da substância na estrutura intracerebral. Além do mais, a penetração da estrutura-alvo com a agulha mais fina minimiza lesões locais. Assim, a ponta da cânula a ser fixada desce até 1 mm ou 2 mm acima da posição desejada dentro da estrutura-alvo (hipocampo dorsal ou amígdala basolateral, respectivamente)

Os animais foram anestesiados com um anestésico geral, Ketamina (“Francotar”, de fabricação Virba, ou “Vetanarcol”, de fabricação König) juntamente com Xilazina, um sedativo/miorrelaxante/ analgésico (“Coopazine”, de fabricação Coopers, ou “Kensol”, de fabricação König), administrados intra-peritonealmente (i.p.), nas doses de 75mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

Cada animal operado foi cuidadosamente colocado em um Aparelho Estereotáxico (Fabricação: David Kopf, modelo 1404), e a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com bisturi 20 ou 21. Uma craniotomia bilateral é feita com o emprego de uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas ântero-posteriores (AP) e látero-laterais (LL) da estrutura em questão. Uma cânula de aço inoxidável (manufaturada a partir de agulha com diâmetro interno de 0,7 mm, calibre ou gauge 27, e diâmetro interno de 0,3 mm), presa à torre móvel do estereotáxico, foi introduzida cuidadosamente através de cada um desses orifícios feitos na calota craniana e baixada lentamente até a coordenada dorso-ventral (DV) definitiva. A cânula foi, então, fixada nesta posição com acrílico dentário, aplicado ainda quando na forma de um líquido espesso, que deixamos secar e consolidar. O acrílico foi trabalhado para formar uma espécie de "capacete" sobre o osso do crânio, fechando a janela óssea produzida. As cânulas mantêm-se fixas na posição desejada por tempo suficiente após a cirurgia (3 a 5 dias, no mínimo).

No período imediatamente posterior à cirurgia, os animais permaneceram sob aquecimento / umidade controlados, numa câmara pós-operatória. Para reduzir o índice



Figura 4 – Implantação bilateral de cânulas no hipocampo dorsal ou na amígdala basolateral com aparelho estereotáxico.

pós-operatório de infecção, os animais receberam, antes da cirurgia, a administração de um antibiótico, dentre as seguintes opções: Tilosina (“Tilomai”, de fabricação Lumai) 10 mg/Kg i.m. ou 500 mg/l d’água / via oral, Enrofloxacin (“Baytril”, de fabricação Bayer) 2,5-10 mg/Kg qualquer via, Tetraciclina (“Steclin-C”, de fabricação CYBA) 2-5 mg/l d’água / via oral, ou, último caso, Penicilina (“Pencivet-plus”, de fabricação Hoescht Roussel Vet), via i.p. Após decorrido um período de recuperação pós-operatória de 2-3 dias, os animais foram submetidos às tarefas comportamentais.

Verificação do posicionamento das cânulas:

A verificação do acerto da posição da cânula no cérebro do animal foi feita em todos os animais aproveitados nas tarefas comportamentais, isto é, em todos aqueles que cumprissem as seguintes condições: (a) recuperação integral da cirurgia de implantação das cânulas, (b) conservação do capacete de acrílico até o momento da injeção (ver adiante), e (c) cânulas fixas e desobstruídas no momento da injeção. Após a realização das tarefas comportamentais, os animais foram sacrificados por guilhotinamento: foi injetado azul de metileno em cada cânula, no mesmo volume empregado na administração das toxinas (0,5 µl ou 0,3 µl). A seguir os cérebros foram dissecados e colocados em solução de formaldeído a 4 % por 24-72 h. Posteriormente, as peças, já fixadas, foram cortadas com uso de um vibrátomo (Leica), e as marcas das cânulas no tecido cerebral verificadas sob uma lupa binocular 2-40X (com o auxílio da marcação com azul de metileno).

Alguns dos animais (5% do total) foram selecionados aleatoriamente e sacrificados mediante perfusão intracardíaca com formaldeído a 10 %, após lavagem

prévia da árvore vascular com solução salina a 0,9 %. A área de perfusão foi restrita à porção superior do organismo (tronco, cabeça e membros), mediante clampeamento da aorta descendente do animal, tornando o procedimento mais rápido e econômico. O cérebro foi, então, dissecado (sem administração post-mortem de azul de metileno) e preparado conforme técnica de crezil-violeta: A peça foi desidratada mediante banhos sucessivos em etanol a 70%, a 95% e absoluto. Após fixada, a peça era cortada no vibrátomo (cortes histológicos de 25-50 micrômetros), e os cortes, recolhidos em lâminas de vidro preparadas com esfregaço de solução de albumina de ovo com cristais de timol (que garante aderência do corte ao vidro). Os cortes foram reidratados em banhos sucessivos de etanol em concentrações decrescentes (terminando em água destilada), e, então, corados por imersão na solução de cresil-violeta, para, enfim, receber as lamínulas de vidro, fixadas com bálsamo do Canadá (ou equivalente sintético, como Entellan), completando a montagem. Estas lâminas foram examinadas ao microscópio óptico para determinação mais precisa da posição da cânula e da agulha "mizzy", bem como avaliação mais cuidadosa da lesão provocada nos tecidos adjacentes.

Tratamentos Farmacológicos

Nos experimentos deste trabalho, todas as soluções foram preparadas de modo a que cada injeção intracerebral introduziu um volume de 0,5 µl no hipocampo dorsal e 0,3 µl na amígdala basolateral (a cada lado do cérebro). O pH das soluções administradas foi de 7,4. Os fármacos que utilizamos foram dissolvidos em seus respectivos veículos, que podem ser de dois tipos (Tampão fosfato salino TFS com ou

sem 8 % de DMSO), conforme a natureza química da substância. Estes veículos também foram injetados nos grupos-controle correspondentes a cada grupo tratado com alguma droga. Os veículos e fármacos utilizados foram:

- TFS - Tampão Fosfato de Sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e Potássio ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0,1 M – “salino” (isomolar a uma solução de NaCl a 0,9 g%), pH corrigido para 7,4.

- DMSO 8% em TFS (veículo do DRB).

- Toxinas Muscarínicas: As toxinas utilizadas foram obtidas mediante separação cromatográfica no laboratório do Dr. Carlos Cerveñansky (IIBCE, Montevideo), conforme descrito em Jerusalinsky et al. (1998); os liófilos são ressuspensos em TFS (ver acima) nas seguintes concentrações, de acordo com as pequeníssimas quantidades disponíveis: MT3 (4,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) antagonista seletivo aos receptores M4.

- Escopolamina, antagonista colinérgico muscarínico inespecífico.

- Inibidores de Transcrição Gênica: Em preparação aos experimentos do objetivo número 4 foi realizada uma curva dose resposta com o inibidor de transcrição DRB (Igaz et al., 2002).

Para cada droga injetada, em cada situação comportamental testada, há um grupo-controle correspondente. Neste grupo controle, injeta-se o veículo utilizado para dissolver a droga do grupo efetivamente tratado. Deste modo, pode-se saber qual o efeito da droga, descontados os efeitos de componentes do veículo. A injeção do fármaco foi feita através de uma agulha fina ("mizzy"), com diâmetro externo de 0,3 mm (calibre 30), baixada suavemente através de cada uma das cânulas e introduzida no cérebro até o ponto almejado na estrutura-alvo, 1-2 mm abaixo da coordenada dorso-ventral (DV) da cânula. A propulsão da microsseringa foi feita automaticamente com emprego de uma “bomba” propulsora de microsseringas Hamilton (marca: Cole-Parmer 74900). Enquanto isto, o animal foi imobilizado manualmente, com ajuda de um pano.

A agulha injetora estava conectada através de um tubo de polietileno, a uma microseringa Hamilton de 5 ou 10 μ l, ambos preenchidos com o fármaco em questão (ou seu veículo, caso seja um grupo-controle). A injeção foi sempre feita automaticamente, utilizando-se a bomba supramencionada, e simultaneamente nos dois lados, à razão de 0,5 μ l / 90 s. Completada a injeção, aguardou-se mais 30 segundos antes de retirar a "mizzy" (também lentamente), para que haja absorção/difusão da substância no parênquima cerebral, sem refluxo.

Testes Comportamentais Padronizados:

ESQUIVA INIBITÓRIA (EI): Esta tarefa comportamental foi realizada em uma caixa de condicionamento automatizada (Fabricação: Albarsch), com dimensões 50 X 25 X 25 cm (comprimento : largura : altura). A parede frontal é de vidro, transparente, através do qual se observa o animal. O assoalho é uma grade de barras de bronze de 1 mm de diâmetro cada, espaçadas 1 cm uma das outras. Nesta grade aplica-se uma diferença de potencial elétrico, obtendo-se, conseqüentemente, uma corrente elétrica de 0,2-1,0 mA, conforme o desejado. No lado esquerdo desse assoalho, há uma plataforma de madeira aglomerada revestida com fórmica, estendendo-se por toda a largura da caixa (25 cm), com 5 cm de altura e 8 cm de comprimento. Na sessão de treino, o animal foi cuidadosamente colocado sobre a plataforma, de frente para o canto posterior esquerdo da caixa. O tempo que o animal levou para descer com as quatro patas na grade de bronze é cronometrado (latência de descida). Neste momento, o animal recebe choques elétricos nas patas, de forma intermitente (de 1 segundo cada), de intensidade igual a 0,5 mA (60 Hz). Na sessão de teste, 24 horas após o treino, o animal foi

recolocado na caixa de condicionamento, sobre a plataforma, e a latência de descida foi medida novamente, sem que se aplicassem choques nas patas. Um "teto" de 180 segundos foi imposto à duração desta sessão. A diferença nas latências teste-treino é tomada como uma medida de memória e referida nos gráficos como escore de retenção (Izquierdo et al, 1997).

CONDICIONAMENTO AVERSIVO AO CONTEXTO (CAC): a tarefa de condicionamento aversivo ao contexto apresenta um componente mais aversivo que a esQUIVA INIBITÓRIA. Entretanto, é utilizada a mesma caixa de condicionamento da esQUIVA INIBITÓRIA, porém sem a plataforma e com as dimensões reduzidas para 25 cm². A tarefa envolveu um treino em que o rato foi colocado dentro da caixa sobre as barras metálicas e, após 2 minutos e trinta segundos de exploração, foi aplicada dois choques inescapáveis de 0,5 mA por dois segundos; após mais 30 segundos de exploração, foi aplicada uma segunda sessão de choques de mesma intensidade e duração; o rato foi retirado da caixa 1 minuto após a segunda sessão de choques. O teste da tarefa ocorreu 24 horas após o treino, ou 24 após uma reativação (uma sessão de teste de 3 minutos ou 20 minutos) e as respostas de medo condicionado expressas sob forma de congelamentos ("freezings") são registradas sob forma de intervalos de tempos de permanência nesse padrão de comportamento num período total de 4 minutos de teste da tarefa. Os experimentos que visavam o estudo dos processos de consolidação ou evocação da memória dessa tarefa apresentavam apenas uma sessão de treino com um teste (4 minutos) 24 horas após. Porém, no estudo da reconsolidação, 24 horas após o treino ocorreu uma reativação de 3 minutos e o teste (4 minutos) da tarefa ocorreu 24 horas após a reativação e um reteste (4 minutos) ocorreu, ainda, cinco dias após o



Figura 5 – Vista geral da caixa automatizada utilizada no experimento de Esquiva Inibitória.



Figura 6 – vista geral do aparato utilizado na tarefa de Condicionamento Aversivo Contextual (CAC).

primeiro teste. Por fim, no estudo da extinção, 24 horas após o treino ocorreu uma reativação de 20 minutos e 24 horas após ocorreu o teste da tarefa.

Análise Estatística:

Os dados referentes às latências da esQUIVA inibitória necessitaram passar por um teste de “normalidade” (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors). Constatando a existência de dados não-paramétricos, as diferenças entre os grupos são avaliadas pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis com teste “post hoc” de Dunn para múltiplos grupos, ou teste U de Mann-Whitney para comparar dois grupos. A comparação entre treino e teste dentro de um mesmo grupo era feita com o teste Wilcoxon.

Dados paramétricos são analisados por teste T de Student para medidas pareadas independentes e ANOVA de uma via para múltiplos grupos com teste “post hoc” de Tukey

RESULTADOS

- Resultados referentes ao objetivo geral 1:

MT3 (2,0 µg/lado) e escopolamina (2,0 µg/lado e 10,0 µg/lado) infundidos no hipocampo dorsal imediatamente após treino:

Neste trabalho (figura 7) verificamos que os grupos infundido com MT3 e escopolamina (10,0 µg/lado) intra-hipocampal imediatamente após o treino da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto mostraram uma redução no tempo total de respostas de congelamento no teste ocorrido 24 horas após o treino em comparação ao grupo controle (P=0,001, ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

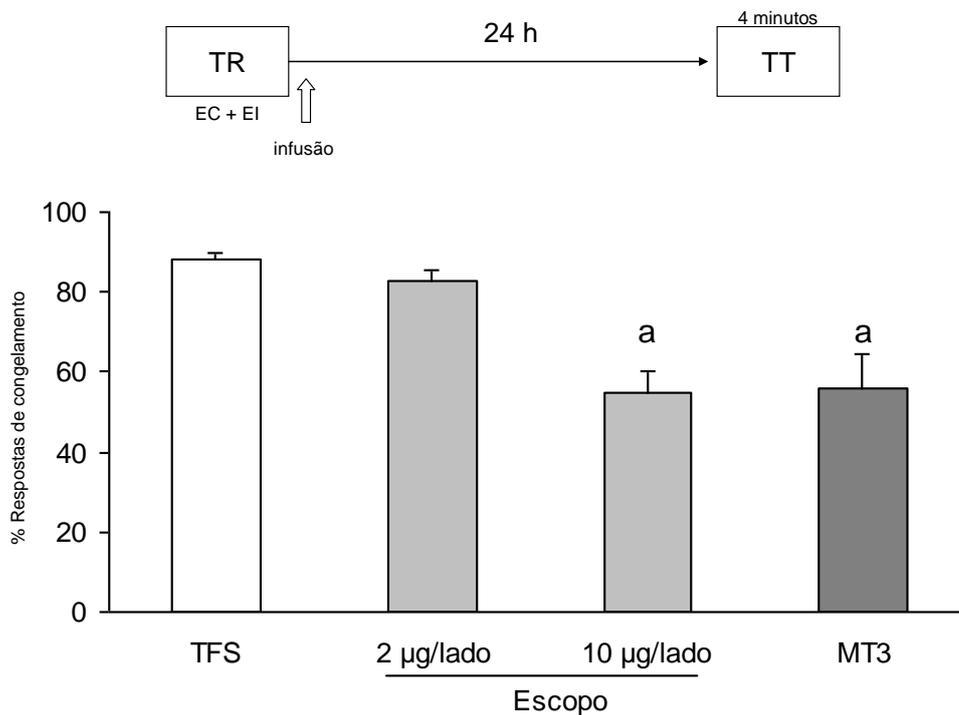


Figura 7: Escopolamina e MT3 infundidos no hipocampo pós-treino de CAC. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle (TFS) (P=0,001, ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). Ns=9, 13, 10 e 13 para grupos TFS, escopolamina (2 e 10 µg/lado) e MT3, respectivamente.

MT3 (2,0 µg/lado) e escopolamina (10,0 µg/lado) infundidos no hipocampo dorsal 20 minutos pré-teste:

Neste trabalho (Figura 8) verificamos que somente o grupo infundido com a MT3 intra-hipocampal pré-teste da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto mostrou um aumento no tempo total de respostas de congelamento no teste da tarefa ocorrido 24 horas após o treino em comparação com o grupo controle (P=0,023, ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

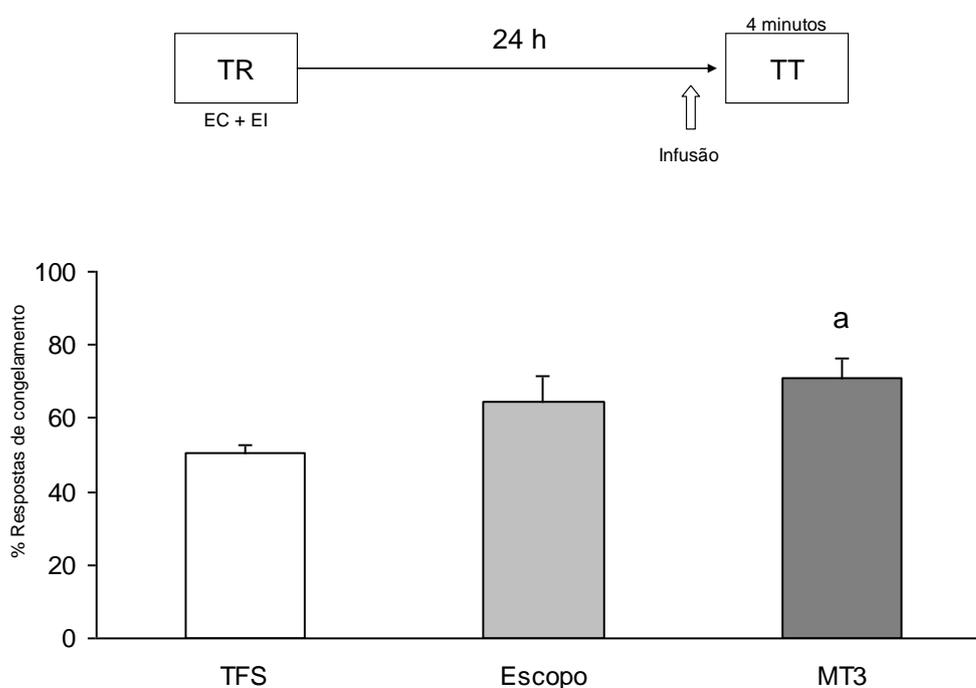


Figura 8: Escopolamina e MT3 infundidos no hipocampo pré-teste de CAC. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle (TFS) (P=0,023, ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey). Ns=11, 10 e 9 para grupos TFS, escopolamina e MT3, respectivamente.

MT3 (2,0 µg/lado) e escopolamina (10,0 µg/lado) infundidos no hipocampo dorsal imediatamente após uma reativação de três minutos:

Neste trabalho (Figura 9) verificamos que a administração intra-hipocampal de MT3 imediatamente após uma reativação curta (3 minutos) da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto aumenta o tempo total de respostas de congelamento no “teste 1” realizado 24 horas após a reativação em comparação com o grupo controle (P=0,003, ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey). Esse efeito permanece, também, no “teste 2” realizado cinco dias após o “teste 1” (P=0,005, ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

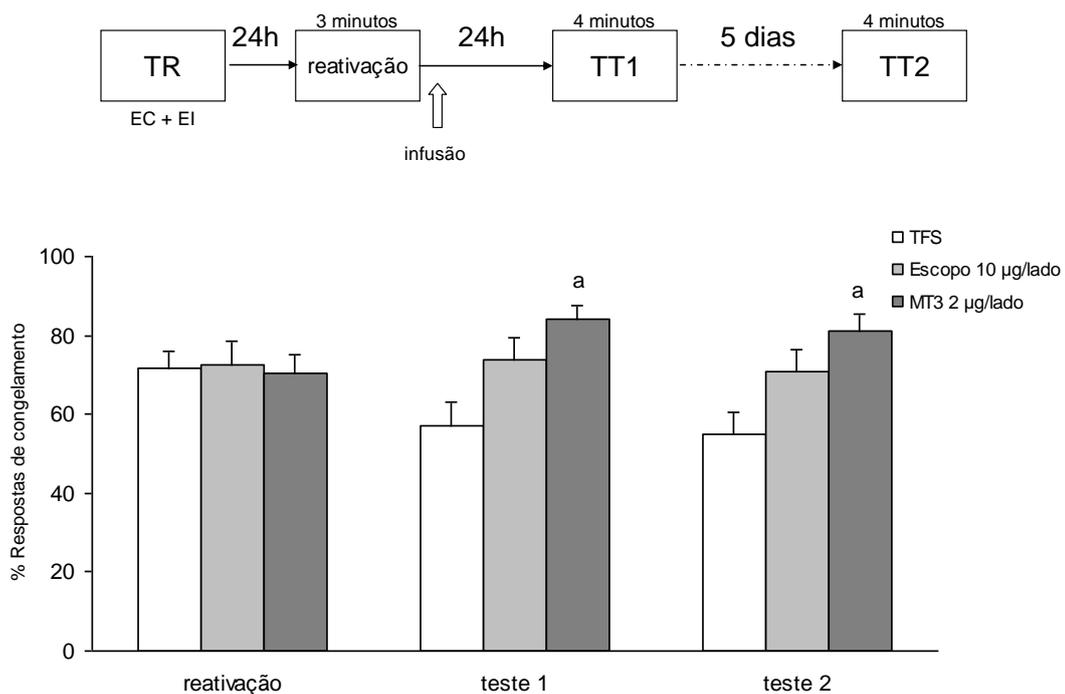


Figura 9: Escopolamina e MT3 infundidos no hipocampo pós-reativação de CAC. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle (TFS) (P<0,05, ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey Ns=11, 10 e 11 para grupos TFS, escopolamina e MT3, respectivamente).

MT3 (2,0 µg/lado) e escopolamina (10,0 µg/lado) infundidos no hipocampo dorsal imediatamente após uma reativação de 25 minutos:

Neste trabalho (Figura 10) verificamos que a administração intra-hipocampal de MT3 imediatamente após a reativação longa (25 minutos) da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto aumenta o tempo total de respostas de congelamento no teste realizado 24 horas após a reativação em comparação com o grupo controle (P=0,011, ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey). O teste ANOVA de medidas repetidas revelou uma diferença significativa entre o início e o final da reativação de 25 minutos em todos os grupos (P=0,000). Entretanto, mostrou que todos os grupos apresentavam o mesmo nível de congelamento durante a reativação (P>0,05). Além disso, o grupo controle mostrou uma diminuição significativa das respostas de congelamento na sessão de teste comparado os primeiros 4 minutos da sessão de reativação (Teste T pareado, P=0,005). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

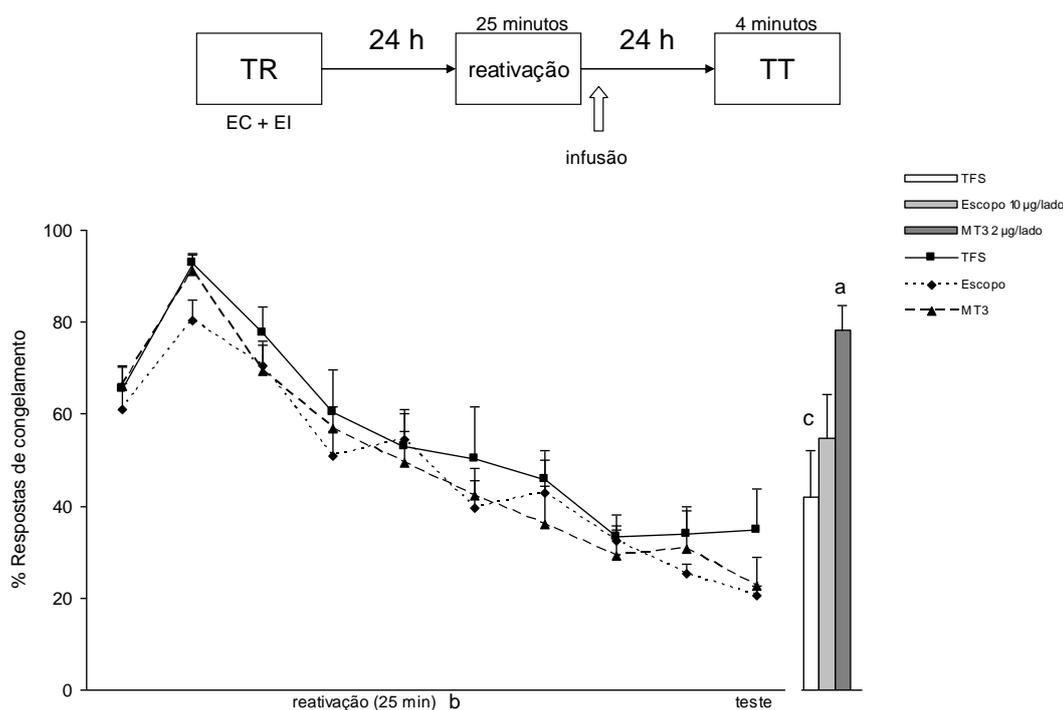


Figura 10: Escopolamina e MT3 infundidos no hipocampo pós-reativação (25 minutos) de CAC. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle (TFS); (b) diferença significativa entre o início e o final da sessão de reativação; (c) diferença significativa em relação ao início da reativação. Ns=9, 10 e 12 para grupos TFS, escopolamina e MT3, respectivamente.

MT3 (2,0 µg/lado) infundida no hipocampo dorsal 20 minutos antes do teste 24 horas após uma reativação de 25 minutos:

Neste trabalho (Figura 11) verificamos que a administração intra-hipocampal de MT3 24 horas após a reativação longa (25 minutos) 20 minutos pré-teste da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto aumenta o tempo total de respostas de congelamento no teste em comparação com o grupo controle (P=0,001, ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey). O teste T pareado revelou uma diferença significativa entre o início e o final da reativação de 25 minutos em todos os grupos (P=0,000). Entretanto, mostrou que todos os grupos apresentavam o mesmo nível de congelamento durante a reativação (P>0,05). Além disso, o grupo controle mostrou uma diminuição significativa das respostas de congelamento na sessão de teste comparado os primeiros 4 minutos da sessão de reativação (Teste T pareado, P=0,001). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

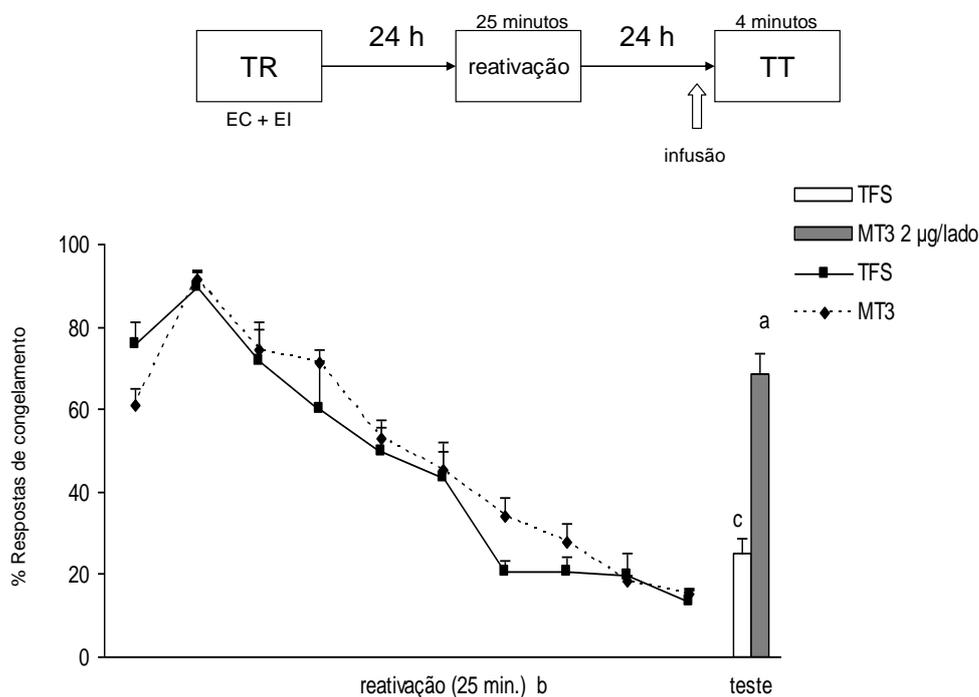


Figura 11: MT3 infundida no hipocampo pré-teste 24 h após a reativação de CAC. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle (TFS); (b) diferença significativa entre o início e o final da sessão de reativação; (c) diferença significativa em relação ao início da reativação. Ns=12, 9 para os grupos TFS e MT3, respectivamente.

MT3 (2,0 µg/lado) e da escopolamina (10,0 µg/lado) infundidos no hipocampo dorsal 24 horas após o treino sem a reativação:

Neste trabalho (Figura 12) verificamos que a administração intra-hipocampal de MT3 e de escopolamina não tem qualquer efeito quando infundidas 24 horas após o treino omitindo a reativação (P=0,790, ANOVA de uma via). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

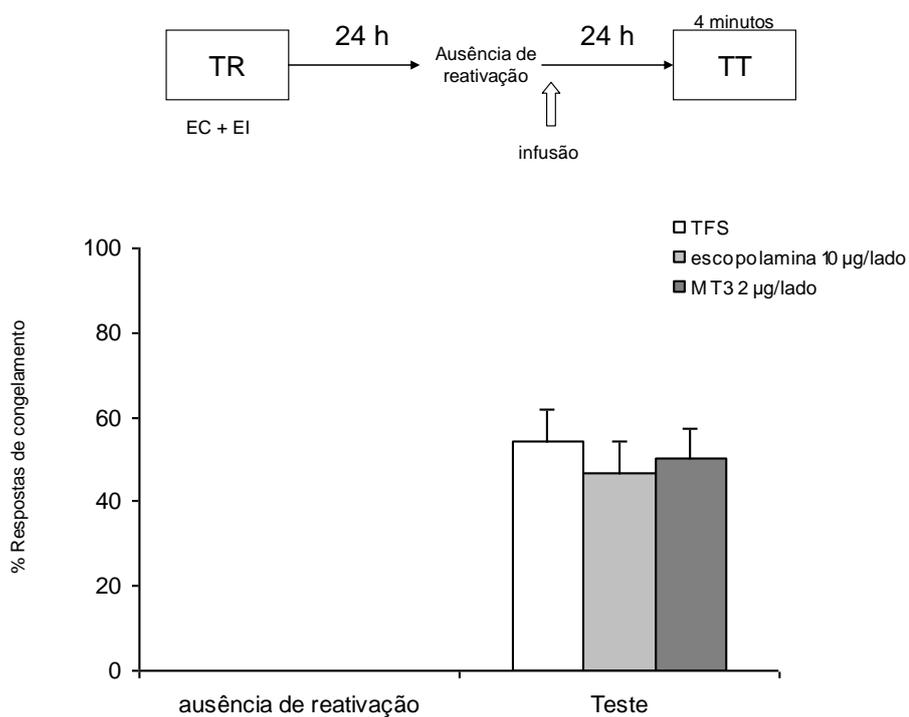


Figura 12: Escopolamina e MT3 infundidos no hipocampo 24 horas após o treino sem a reativação de CAC. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Ns=9, 9 e 8 para grupos TFS, escopolamina e MT3, respectivamente.

- resultados referentes ao objetivo geral 2:

MT3 (1,3 µg/lado) e escopolamina (6,0 µg/lado) infundidos intra-amígdala basolateral imediatamente pós-treino:

Neste trabalho (Figura 13) verificamos que os grupos infundidos com MT3 e escopolamina intra-amígdala imediatamente após o treino da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto mostraram uma redução no tempo total de respostas de congelamento no teste ocorrido 24 horas após o treino em comparação ao grupo controle (P=0,001, Teste ANOVA de uma via com post hoc de Tukey - P=0,002 e P=0,013 para grupos escopolamina e MT3 comparados com o controle, respectivamente). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

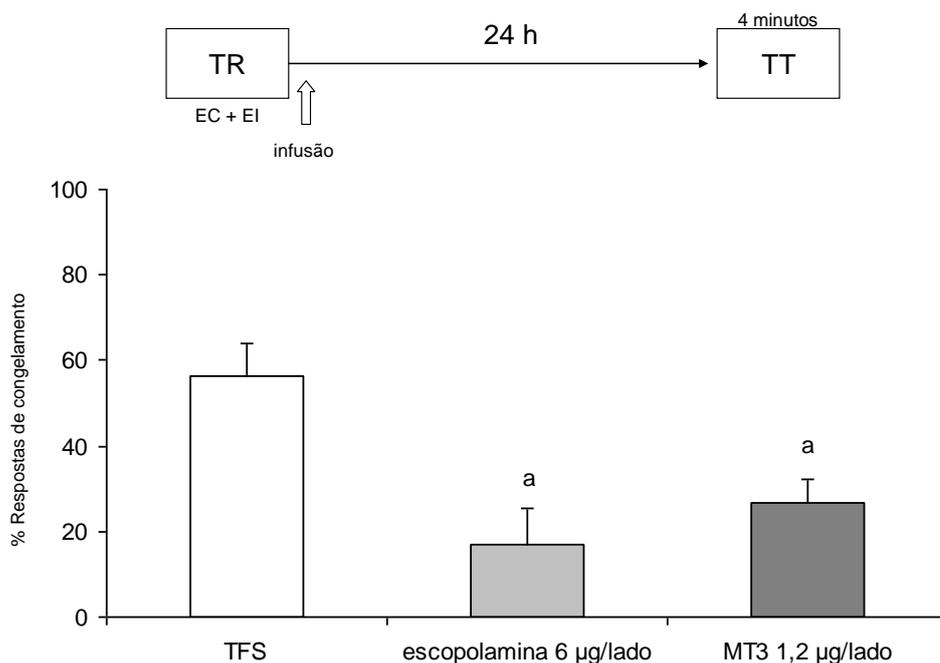


Figura 13: Escopolamina e MT3 infundidos na amígdala pós-treino de CAC. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle (TFS) (P=0,001, Teste ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). Ns=13, 9 e 11 para grupos TFS, escopolamina e MT3, respectivamente.

MT3 (1,3 µg/lado) e escopolamina (6,0 µg/lado) infundidos intra-amígdala basolateral imediatamente após a reativação de 3 minutos:

Neste trabalho (Figura 14) verificamos que somente a administração intra-amígdala de MT3 imediatamente após uma reativação curta (3 minutos) da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto diminui o tempo total de respostas de congelamento no “teste 1” realizado 24 horas após a reativação em comparação com o grupo controle (P=0,047, Teste ANOVA de uma via com post hoc de Tukey - P=0,215 e P=0,048 para grupos escopolamina e MT3 comparados com o controle, respectivamente). Esse efeito permanece, também, no “teste 2” realizado cinco dias após o “teste 1” (P=0,005, Teste ANOVA de uma via com post hoc de Tukey - P=0,072 e P=0,005 para grupos escopolamina e MT3 comparados com o controle, respectivamente). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

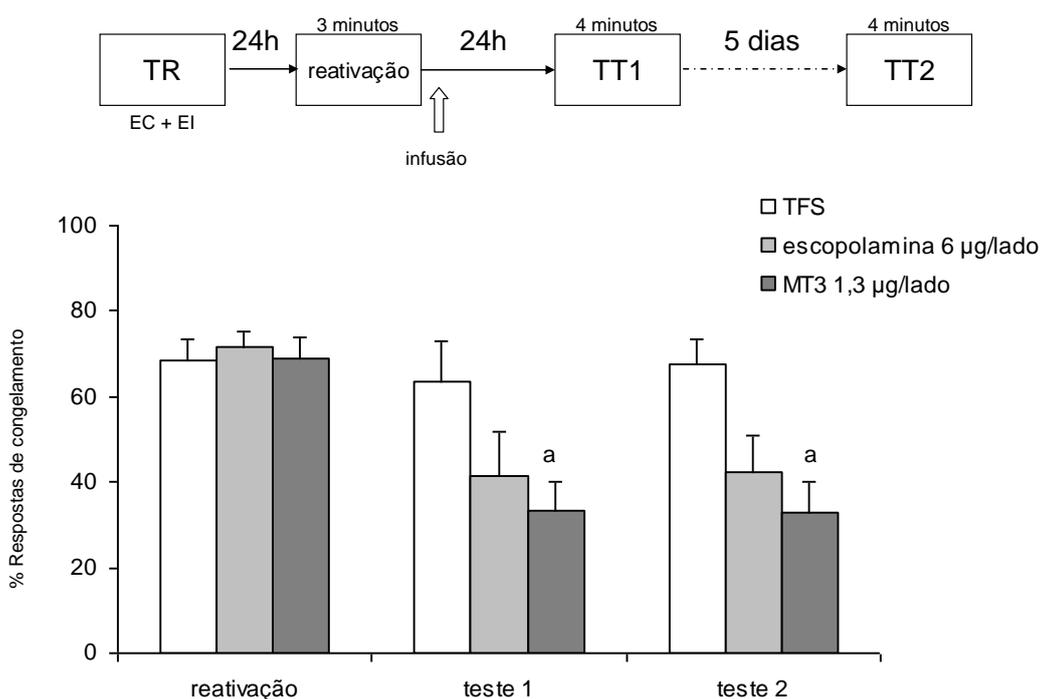


Figura 14: Escopolamina e MT3 infundidos na amígdala após a reativação (3 minutos). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. (a) diferença significativa em relação ao grupo controle (TFS) (P<0,05 Teste ANOVA de uma via com post hoc de Tukey. Ns=9, 9 e 8 para grupos TFS, escopolamina e MT3, respectivamente).

MT3 (1,3 µg/lado) e escopolamina (6,0 µg/lado) infundidos intra-amígdala basolateral 24 horas após o treino, mas sem a reativação:

Neste trabalho (Figura 15) verificamos que a administração intra-amígdala basolateral de MT3 e de escopolamina não tem qualquer efeito quando infundidas 24 horas após o treino omitindo a reativação ($P=0,776$, ANOVA de uma via). O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

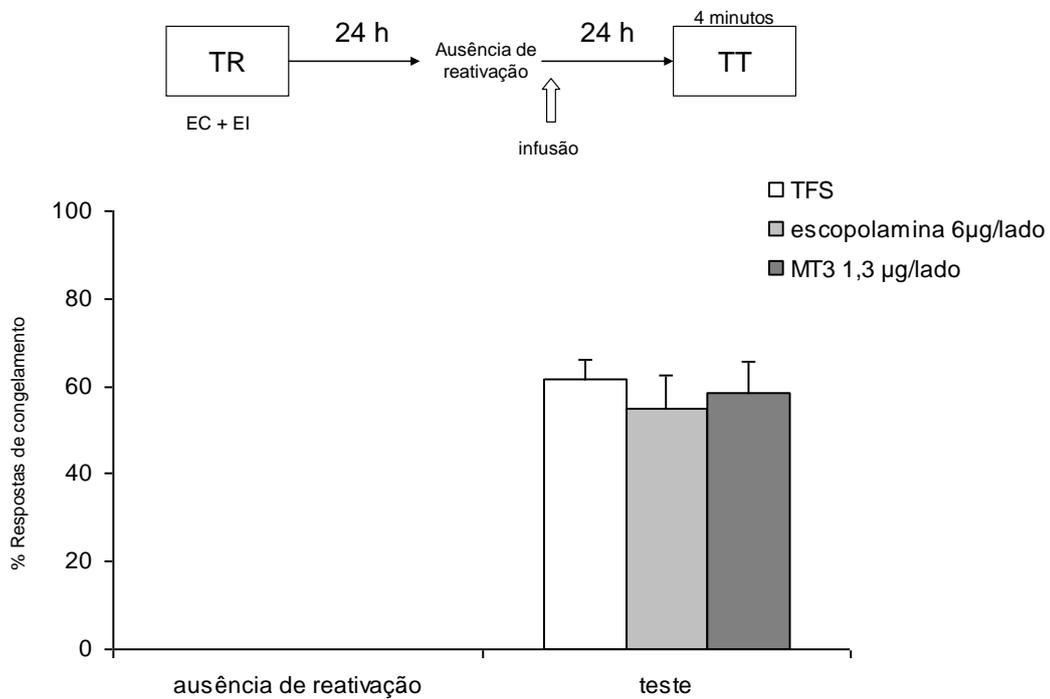


Figura 15: Escopolamina e MT3 infundidos na amígdala 24 horas após o treino sem a reativação de CAC. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. $N_s=6, 5$ e 5 para grupos TFS, escopolamina e MT3, respectivamente.

- resultados referentes ao objetivo geral 3:

MT3 infundida no hipocampo dorsal imediatamente após o treino de esquila inibitória (Figura 16):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de MT3 (2,0 µg/lado) imediatamente após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,648$, possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,018$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

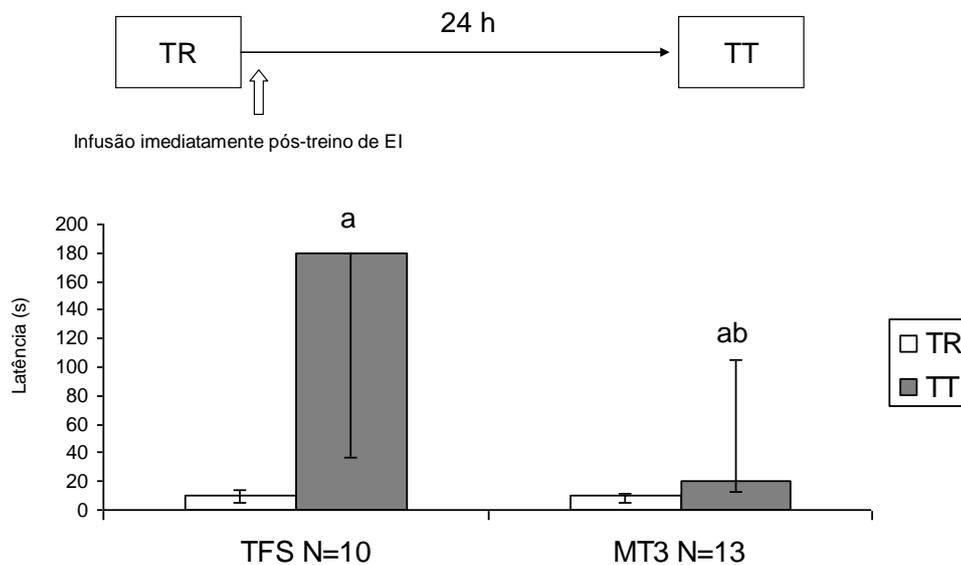


Figura 16: MT3 infundida no hipocampo imediatamente após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino; (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle.

MT3 infundida 45 minutos após o treino de esquiiva inibitória (Figura 17):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de MT3 (2 µg/lado) 45 minutos após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,693$, possibilitando a comparação entre os grupos. Também não houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,446$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

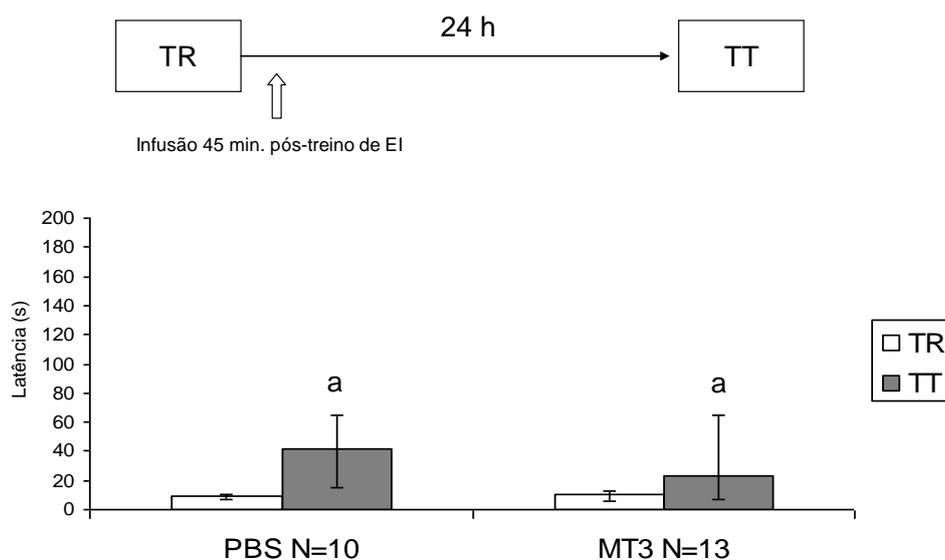


Figura 17: MT3 infundida no hipocampo 45 minutos após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino.

MT3 infundida 90 minutos após o treino de esquiiva inibitória (Figura 18):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de MT3 (2 µg/lado) 90 minutos após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,230$, possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,044$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

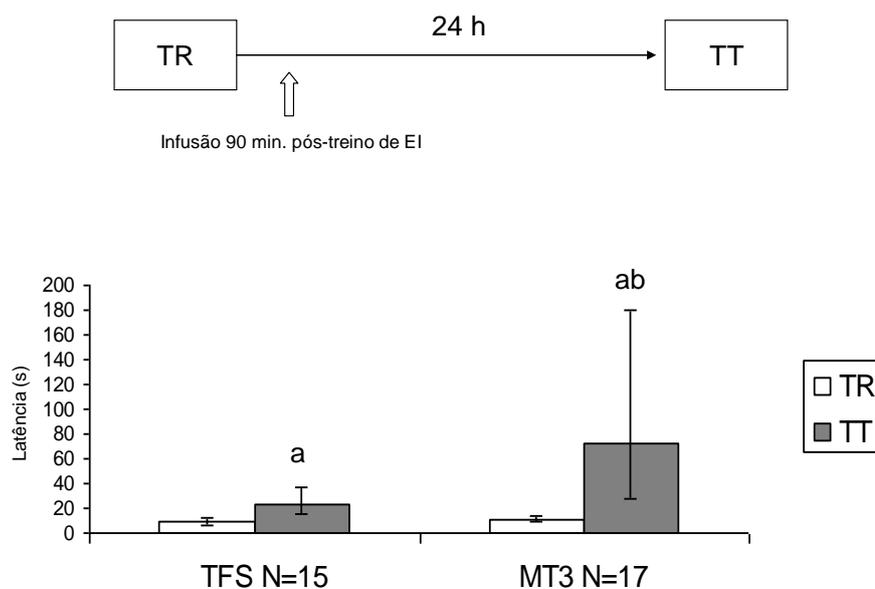


Figura 18: MT3 infundida no hipocampo 90 minutos após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino; (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle.

MT3 infundida 180 minutos após o treino de esquiiva inibitória (Figura 19):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de MT3 (2 μ g/lado) 180 minutos após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,830$, possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,014$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

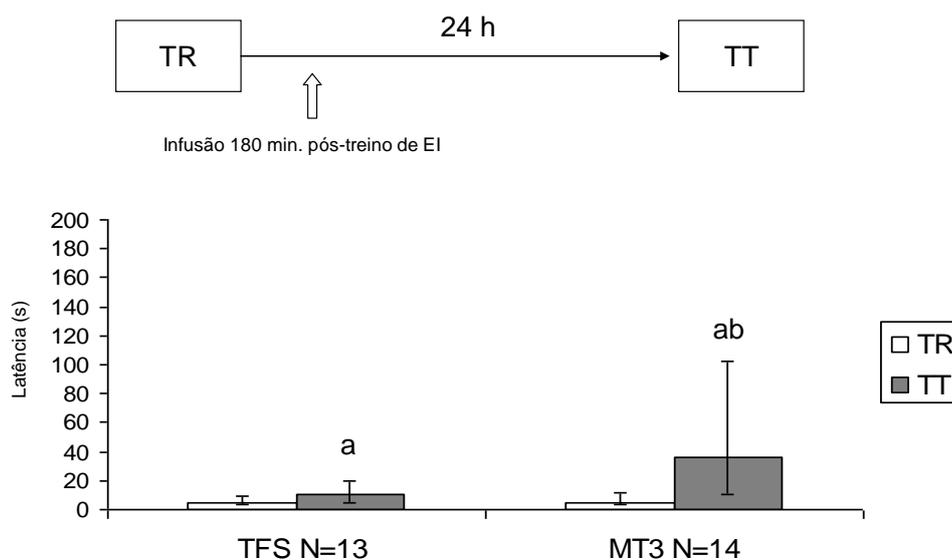


Figura 19: MT3 infundida no hipocampo 180 minutos após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino; (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle.

MT3 infundida 360 minutos após o treino de esquiiva inibitória (Figura 20):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de MT3 (2 μ g/lado) 360 minutos após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,695$, possibilitando a comparação entre os grupos. Também não houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,608$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

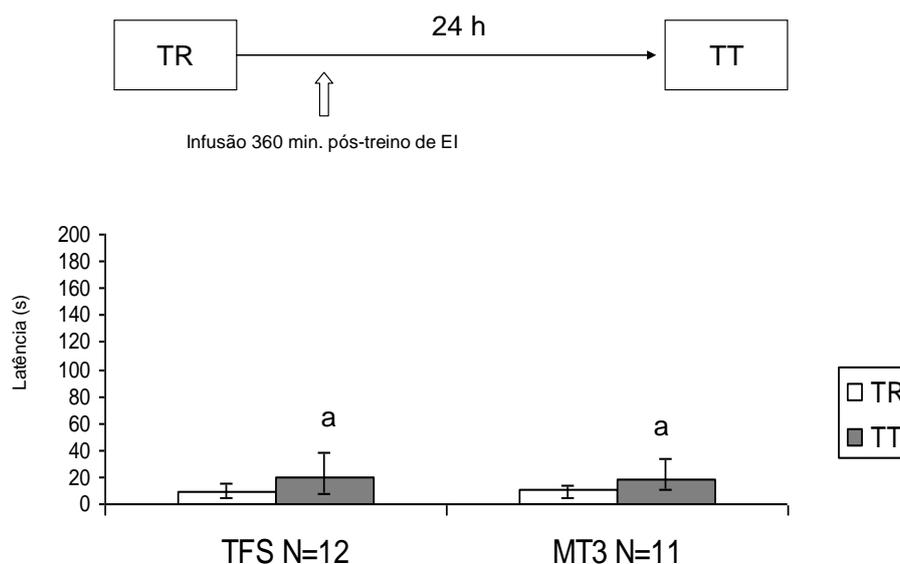


Figura 20: MT3 infundida no hipocampo 360 minutos após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino.

Escopolamina infundida imediatamente após o treino de esquiva inibitória (Figura 21):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de escopolamina (2 μ g/lado) imediatamente após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,974$, possibilitando a comparação entre os grupos. Também não houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,628$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

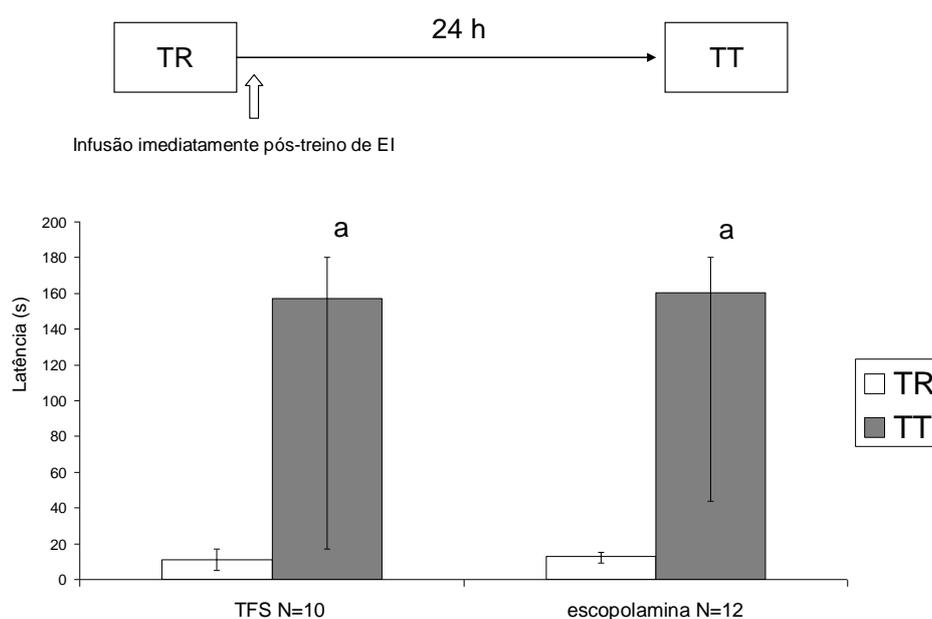


Figura 21: Escopolamina infundida no hipocampo imediatamente após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino.

Escopolamina infundida 90 minutos após o treino de esquiiva inibitória (Figura 22):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de escopolamina (2 μ g/lado) 180 minutos após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significante no desempenho no treino, $P=0,552$, possibilitando a comparação entre os grupos. Também não houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,710$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

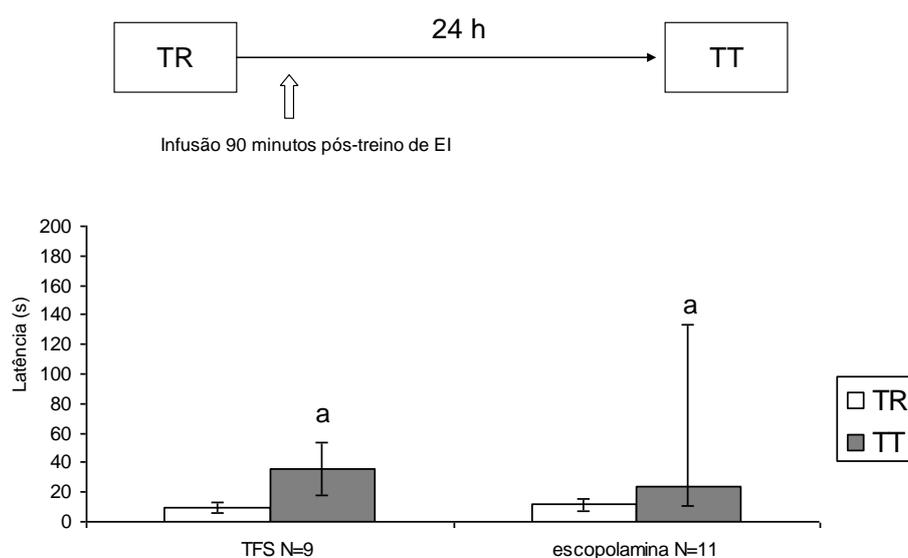


Figura 22: Escopolamina infundida no hipocampo 90 minutos após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino.

Escopolamina infundida 180 minutos após o treino de esquiva inibitória (Figura 23):

O grupo que recebeu a infusão intra-hipocampal de escopolamina (2 μ g/lado) 180 minutos após o treino e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,786$, possibilitando a comparação entre os grupos. Também não houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste, $P=0,740$ (Teste U de Mann-Whitney). O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (Teste de Wilcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

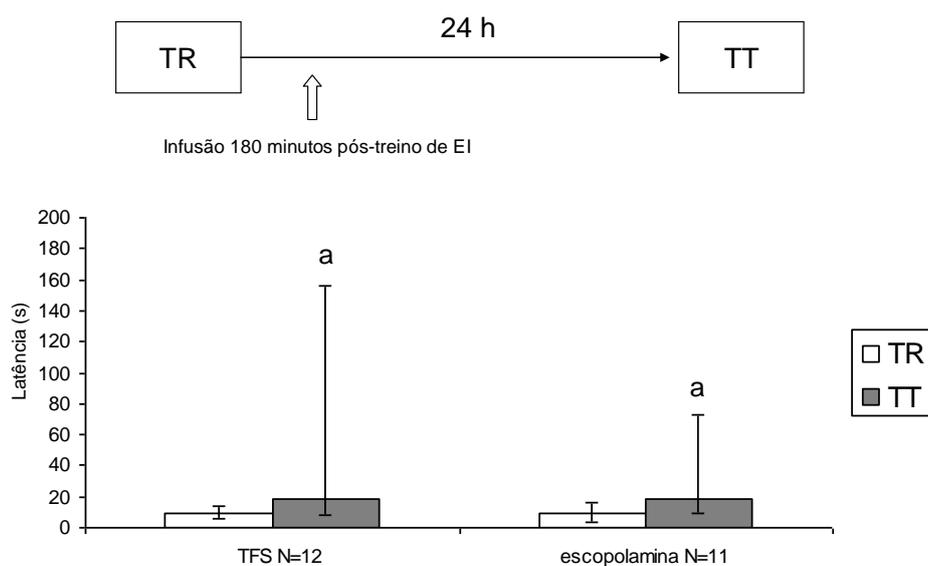


Figura 23: Escopolamina infundida no hipocampo 180 minutos após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino.

- Resultados referentes ao objetivo geral 4:

DRB (inibidor de transcrição gênica) intra-hipocampal infundido imediatamente após o treino de esQUIVA inibitória (Figura 24):

Os grupos que receberam as doses (0,4 e 2,0 ng/lado) de DRB pós-treino intra-hipocampal e o respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino, $P=0,189$, possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e, pelo menos, em um dos grupos que receberam DRB no desempenho do teste, $P=0,004$ (teste de Kruskal-Wallis). O teste “post hoc” de Dunn indicou que apenas o grupo infundido com a dose de 2,0 ng por lado teve um desempenho diferente do grupo controle ($P<0,05$), demonstrando o efeito amnésico dessa dose de droga. O desempenho no teste dos grupos que receberam alguma dose do fármaco e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (teste de Willcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

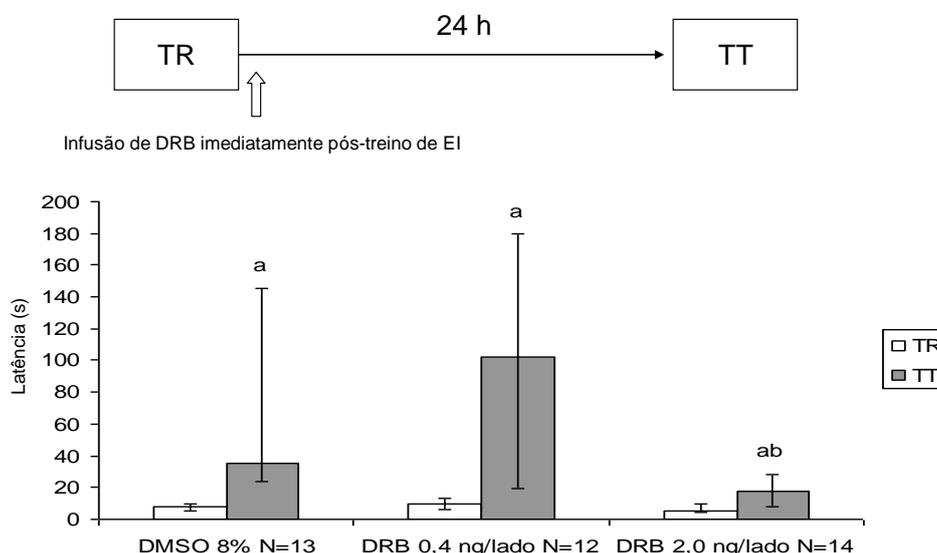


Figura 24: DRB infundida no hipocampo imediatamente após o treino de EI. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino; (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle.

DRB (dose sem efeito próprio) imediatamente pós-treino e MT3 2,0 µg/lado 20 minutos pré-teste (Figura 25):

Neste trabalho demonstramos a reversão do efeito facilitatório da MT3 (2,0 µg/lado) pré-teste de esQUIVA inibitória com a administração imediatamente pós-treino de uma dose sem efeito próprio de DRB (0,4 ng/lado). Pelo menos uma dos grupos mostrou um desempenho estatisticamente diferente na sessão de teste ($P=0,022$, teste de Kruskal-Wallis). O teste “post hoc” de Dunn mostrou que somente o grupo infundido com o veículo do DRB (DMSO 8%) imediatamente pós-treino e a MT3 pré-teste foi facilitatória ($P<0,05$); os demais grupos que receberam DRB (0,4 ng/lado) pós-treino + TFS pré-teste e DRB pós-treino + MT3 pré-teste não diferiram do grupo controle (DMSO 8% pós-treino + TFS pré-teste). O desempenho no teste de todos os grupos foi significativamente melhor do que o desempenho no treino, $P<0,05$ (teste de Willcoxon), confirmando a retenção da tarefa em todos os grupos. O diagrama esquemático abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado.

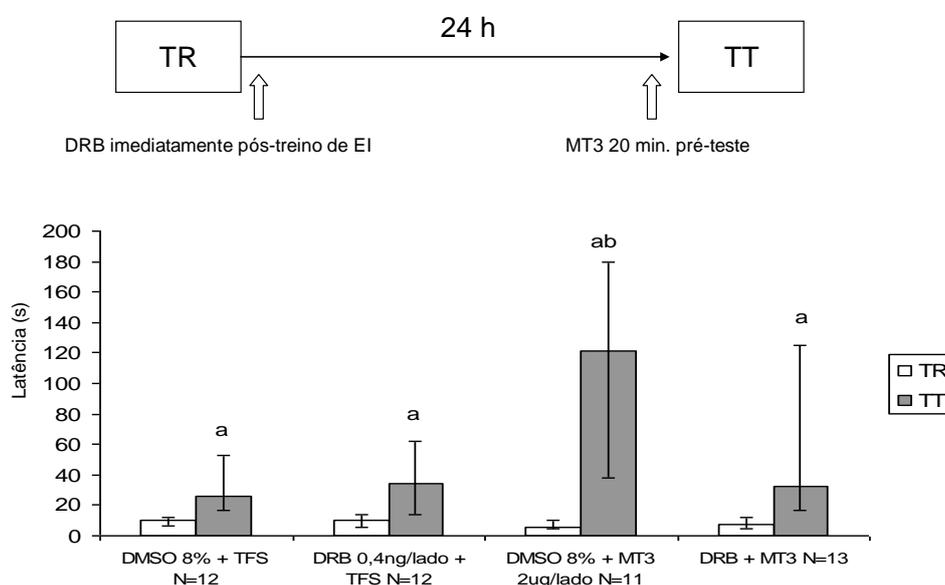


Figura 25: DRB infundida no hipocampo imediatamente após o treino de EI e MT3 pré-teste. Os dados estão expressos em medianas e intervalos interquartis. (a) Diferença significativa em relação ao treino; (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle.

DISCUSSÃO

O sistema colinérgico muscarínico é essencialmente modulatório, o que evidencia sua ação sobre várias funções corporais, entre elas a função cognitiva (Kandel et al., 2000). Nessa função a modulação colinérgica pode ser expressa por vias colinérgicas extrínsecas que agem sobre os neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos em estruturas importantes para o aprendizado e a memória, como a formação hipocampal e o neocórtex (Segal & Auebach, 1997). Pode ser expressa, também, em vias intrínsecas de interneurônios colinérgicos no sistema límbico; outra possibilidade é a da expressão de heterorreceptores muscarínicos em sistemas “efetores”, o que parece ser muito importante para o aprendizado e memória; parece ser o caso dos receptores M2 e M4, que são pré-sinápticos em neurônios glutamatérgicos na via perforante medial, uma via de entrada ao hipocampo (Rouse et al., 1999; Van der Zee & Luyten, 1999). Esses receptores apresentam uma função inibitória, pois estão normalmente acoplados à proteína Gi/Go, conhecida por inibir a adenilil ciclase, o que diminui a produção do AMPc. A atividade modulatória inibitória desses receptores no terminal pré-sináptico pode se dar através da ativação de canais de K^+ , que promovem a hiperpolarização da célula, não permitindo, assim, a abertura de canais de Ca^{++} dependentes de voltagem, que levam à liberação de neurotransmissores como o GABA ou o glutamato (Taylor & Brown, 1999).

A fim de investigar o papel modulatório dos receptores colinérgicos muscarínicos sobre as diferentes fases da memória (Pedreira e Maldonado, 2003; Debiec e LeDoux, 2004; Dudai, 2004; Boccia et al., 2007; De Oliveira Alvares et al., 2008) – consolidação, evocação, reconsolidação ou extinção, ratos foram treinados na tarefa de Condicionamento Aversivo Contextual (CAC), uma tarefa dependente de hipocampo e amígdala com um forte componente aversivo e com uma aprendizagem

que pode ser adquirida com uma única sessão de treino. Trata-se de um condicionamento pavloviano onde, no treino, um estímulo condicionado (EC, caixa de contexto) é pareado com um estímulo incondicionado (EI, choques nas patas) para produzir, num teste (reativação) subsequente, uma resposta de medo condicionada (respostas de congelamento, “freezing”) (Bustos et al., 2006; 2009). Os fármacos utilizados foram: MT3, antagonista 214 vezes mais seletiva aos receptores M4 que aos receptores M1, o que faz dessa toxina a melhor ferramenta farmacológica para o estudo desse subsistema de receptores; escopolamina, antagonista colinérgico muscarínico inespecífico aos diversos subtipos de receptores (Jerusalinsky et al., 1997; 1998).

Os experimentos realizados na tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto com a infusão intra-hipocampal de MT3 corroboram com os dados encontrados anteriormente na tarefa de esquiava inibitória. A MT3 e a escopolamina (10 µg/lado) administradas no hipocampo dorsal imediatamente após o treino do condicionamento ao medo mostraram também ter um efeito amnésico sobre a consolidação dessa tarefa aversiva, pois claramente causou uma diminuição na quantidade de respostas de congelamento. Este resultado está de acordo com os achados prévios da literatura (Izquierdo et al., 1992) e se associa á observação clássica de que a administração sistêmica ou central de drogas anticolinérgicas, ou de lesões nos núcleos ou nas vias colinérgicas, tem efeitos deletérios à consolidação da memória (Winkler et al., 1995; Van der Zee e Luiten, 1999; Anagnostaras et al., 1999; 2003; Power et al., 2003). Em uma recente colaboração do nosso laboratório, foi demonstrado que a infusão de escopolamina ou MT3, em concentrações similares as usadas nesse trabalho, foi capaz de inibir a indução de potenciação de longa duração em fatias de hipocampo (Sánchez et al., 2009b). A participação dos receptores M1 no processo de consolidação, evidenciada pelo efeito da escopolamina, é bem descrito na literatura (Izquierdo et al., 1992;

Jerusalinsky et al., 1998; Ferreira et al., 2003). O nosso trabalho sustenta a idéia de um papel modulatório positivo do sistema colinérgico muscarínico (receptores M1 e M4) hipocampal sobre a consolidação da memória.

Entretanto, somente a MT3 intra-hipocampal administrada 20 minutos antes do teste da tarefa de CAC, a MT3 causou um aumento das respostas de congelamento, mostrando, então, um efeito facilitatório sobre a evocação dessa tarefa. Este efeito, contudo, é consistente com um resultado anterior em que a mesma droga seletiva MT3 também foi facilitatória sobre a evocação da memória aversiva da tarefa de Esquiva Inibitória (EI) (Diehl et al., 2007). Estes resultados em conjunto apontam para um papel modulatório negativo do subsistema M4 muscarínico hipocampal sobre a evocação de memórias aversivas. A ausência de efeitos com a administração de MT3 após o treino (Ferreira et al., 2003) e antes do teste (Diehl et al., 2007) da tarefa habituação ao campo aberto mostrou em trabalhos anteriores que os componentes aversivos e estressores das tarefas são necessários ao recrutamento dos receptores M4 para a modulação da consolidação e da evocação. Além disso, a MT3 não causou qualquer prejuízo motor ou de ansiedade que poderiam interferir com os resultados encontrados com CAC ou EI.

Poucos trabalhos estão focados no estudo do papel da modulação colinérgica muscarínica sobre o processo de evocação. Eles geralmente mostram o efeito “clássico” de que antagonistas são amnésicos e que agonistas são facilitatórios, diferente do que é mostrado neste trabalho. Boccia et al. (2003), por exemplo, demonstrou um efeito amnésico do antagonista inespecífico atropina. Entretanto, a atropina foi infundida sistemicamente, e, nesse trabalho, não foi possível determinar que região encefálica foi responsável por esse efeito. A infusão na amígdala basolateral do agonista muscarínico inespecífico pilocarpina, porém, teve um efeito facilitatório sobre uma tarefa que media a evocação de um estado de dependência induzido por morfina (Rezayof et al., 2009).

Esse efeito facilitatório similar não pode ser comparável ao nosso trabalho, pois envolveu um agonista inespecífico infundido em uma estrutura diferente.

O único estudo comparável ao nosso foi realizado por Barros et al. (2001) que descreve, entre muitos outros resultados, um efeito amnésico da escopolamina (doses de 0,4 e 2,0 µg/lado) infundida no hipocampo dorsal 10 minutos antes do teste de esQUIVA inibitória. Desde que a dose de 2,0 µg/lado de escopolamina foi inefetiva ao nosso tratamento pós-treino, não foi feito um grupo tratado com esta dose mais baixa antes do teste de CAC, mesmo porque a dose mais alta (10,0 µg/lado) não teve qualquer efeito sobre a evocação de CAC. Esta discrepância entre os resultados pode ser devido a diferenças no tempo de administração da escopolamina pré-teste, uma vez que no nosso trabalho administramos o fármaco 20 minutos antes do teste, pois, num período mais curto entre infusão e teste da tarefa, parecia que o estresse causado pela a imobilização dos animais enquanto a droga era injetada atrapalhava o desempenho no teste (dados não publicados). Resultados contraditórios têm sido descritos algumas vezes por diferentes autores, pelo menos no que diz respeito às funções do hipocampo, isto pode se dever à diversidade de subtipos de receptores em múltiplas localizações nos neurônios e nas sinapses, além de diferenças nos tratamentos farmacológicos utilizados, principalmente, quanto a suas seletividades e locais onde são administrados (Parent e Baxter, 2004; Cobb e Davies, 2005).

O mesmo padrão de mudança de efeitos da MT3, amnésico na consolidação e facilitatório na evocação, foi observado em ambas as tarefas que apresentam em comum um forte componente aversivo, porém com respostas de aprendizagem diferentes. Podemos inferir, assim, que os mecanismos mnemônicos hipocampais são semelhantes no processamento de ambas as tarefas, pelo menos no que se refere ao papel modulatório do receptor M4.

Além disso, o nosso trabalho com a tarefa de condicionamento aversivo ao contexto extrapola nosso campo de estudo para além dos processos de consolidação e de evocação da memória (Bustos et al., 2006). Recentemente, tem sido postulado que a evocação não seria apenas um processo passível e conseqüente da consolidação. As descobertas mais recentes mostram que na evocação ocorrem eventos bioquímicos e de plasticidade sináptica que podem determinar quanto uma memória pode persistir e se transformar numa memória remota ou de longa duração armazenada de forma difusa e permanente no córtex (Misanin et al., 1968; Przybylski e Sara 1997; Sara, 2000; Nader et al., 2000; Debiec et al., 2002; Eisenberg et al., 2003; Pedreira e Maldonado, 2003; Debiec e LeDoux, 2004; Duvarci e Nader, 2004).

Muitas evidências mostram que após a evocação a memória de uma experiência pode ser novamente suscetível a interferências de diversos tipos de tratamentos, inclusive farmacológico. Após uma reativação (evocação), a memória pode seguir por dois caminhos antagônicos: a memória pode ser reconsolidada ou extinta (Nader et al., 2000; Debiec et al., 2002; Dudai e Eisenberg, 2004; Suzuki et al., 2004).

Na reconsolidação da memória são ativadas cascatas bioquímicas semelhantes às observadas durante a consolidação, sendo marcante a dependência de nova transcrição gênica em estruturas como o hipocampo e a amígdala, o que favorece a plasticidade sináptica e conseqüente armazenamento do traço de memória. A reconsolidação da memória após a evocação deve ser o mecanismo necessário para ocorrer a atualização ou incorporação de novas informações na formação de um memória de longa duração (Debiec et al., 2002; Pedreira e Maldonado, 2003; Suzuki et al., 2004; Boccia et al., 2004, 2007; Bouton, 2004; Bouton et al., 2006; Bustos et al., 2006; Myers e Davis, 2007; Tronson e Taylor, 2007; de Oliveira Alvares et al., 2008).

A tarefa de condicionamento aversivo é ideal para o estudo da reconsolidação e da extinção. Na sessão de treino dessa tarefa um estímulo condicionado (caixa de contexto) é pareado com um estímulo incondicionado (choque nas patas). Quando colocado de volta no contexto de treino, o animal mostra respostas de medo condicionadas, como o congelamento (Bustos et al., 2006). Breves exposições ao contexto parecem engatilhar uma segunda onda de consolidação da memória (reconsolidação), enquanto que uma exposição prolongada ao contexto leva a formação de uma nova memória (extinção), que compete com a memória original. Ou seja, a evocação pode iniciar dois processos dissociáveis e opostos: a reconsolidação que atua em estabilizar o traço, enquanto a extinção tende a enfraquecer a expressão da memória original com a diminuição das respostas de congelamento (Suzuki et al., 2004).

No nosso trabalho podemos verificar que a infusão intra-hipocampal de MT3 imediatamente após uma sessão de reativação curta (3 minutos) teve um evidente efeito facilitatório sobre a reconsolidação da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto. Portanto, os receptores M4 hipocampais, também, devem modular negativamente o processo de reconsolidação. Esse resultado demonstra, pelo menos no papel dos receptores M4 hipocampais, que os processos de consolidação e reconsolidação apresentam distintos processos modulatórios. Por outro lado, permanece inalterada a função modulatória entre os processos de evocação e reconsolidação dessa tarefa.

Este resultado está de acordo com recentes trabalhos publicados, que demonstraram os efeitos deletérios da infusão intra-cerebroventricular de hemicolinium, um inibidor específico da recaptção de colina da fenda sináptica, imediatamente após uma reativação da memória da tarefa de CAC. Demonstrando que o neurotransmissor acetilcolina é um importante modulador do processo de reconsolidação (Boccia et al., 2004; 2007).

Extinção da memória – quando um animal aprende que a apresentação de um estímulo condicionado não está mais precedida da ocorrência de um estímulo incondicionado – foi estudada em detalhes. Desde que é amplamente considerada como a aquisição de um traço novo e transiente, sem apagar o traço de medo condicionado original (Bouton, 2004; Bouton et al., 2006; Myers e Davis, 2007) é lógico introduzir os conceitos de consolidação da extinção e evocação da extinção (Quirk e Mueller, 2008; Duvarci et al., 2006; Lin et al., 2003; Santini et al., 2001). Os efeitos dos antagonistas muscarínicos foram investigados nestas duas situações, com a administração imediatamente após uma reativação de vinte e cinco minutos, ou antes do teste vinte e quatro horas após a reativação longa.

Somente a infusão de MT3 no hipocampo dorsal teve um efeito amnésico sobre a consolidação da extinção e também sobre a evocação da extinção. Demonstrando que os receptores M4 hipocampais modulam negativamente a extinção do condicionamento aversivo ao contexto. Em ambos os experimentos realizados com uma reativação de 25 minutos mostrou que uma única, porém, prolongada reexposição ao contexto de condicionamento sem a apresentação do estímulo incondicionado leva a gradual redução das respostas de medo (“freezing”) ao longo da sessão de reativação, resultando em extinção da memória (Suzuki et al., 2004; de Oliveira Alvares et al., 2008). O efeito amnésico do antagonista M4 é consistente com a facilitação encontrada com a infusão do agonista muscarínico inespecífico oxotremorina na amígdala basolateral sobre a consolidação da extinção (Boccia et al., 2009).

Um ponto interessante a ser ressaltado neste trabalho é que a MT3 apresentou efeitos contrários entre os processos de consolidação e evocação/reconsolidação da memória de CAC, isto sugere que mecanismos de plasticidade sináptica ocorrem durante a formação de uma memória aversiva no hipocampo modificando, assim, o

papel modulatório dos receptores M4 sobre essa memória. Essa modificação “plástica” do efeito da MT3 não ocorreu entre a consolidação e a evocação da extinção, demonstrando que o efeito da MT3 se deve a ela estar atuando mais nas vias que processam a memória de medo condicionada da tarefa de CAC, e que a formação do traço de extinção deve recrutar vias diferentes, assim como mecanismos moleculares próprios. Portanto, uma possibilidade é a de que o bloqueio seletivo dos receptores M4 hipocâmpais facilite a recuperação espontânea da memória original, porém este experimento precisa, ainda, ser realizado para elucidar esta questão.

Os efeitos da MT3 sobre os processos de reconsolidação e extinção só ocorreram devido os tratamentos farmacológicos terem sido feitos após uma sessão de reativação. Quando a reativação foi omitida não houve qualquer efeito de qualquer antagonista muscarínico infundido no hipocampo dorsal 24 horas após o treino, demonstrando que não há participação de receptores muscarínicos mesmo numa fase tardia do processo de consolidação.

Existem muitas evidências que sugerem a participação da amígdala basolateral na formação de memórias com fortes componentes aversivos (McGaugh, 2004; McGaugh e Roozendaal, 2002; Roozendaal, 2002). Além disso, a amígdala recebe muitas aferências colinérgicas provenientes do núcleo basalis de Meynert e, portanto, são importantes as influências modulatórias colinérgicas sobre o processamento da memória na amígdala (McGaugh, 2004). Nossos resultados, ainda, preliminares mostraram que a administração de MT3 ou escopolamina (mesmas concentrações utilizadas nos experimentos com infusão no hipocampo) na amígdala basolateral teve um efeito amnésico sobre os processos de consolidação. Resultado idêntico ao encontrado com a infusão no hipocampo, que evidencia um papel modulatório positivo dos receptores muscarínicos na amígdala basolateral, também.

Somente a MT3 intra-amígdala basolateral teve um efeito amnésico reconsolidação da memória da tarefa de condicionamento aversivo contextual, embora uma tendência a efeito amnésico tenha sido encontrada com a infusão de escopolamina. Entretanto parece necessário testar mais doses de escopolamina na amígdala, além aumentar o tamanho amostral dos grupos feitos até agora. Estes resultados mostraram um papel modulatório positivo dos receptores M4, também sobre o processo de reconsolidação.

É interessante observar que na amígdala a modulação desses receptores parece ser contrária ao hipocampo pelo menos sobre o processo de reconsolidação. Além disso, parece não haver na amígdala a mudança de efeitos da MT3 observada no hipocampo. As aferências colinérgicas são diferentes e separadas as duas estruturas e a citoarquitetura do hipocampo é diferente da amígdala, é possível, então, supor mecanismos modulatórios dos receptores muscarínicos, especialmente dos receptores M4, diferentes nas duas estruturas. Essa discrepância pode explicar um pouco das contradições de resultados encontrados na literatura, especialmente se for comparados tratamento sistêmicos com infusões em áreas específicas do encéfalo, como o hipocampo. Porém, nossos resultados são, ainda, preliminares e precisamos estender o nosso estudo para experimentos em esQUIVA INIBITÓRIA, bem como testar a MT3 infundida na amígdala basolateral na extinção da memória.

Trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram que os processos de consolidação e de evocação da memória da EsQUIVA INIBITÓRIA são fortemente modulados pela atividade de receptores colinérgicos muscarínicos do tipo M4. Os resultados obtidos com a infusão intra-hipocampal de antagonistas muscarínicos, especialmente com a MT3, mostram efeitos não apenas diferentes, mas *opostos* quando injetado imediatamente após o treino (no início da consolidação) e logo antes do teste

(na evocação da memória). Esta assimetria sugere a ocorrência de uma alteração plástica que modificaria a expressão de receptores M4 hipocampais em função do aprendizado (durante o processo de consolidação), e que fica evidente no momento da evocação, 24h após.

Para investigar a modulação colinérgica muscarínica em uma determinada fase do período de consolidação da memória foi utilizada a tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. Esta tarefa apresenta uma aprendizagem dependente do hipocampo e decorrente de um forte componente aversivo que é adquirida com uma única sessão de treino, o que a torna ideal para este tipo de investigação.

A administração de MT3, antagonista reversível seletivo para receptor M4, intra-hipocampal imediatamente após o treino da tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA teve um efeito amnésico no teste ocorrido 24 horas após. Isto indica, como já descrito anteriormente, que os receptores M4 hipocampais modulam positivamente a fase inicial do processo de consolidação.

Entretanto, quando MT3 foi infundida 45 minutos após o treino, este efeito amnésico já não foi mais constatado. Neste momento da consolidação, parece não ocorrer a modulação dos receptores M4. Porém, a MT3 administrada 90 e 180 minutos após o treino apresentou um efeito facilitatório, ou seja os receptores M4 modificaram sua função e passam a modular negativamente a consolidação da memória. É possível que no período que compreende a primeira hora do processo de consolidação os receptores muscarínicos M4 hipocampais sofram mecanismos neuroadaptativos que modificam sua modulação sobre a formação da memória. Portanto, os a ausência de efeito da MT3 aos 45 minutos talvez se deva a um período intermediário em que parte dos receptores M4 permanece numa disposição inicial e que a outra parte já esteja modificada.

A MT3 infundida 360 minutos após o treino não teve qualquer efeito sobre o processo de consolidação. Indicando que a consolidação não deve ser dependente da modulação dos receptores M4 na fase mais tardia. É sabido que no período de 6 a 8 horas após a aquisição a “maquinaria” celular envolvida na formação da memória é aquela responsável por modificações estruturais das sinapses, ou seja síntese de proteínas estruturais (Lamprecht e LeDoux, 2004), e não de cascatas de sinalização como as do receptor M4.

Por outro lado, a escopolamina, antagonista colinérgico muscarínico inespecífico, não teve qualquer efeito quando infundida imediatamente, 90 minutos, 180 minutos após o treino. Esse resultado indica que o sistema colinérgico muscarínico, quando tem seus receptores bloqueados indiscriminadamente, não participa de nenhuma das fases do processo de consolidação da memória da Esquiva Inibitória. Porém, outras intensidades de choque e doses de escopolamina precisam ser, ainda, analisados.

A modulação do subsistema M4 muscarínico é recrutada, pelo menos, durante as três primeiras horas do processo de consolidação. Porém, como são fundamentais desse processo os fenômenos de plasticidade sináptica, os receptores M4 hipocâmpais modificam precocemente as suas funções. Nossos resultados mostraram uma mudança na modulação do subsistema M4 muscarínico que ocorre em torno de duas horas após a aquisição sobre o processo de consolidação. Essa alteração parece permanecer até a evocação, onde a MT3 mantém o efeito facilitatório.

Uma propriedade que distingue memórias de longa duração de outros tipos de memória é a sua sensibilidade a inibidores de síntese proteica, o que ficou demonstrado com uso de fármacos bloqueadores da ARN polimerase II como o DRB ou a α -amanitina (Nader e Hardt, 2009). Durante processo de consolidação é necessária a transcrição de novas proteínas, como receptores de membrana, enzimas de sinalização

intracelular, proteínas do citoesqueleto, entre outras, para que ocorra o armazenamento de forma mais definitivo da memória (Lamprecht e LeDoux, 2004).

Como descrito também por Igáz et al (2002), nosso trabalho mostrou que a infusão intra-hipocampal imediatamente após o treino de Esquiva Inibitória do inibidor de síntese protéica DRB teve um evidente efeito amnésico sobre a consolidação da memória da tarefa. Demonstrando que nos momentos iniciais do processo é necessária a síntese de ADNm.

A reversão do efeito facilitatório da MT3 pré-teste através de uma infusão pós-treino de uma dose sem efeito próprio de DRB no hipocampo dorsal sugere que a mudança de efeito amnésico para facilitatório da MT3 seja dependente de síntese protéica. Portanto, a síntese de novas proteínas parece ser necessária entre os diferentes mecanismos envolvidos com a neuroadaptação da modulação dos receptores M4 hipocampais na formação da memória de longa duração da EI.

O efeito amnésico dos antagonistas colinérgicos muscarínicos menos seletivos (escopolamina) sobre o processo de consolidação da memória pode dever-se principalmente a sua ação inibitória sobre os receptores muscarínicos m1 excitatórios pós-sinápticos (Ferreira et al., 2003). Porém, a atividade da MT3 durante início da consolidação pode ser interpretada como ocorrendo em interneurônios GABAérgicos do hipocampo, onde a toxina inibiria a atividade do receptor M4, que, por sua vez, modularia negativamente a liberação do neurotransmissor inibitório GABA. Isto produziria, então, o efeito amnésico (Jerusalinsky et al., 1995; Ferreira et al., 2003). Já durante o processo de evocação, os antagonistas muscarínicos e, especialmente, a MT3 atuariam diretamente no terminal axonal de um neurônio excitatório (glutamatérgico), antagonizando o receptor M4 que teria, ali, o papel de controlar a liberação de glutamato na fenda sináptica. Estes diferentes papéis também poderiam estar

acontecendo em diferentes sub-regiões do hipocampo (CA1, CA3 e giro denteado, por exemplo), mas nosso tratamento não discrimina espacialmente entre elas.

Indiretamente, portanto, a MT3 deve estar atuando na disponibilidade dos neurotransmissores nos dois processos. A formação da memória, porém, envolve fenômenos plásticos, como o aumento da produção e liberação do neurotransmissor glutamato (Dudai, 2004; Izquierdo, 2002). É possível que o tratamento pré-teste com MT3, atue sobre terminais neuronais que já passaram pelo processo da consolidação da memória, e que, portanto, tem suas sinapses modificadas para liberar grande quantidade de glutamato na fenda e que também passariam a expressar novos receptores M4, explicando, assim, o efeito facilitatório sobre a evocação, que não era detectável com o mesmo tratamento na situação de pós-treino, quando a liberação do glutamato ainda não estava modificada. Essa hipótese será testada em futuros experimentos com a infusão intra-hipocampal concomitante de fármacos antagonistas glutamatérgicos e de MT3, a fim de verificarmos a interação entre estes dois sistemas de neurotransmissores (ver figura 26).

Nossa hipótese, portanto, é a de que os receptores M4, em algum dos sítios em que eles se expressam – seja em interneurônios GABAérgicos, seja em neurônios glutamatérgicos, pré ou pós-sinápticamente – sofreriam mudanças quantitativas ou qualitativas (isso precisaria ser verificado), provavelmente aumento em sua expressão nas sinapses axoaxônicas nos terminais dos neurônios piramidais glutamatérgicos. Esta mudança parece ocorrer no início da consolidação e deve permanecer até a evocação, por em quanto conhecemos o efeito facilitatório da MT3 sobre a evocação somente 24 horas após o treino.

É possível que a mudança na modulação dos receptores M4 seja uma medida de proteção à memória que esta sendo armazenada em uma determinada via neuronal no

hipocampo dorsal. É conhecido que durante o processo de consolidação uma memória é lábil e suscetível a interferências de tratamento e de outras memórias ou estímulos. Por isso, é plausível que os mecanismos de plasticidade sináptica podem instalar um freio inibitório (receptores M4) sobre um sistema excitatório.

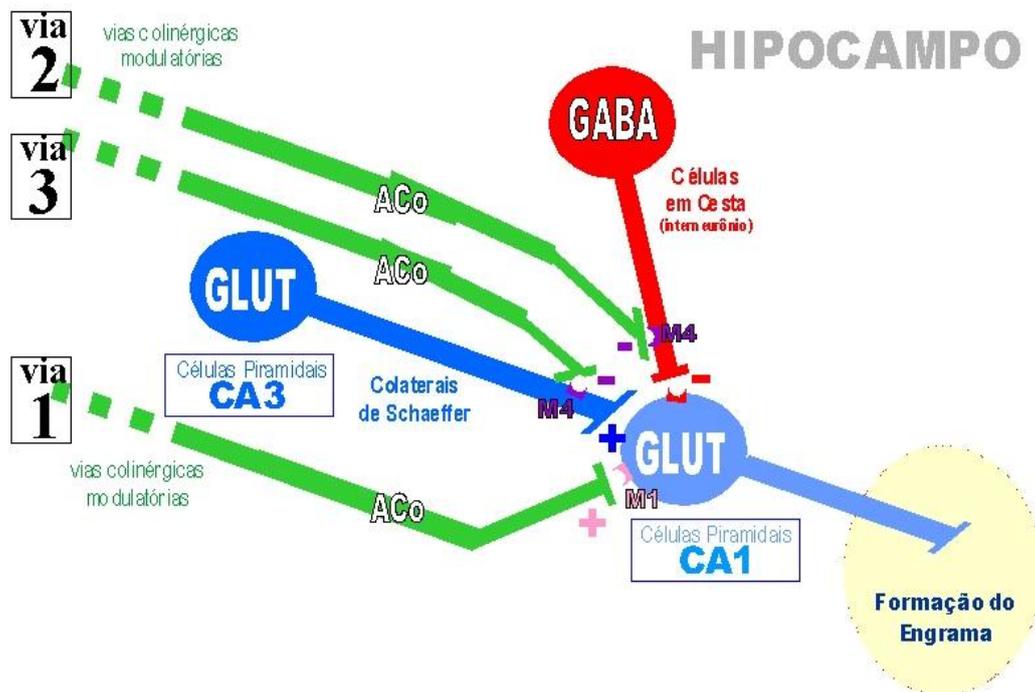


Figura 26 – Proposta da circuitaria de modulação colinérgica muscarínica na região hipocampal dorsal sugerida a partir da interpretação dos resultados obtidos com a infusão de fármacos no hipocampo pós-treino, pré-teste e pós-reativação de CAC e EI:

- Via 1 representa o efeito facilitatório da MT2, tanto pós-treino como pré-teste. Além disso, pode explicar o efeito facilitatório da MT3 pré-teste agindo sobre autorreceptores M4, que passariam a ser expressos nessa via após os fenômenos de plasticidade sináptica (trabalhos anteriores).
- Via 2 representa o efeito amnésico da MT3 pós-treino agindo sobre heterorreceptores M4 expressos num terminal axonal de um neurônio GABAérgico. A MT3, então, inibe a inibição do receptor M4 sobre um neurônio GABAérgico inibitório.
- Via 3 também pode representar o efeito facilitatório da MT3 pré-teste. Nessa situação, os receptores M4 passariam a ser expressos como heterorreceptores pré-sinápticos num terminal axonal de um neurônio glutamatérgico, após os fenômenos de plasticidade sináptica. A MT3, assim, inibe a inibição do receptor M4 sobre um neurônio excitatório.

CONCLUSÕES

- A MT3 e a escopolamina infundidas no hipocampo dorsal imediatamente após o treino de Condicionamento Aversivo Contextual apresentaram um evidente efeito amnésico sobre o processo de consolidação desta tarefa, demonstrando que o sistema colinérgico muscarínico modula positivamente esse processo.

- Somente a MT3, antagonista seletivo ao receptor M4, infundida no hipocampo dorsal 20 minutos antes do teste de Condicionamento Aversivo Contextual apresentou um evidente efeito facilitatório sobre o processo de evocação desta tarefa, demonstrando que o subsistema M4 muscarínico modula negativamente esse processo.

- Somente a MT3 infundida no hipocampo dorsal imediatamente após uma reativação de 3 minutos de Condicionamento Aversivo Contextual apresentou um evidente efeito facilitatório sobre o processo de reconsolidação desta tarefa, demonstrando que o subsistema M4 muscarínico modula negativamente esse processo.

- Somente a MT3 infundida no hipocampo dorsal imediatamente após uma reativação de 25 minutos de Condicionamento Aversivo Contextual apresentou um evidente efeito amnésico sobre o processo de consolidação da extinção desta tarefa, demonstrando que o subsistema M4 muscarínico modula positivamente esse processo.

- A MT3 infundida no hipocampo dorsal 20 minutos antes do teste 24 horas após uma reativação de 25 minutos de Condicionamento Aversivo Contextual apresentou um

evidente efeito amnésico sobre o processo de evocação da extinção desta tarefa, demonstrando que o subsistema M4 muscarínico modula positivamente esse processo.

- A MT3 infundida no hipocampo dorsal modifica seu efeito entre os processos de consolidação e evocação/reconsolidação da memória de CAC, o que demonstra uma mudança no papel modulatório dos receptores M4 entre esses processos indicando alterações plásticas de expressão desses receptores.

- Os receptores M4 hipocampais apresentam papéis contrários entre reconsolidação e extinção de CAC.

- A MT3 não modifica o seu efeito entre os processos de consolidação e evocação da extinção, demonstrando que os receptores M4 hipocampais não modificam o seu papel modulatório nas vias que codificam o traço da extinção, diferentemente do que acontece com o traço do medo condicionado.

- A MT3 e a escopolamina infundidas na amígdala basolateral imediatamente após o treino de Condicionamento Aversivo Contextual apresentaram um evidente efeito amnésico sobre o processo de consolidação desta tarefa, demonstrando que o sistema colinérgico muscarínico nessa estrutura modula positivamente esse processo.

- Somente a MT3 infundida na amígdala basolateral imediatamente após uma reativação de 3 minutos de Condicionamento Aversivo Contextual apresentou um evidente efeito amnésico sobre o processo de reconsolidação desta tarefa, demonstrando que o subsistema M4 muscarínico nessa estrutura modula positivamente esse processo.

- A MT3 infundida na amígdala basolateral não modifica seu efeito entre os processos de consolidação e reconsolidação da memória de CAC, diferentemente do que ocorre quando infundida no hipocampo.

- Os receptores M4 da amígdala basolateral não sofrem alterações plásticas durante a formação da memória de CAC.

- A MT3 infundida no hipocampo dorsal imediatamente após o treino da tarefa de Esquiva Inibitória apresentou um evidente efeito amnésico sobre o início do processo de consolidação.

- A MT3 infundida no hipocampo dorsal 90 e 180 minutos após o treino de Esquiva inibitória apresentou um evidente efeito facilitatório nesta fase mais tardia do processo de consolidação

- Os receptores M4 hipocâmpais modificam seu papel modulatório precocemente dentro do processo de consolidação da memória.

- A administração intra-hipocâmpal de um inibidor de transcrição gênica (DRB) imediatamente após o treino da tarefa de esquiva inibitória teve um evidente efeito amnésico sobre o processo de consolidação, demonstrando que a síntese ARNm é necessária para a consolidação.

- A administração intra-hipocampal de um inibidor de transcrição gênica (DRB) imediatamente após o treino da tarefa de esquiva inibitória reverteu o efeito facilitatório da MT3 pré-teste, demonstrando a necessidade de transcrição gênica para ocorrer o efeito facilitatório da MT3

- Os resultados, em conjunto, apontam para modificações plásticas na expressão de receptores M4 hipocampais, que, após o processo de consolidação, passariam a controlar negativamente a atividade de neurônios excitatórios.

Referências Bibliográficas

ALBERINI C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neuroscience*. 28: 51–56

ANAGNOSTARAS S.G., MAREN S., SAGE J.R., GOODRISH S., FANSELOW M.S. (1999). Scopolamine and pavlovian fear conditioning in rats: dose-effect analysis. *Neuropsychopharmacology*. 21: 731–744.

ANAGNOSTARAS S.G., MURPHY G.G., HAMILTON S.E., MITCHELL S.L., RAHNAMA N.P., NATHANSON N.M., SILVA A.J. (2003). Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nature Neuroscience*. 6: 51-8.

BARROS D.M., MELLO E., SOUZA T., DE DAVID T., CHOI H., AGUZZOLI A., MADCHE C., ARDENGHI P., MEDINA J.H., IZQUIERDO I. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1, b-noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavioral Brain Research*. 124: 1 - 7.

BARATTI C.N., HUYGENS P., MIÑO J., MERLO A., GARDELLA J. (1979). Memory facilitation with posttrial injection of oxotremorine and physostigmine in mice. *Psychopharmacology*. 64: 85–88.

BEKINSCHTEIN P., CAMMAROTA M., IGAZ L.M., BEVILAQUA L.R.M., IZQUIERDO I., MEDINA J.H. (2006) Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF-Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*. 53: 261–277.

BEKINSCHTEIN P., CAMMAROTA M., KATCHE C., SLIPCZUK L., ROSSATO J.I., GOLDIN A., IZQUIERDO I., MEDINA J.H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 2711-6.

BLISS T.V.P., COLLINGRIDGE G.L. (1993). A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361: 31-38.

BOCCIA M.M., ACOSTA G.B., BLAKE M.G., BARATTI C.M. (2004). Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience*. 124: 735–741.

BOCCIA M.M., BLAKE M.G., ACOSTA G.B., BARATTI C.M. (2003). Atropine, an anticholinergic drug, impairs memory retrieval of a high consolidated avoidance response in mice. *Neuroscience Letters*. 345: 97–100

BOCCIA M.M., BLAKE M.G., ACOSTA G.B., BARATTI C.M. (2007). Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learning and Memory*. 13: 376–381.

BOCCIA M.M., BLAKE M.G., BARATTI C.M., MCGAUGH J.L. (2009). Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*. 91: 93–97.

BOUTON M.E., WESTBROOK F.R., CORCORAN K.A., MAREN S. (2006) Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biology Psychiatry* 60: 352–360.

BOUTON M.E. (2004). A general role for early onset cues and intra-event learning: comment on McDonald and Siegel. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*. 12: 18–19.

BUSTOS S.G., MALDONADO H., MOLINA V.A. (2006). Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience*. 139: 831-42.

BUSTOS S.G., MALDONADO H., MOLINA V.A. (2009). Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology*. 34: 446-57.

CAULFIELD M.P., BIRDSALL N.J. (1998). Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacology Reviews*. 50: 279–90.

COBB S.R., DAVIES C.H. (2005). Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *The Journal of Physiology*. 562: 81-8.

COOPER E.C., LOWENSTEIN D.H. (2001). Hippocampus. In: *Encyclopedia of life sciences*, London: Nature Publishing Group.

COYLE J.T., PRICE D.L., DELONG M.L. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation, *Science*. 219: 1184-90.

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: 1648–1655.

DEBIEC J., LEDOUX J.E. (2004). Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience*. 129: 267-72.

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

DIEHL F. (2006). Participação do sistema colinérgico muscarínico hipocampal no processo de evocação da memória em ratos. UFRGS, Porto Alegre, Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências. Orientador: QUILLFELDT, J.A. / Instituto de Ciências Básicas da Saúde / Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DIEHL F., OLIVEIRA L.F., SÁNCHEZ G., CAMBOIM C., DE OLIVEIRA ALVARES L., LANZIOTTI V.B., CERVENĀNSKY C., KORNISIUK E.,

JERUSALINKY D., QUILLFELDT J.A. (2007). Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. *Behavioral Brain Research*. 177: 227–231.

DINGLEDINE R., MCBAIN C.J. (1999). Excitatory amino acid transmitters. in: *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed., G.J. SIEGEL, B.W. AGRANOFF, R.W. ALBERTS, S.K. FISHER, M.D.UHLER. New York. Raven Press, pp 367-387.

DUDAI Y. (2004). The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55: 51-86.

DUDAI Y., EISENBERG M. (2004). Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*. 44: 93–100.

DUVARCI S., MAMOU C.B., NADER K. (2006). Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*. 24: 249–260.

EISENBERG M., KOBILO T., BERMAN D.E., DUDAI Y. (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science*. 301: 1102-4.

FERREIRA AR., OLIVEIRA L.F., BLANCO C., KORNISIUK E., SANCHEZ G., DAROIT D., SILVA M.C., CERVENĀNSKY C., JERUSALINSKY D., QUILLFELDT

J.A. (2003). Role of hippocampal m1 and m4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 74, 411- 415.

FIGUEREDO L.Z.P., MOREIRA K.D.M., FERREIRA T.L., FORNARI R.V., DE OLIVEIRA M.G.M. (2008). Interaction between glutamatergic–NMDA and cholinergic–muscarinic systems in classical fear conditioning. *Brain Research Bulletins*. 77: 71-6.

FREEDMAN S.B., BEER M.S., HARLEY E.A. (1988). Muscarinic M1, M2 receptor binding. Relationship with functional efficacy. *European Journal of Pharmacology*. 156: 133-42.

FUSTER J.M. (1997). Network Memory. *Trends Neuroscience*. 20: 451-459.

HARVEY A.L., BRADLEY K.N., COCHRAN S.A., ROWAN E.G., PRATT J.A., QUILLFELDT J.A., JERUSALINSKY D.A. (1998). What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicol*. 36: 1635-1640.

HASSELMO M.E. (1999). Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cognitive Sciences*. 3:351-359.

HASSELMO M.E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion of Neurobiology*. 16: 710–715

HEBB D.O. (1949). The organization of behavior – A neurophysiological theory. New York. *John Wiley & Sons, Inc*, pp 60-79.

HERNANDEZ AI, BLACE N, CRARY JF, SERRANO P, LEITGES LIBIEN JM, WEINSTEIN G, TCHERAPANOV A, SACKTOR TC. (2003). Protein Kinase M Synthesis from a Brain mRNA Encoding an Independent Protein Kinase C Catalytic Domain. *The Journal of biological chemistry*. 278: 40305–40316.

IGAZ L.M., VIANNA M.R., MEDINA J.H., IZQUIERDO I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience*. 22: 6781-9.

INTROINI-COLLISON I., DALMAZ C., McGAUGH J.L. (1996). Amygdala β -noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. *Neurobiology of Learning and Memory*. 65: 57-64.

IZQUIERDO I., DA CUNHA C., ROSAT R., JERUSALINSKY D., FERREIRA M.B., MEDINA J.H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behavioral and Neural Biology* 58: 16-26.

IZQUIERDO I., BIANCHIN M., SILVA M. B., ZANATTA M.S., WALZ R., RUSCHEL A.C., da SILVA R.C., PACZKO MEDINA J.H. (1993). CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. *Behavioral and Neural Biology*. 59: 1-4.

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, 635-636.

IZQUIERDO I., MEDINA J.H. (1997). Memory formation, the sequences of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. 68: 285-346.

IZQUIERDO I., QUILLFELDT J.A., ZANATTA M.S., QUEVEDO J., SCHAFFER E., SCHIMITZ P.K., MEDINA J.H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*. 9: 796-793.

IZQUIERDO I. (2002). *Memória*. Editora Artmad. Porto Alegre. 95 p.

JERUSALINKY D. e HARVEY A.L. (1994). Toxins from mamba venoms: small proteins with selectives for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *TiPS*. 15, 424-430.

JERUSALINSKY D., KORNISIUK E., BERNABEU R., IZQUIERDO I., CERVENĀNSKY C. (1995). Muscarinic toxins from the venom of Dendroaspis snakes with agonist-like actinos. *Toxicon*. 33: 389-397.

JERUSALINKY D., KORNISIUK E., ALFARO P. QUILLFELDT J. A., ALONSO M., VERDE E. R., CERVEÑANSKY C., HARVEY A.L. (1997). Muscarinic toxins selective for M4 receptors impairs memory in the rat. *Neuro Report*. 9: 1407-1411.

JERUSALINKY D., KORNISIUK E., ALFARO P. QUILLFELDT J.A., FERREIRA A., RIAL V.E., DURAN R., CERVEÑANSKY C., (1998). Muscarinic toxins novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxycon*. 38: 747-761.

KANDEL E.R., KUPFERMANN I., IVERSEN S. (2000). Learning and Memory. In: *Principles of Neural Science*. 4th ed., KANDEL E.R., SCHUARTZ J.H., JESSELL T.M. New York, McGraw-Hill, pp 1227-1247.

KIMURA F., BAUGHMAN R.W. (1997). Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *The Journal of Neurophysiology*. 77: 709-716.

LAMBERTY Y., GOWER A.J. (1991). Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. *Archives internationales de pharmacodynamie et de Thérapie*. 309: 5-19.

LAMPRECHT R.; LeDOUX J. (2004). Structural Plasticity and Memory. *Nature Reviews*. 5: 45-54.

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

LEVEY A.I., KITT C.A., SIMONDS W.F., PRICE D.L., BRANN M.R. (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtypespecific antibodies. *The Journal of Neuroscience*. 11: 3218–3226.

LEVEY A.I. (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13541-6.

LIN C.H., YEH S.H., LU H.Y., GEAN P.W. (2003). The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *The Journal of Neuroscience*. 23: 8310–8317.

LORENZINI C.G.A., BALDI L.E., BUCHERELLI C., SACCHETTI B., TASSONI G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*. 71: 1-18.

McEWEN B.S. (1999). Stress and Hippocampal Plasticity. *Annual Review in Neuroscience*. 22: 105-122.

McGAUGH J.L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*. 153: 1351-1358.

McGAUGH J.L. (2000). Memory – a century of consolidation. *Science*. 287: 248-251.

MCGAUGH J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review in Neuroscience* 27: 1–2

McGAUGH J.L.; IZQUIERDO I. (2000). The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends in Pharmacology Science*. 21: 208-210.

McGAUGH J.L., ROOSENDAAL B. E AHILL L. (1999). Modulation of memory storage by stress hormones and the amigdaloid complex. In: Gazzaniga, M.S. (ed). *The New Cognitive Neuroscience*, Cambridge, Bradford, 1081-1098.

MCGAUGH J. L., & ROOZENDAAL B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinions on Neurobiology*. 12: 205–210.

MISANIN J.R., MILLER R.R., LEWIS D.J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*. 160: 554-5.

MULUGETA E., KARLSSON E., ISLAM A., KALARIA R., MANGAT H., WINBLAD B., ADEM A. (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Research*. 960: 259-62.

MYERS K.M., DAVIS M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry* 12: 120 150.

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

NADER K., HARDT O. (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*. 10: 224 – 234.

OLIANAS M. C. (1997). Identification of rat brain muscarinic M4 receptors coupled to cyclic AMP using the selective antagonist muscarinic toxin 3. *European Journal of Pharmacology*. 357: 235-242.

PARENT M.B., BAXTER M.G. (2004). Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learning and Memory*. 11: 9-20.

PAXINOS G. & WATSON C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd ed., Academic Press, San Diego, USA.

PEDREIRA M.E., MALDONADO H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*. 38: 863-9.

PITKANEN A., SAVANDER V., LEDOUX J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *TINS*. 20: 517-523.

POWER A.E., VAZDARJANOVA A., MCGAUGH J.L. (2003). Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 80: 178–193

PRZYBYSLAWSKI J., SARA S.J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioral Brain Research*. 84: 241-6.

QUILLFELDT J.A., SCHIMITZ P.K., WALS R., BIANCHINI M., ZANATTA M.S., MEDINA J.H. e IZQUIERDO I. (1994). CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA reverses the effect. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 48: 437-440.

QUILLFELDT J.A. (1994). O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Instituto de Biociências / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

QUILLFELDT J.A., ZANATTA M.S., SCHIMITZ P.K., QUEVEDO J., SCHAFFER E., de LIMA J.B., MEDINA J.H. e IZQUIERDO I. (1996). Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiology of Learning and Memory*. 66: 97-101.

QUIRK G.J, MUELLER D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacol*. 33: 56-72.

REZAYOF A., KHAJEHPOUR L., ZARRINDAST M.R. (2009). The amygdala modulates morphine-induced state-dependent memory retrieval via muscarinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*. 160: 255-63.

ROGERS J.L., KESNER R.P. (2003). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*. 80: 332-42.

ROGERS J.L., KESNER R.P. (2004). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. *Learning and Memory*. 11: 102-7.

ROOZENDAAL B. (2002). Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*. 78: 578–595.

ROUSE S.T., MARINO M.J., POTTER L.T., CONN P.J., LEVEY A.I. (1999). Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sciences*. 64, 501-509.

SÁNCHEZ G., DE OLIVEIRA ALVARES L., OBERHOLZER M.V., GENRO B., QUILLFELDT J.A., DA COSTA J.C., CERVEÑANSKY C., JERUSALINSKY D., KORNISIUK E. (2009b). M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *Journal of Neuroscience Research*. 87: 691-700.

SANTINI E., MULLER R.U., QUIRK G.J. (2001). Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *The Journal of Neuroscience*. 21: 9009–9017.

SARA S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*. 7: 73–84.

SCOVILLE W.B., MILNER B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesion. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 20: 141-154.

SEGAL M. & AUERBACH J.M. (1997). Muscarinic receptor involved in hippocampal plasticity. *Life Sciences*. 60: 1085-1091

SERRANO P., FRIEDMAN E.L., KENNEY J., TAUBENFELD S.M., ZIMMERMAN J.M, HANNA1 J., ALBERINI C., KELLEY A.E., MAREN S., RUDY J.W., YIN J.C.P., SACKTOR T.C., FENTON A.A. (2008). PKMZ Maintains Spatial, Instrumental, and Classically Conditioned Long-Term Memories. *PLoS Biol*. 6: e318.

SELBIE L.A. & HILL S. (1998). G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signaling pathways. *TiPS*. 19: 87-93.

SETLOW B., ROOZENDAAL B., McGAUGH J.L. (2000). Involvement of a basolateral amygdala complex-nucleus accumbens pathway in a glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*. 12: 367-375.

SHEMA R, SACKTOR TC, DUDAI Y. (2007) Rapid Erasure of Long-Term Memory Associations in the Cortex by an Inhibitor of PKMz. *Science*. 317: 951-953.

SINGH M.M. (1985). Cholinergic mechanisms, adaptive brain processes and psychopathology. In : Central cholinergic mechanisms and adaptive dysfunctions. M.M. SINGH D.M., WARBURTON H L.L. New York, *Plenum*, pp 353-397.

SQUIRE L.R. (1992). Memory and hippocampus: a synthesis from finding with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*. 99: 195-231.

STEVENS C.F. (1998). A million dollar question: Does LTP = Memory? *Neuron*. 20: 1-2.

SUZUKI A., JOSSELYN S.A., FRANKLAND P.W., MASUSHIGE S., SILVA A.J., KIDA S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of Neuroscience*. 24: 4787–4795.

SZAPIRO G., GALANTE J.M., BARROS D.M., STEIN M., VIANNA M.R.M., IZQUIERDO L.A., IZQUIERDO I., MEDINA J.H. (2002) Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical Research*. 27: 1491 - 1498.

TAYLOR P., BROWN J.H. (1999). Acetylcholine. in: *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed., G.J. SIEGEL B.W., AGRANOFF R.W., ALBERTS, S.K. FISHER, M.D. UHLER. New York. Raven Press, p 231-260.

THATHIAH A., DE STROOPER B. (2009). G protein-coupled receptors, cholinergic dysfunction, and Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Sci Signal* 2: re8.

TRONSON N.C., TAYLOR J.R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*. 8: 262-75.

UNGERLEIDER L.G., DOYON J., KARNI A. (2002). Imaging brain plasticity during motor skill learning. *Neurobiology or Learning and Memory*. 78: 553-564.

VAN DER ZEE E.A., LUITEN P.G. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*. 58: 409-471

YAO Y., KELLY M.T., SAJIKUMAR S., SERRANO P., TIAN D., BERGOLD P.J., FREY J.U., SACKTOR T.C. (2008). PKM Maintains Late Long-Term Potentiation by *N*-Ethylmaleimide-Sensitive Factor/GluR2-Dependent Trafficking of Postsynaptic AMPA Receptors. *The Journal of Neuroscience*. 28: 7820–7827.

WALLENSTEIN G.V., VAGO D.R. (2001). Intrahippocampal Scopolamine Impairs Both Acquisition and Consolidation of Contextual Fear Conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 75: 245– 252

WILKINSON D.G., FRANCIS P.T., SCHWAM E., PAYNE-PARRISH J. (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*. 21: 453-78.

WINKLER J., SUHR S.T., GAGE F.H., THAL L.J., FISHER L.J. (1995). Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature*. 375: 484-487

Research report

Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task

Felipe Diehl^{a,b}, Lucas Fürstenau de Oliveira^{a,b}, Gonzalo Sánchez^c, Clarissa Camboim^{a,b}, Lucas de Oliveira Alvares^{a,b}, Vanusa Bispo Lanzotti^{a,b}, Carlos Cerveñansky^d, Edgar Kornisiuk^c, Diana Jerusalinky^c, Jorge Alberto Quillfeldt^{a,b,*}

^a *Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Instituto de Biología Celular & Neurociencias “Prof. Eduardo De Robertis”, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 2^{do} piso, (1121) Buenos Aires, Argentina*

^d *Unidad de Bioquímica Analítica, Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”/Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay*

Received 2 March 2006; received in revised form 16 November 2006; accepted 20 November 2006

Available online 19 December 2006

Abstract

The cholinergic system plays a crucial role in learning and memory. Modulatory mechanisms of this system in the acquisition and consolidation processes have been extensively studied, but their participation in the memory retrieval process is still poorly understood. Conventional pharmacological agents are not highly selective for particular muscarinic acetylcholine receptor subtypes. Muscarinic toxins (MTs) that are highly selective for muscarinic receptors were extracted from the venom of the mamba snake, like the toxin MT3, selective for the M4 receptor subtype. These toxins are useful tools in studies of the specific functions of the M4 mediated transmission. The M4 receptor selective antagonist MT3, given into the dorsal hippocampus before the test, have enhanced the memory retrieval of an inhibitory avoidance task in rats. MT3 had no effect in the habituation to a new environment, including basic motor parameters, meaning that the effect in the inhibitory avoidance is purely cognitive. Our results suggest an endogenous negative modulation of the cholinergic muscarinic system upon the retrieval of previously consolidated aversive memories, hereby shown by the facilitatory effect of MT3.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Memory retrieval; Cholinergic muscarinic system; MT3; Inhibitory avoidance task; Hippocampus; Rat

1. Introduction

The cholinergic system plays a crucial role in learning and memory. Lesions of cholinergic nuclei, pharmacological manipulation of cholinergic receptors and enzymes, intracerebral transplantation of genetically modified cells that produce

acetylcholine, and anatomical changes in cholinergic pathways during ageing have all been correlated with altered cognition mechanisms [2,37,40].

Muscarinic ACh receptors (MACHR), members of the seven-transmembrane protein receptor family coupled to G-proteins, are expressed widespread throughout the body, and are involved in many fundamental physiological processes in the central nervous system such as learning and memory [9,17]. Five subtypes of MACHR are expressed in the mammalian brain (M1–M5) and their coding genes have been cloned [12]. Upon agonist binding, M1, M3 and M5 subtypes preferentially interact with G_q protein family, activating the inositol phosphate pathway, while subtypes M2 and M4 are usually coupled to adenylyl

* Corresponding author at: Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Building 43422, Room 208A, CEP 91.501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3316 7604; fax: +55 51 3316 7003.

E-mail address: quillfe@ufrgs.br (J.A. Quillfeldt).

cyclase through G_i proteins, therefore inhibiting cAMP production [7,31].

There are differences in the concentration of receptor subtypes in different brain regions and more than one subtype is often expressed in the same cell [15]. The hippocampal formation of the rat was early suggested to have a high proportion of M1 and M4 receptors [9,15,18,20,27]. The hippocampus is the target of cholinergic fibers from the medial septum, an input known to be important for modulation both at the cellular and at the network levels, including the theta rhythm [10]. The septo-hippocampal cholinergic pathway also appears to be essential for memory formation and the cholinergic receptors activation might be involved with this and other kinds of synaptic plasticity [3,10].

The study of the MACHRs localization, quantification and function has faced difficulties due to the lack of selective ligands exclusively acting upon one or other receptor subtype. However, muscarinic toxins (MTs) extracted from the venom of *Dendroaspis* snakes, distinguish among some muscarinic receptor subtypes; for example, MT2 has a 4-fold higher affinity for M1 than for M4 receptor (K_i = 360 and 1200 nM, respectively), with rather low or negligible affinity for the other subtypes; while MT3 has 214-fold higher affinity for M4 than for M1 receptor (K_i = 1.2 and 250 nM, respectively). MT2 behaves as a M1 agonist and a M4 antagonist, while MT3 behaves as a very selective M4 antagonist [6,9,12,18,26,28,29].

Previous work has shown that the infusion of MT2 into the dorsal hippocampus of rats immediately after training modified performance in an inhibitory avoidance task. In the lowest dose, MT2 improved performance. On the other hand, pirenzepine, a relatively selective antagonist, was amnesic. These experiments have shown that the M1 receptor has an important positive role in memory consolidation for the inhibitory avoidance task [9]. Moreover, the infusion of the selective M4 receptor-selective antagonist MT3 into the hippocampus has an amnesic effect in the consolidation of this memory with aversive components [9,16].

The participation of the cholinergic muscarinic system in memory consolidation was extensively studied, but there are few data concerning the function of this system in the memory retrieval processing. Recent studies have shown an enhanced effect on retention performance of a step-down inhibitory avoidance task by intra-hippocampal pre-test infusion of oxotremorine, a non-selective muscarinic agonist, and an amnesic effect of the non-selective muscarinic cholinergic antagonist scopolamine. These results indicate a positive role of the cholinergic muscarinic system on the retrieval process for this task [4]. However, the lack of selectivity of oxotremorine and scopolamine does not allow to answer which muscarinic receptor was involved.

The present work investigated the role of M4 muscarinic cholinergic receptor in memory retrieval by using a pre-test intra-hippocampal infusion of MT3. Two behavioral tasks were used, a step-down inhibitory avoidance (IA) and an open-field habituation (OF). The activity in the open-field test session may also be used as a motor/performance control for the drug effects.

2. Materials and methods

Ninety-five (95) male Wistar rats (age 2–3 months, weight 210–300 g) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, 4–5 to a cage, under a 12 h light/dark cycle and at a constant temperature of 24 ± 1 °C, with water and food *ad libitum*. All animals were anesthetized by a mixture of ketamine and xilazine (i.p., 75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally implanted with a 27-gauge guide cannulae aimed at AP –4.2 mm (from Bregma), LL ±3.0 mm, DV 1.5 mm, just 1.0 mm above area CA1 of the dorsal hippocampus (adjusted from Paxinos and Watson [28]).

Once recovered from surgery (48 h), the animals were submitted to a training session either in the step-down inhibitory avoidance (IA) or in the open-field habituation (OF) task; 24 h later they receive a bilateral intra-hippocampal infusion of the drug or its vehicle and 20 min later were tested for the corresponding task [30]. The IA task was carried out in an automatically operated, brightly illuminated box, in which the left extreme of the grid (42.0 cm × 25.0 cm grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart) was covered by a 7.0 cm wide, 5.0 cm high formica-covered platform. Animals were placed on the platform and their latency to step-down placing their four paws on the grid was measured. In the training session, immediately upon stepping down, the animals received a 0.5 mA, 3.0 s scrambled footshock. In the test session no footshock was given, and a ceiling of 180 s was imposed to the step-down latency. The OF was studied using a 50 cm high, 60 cm × 40 cm plywood box with a frontal glass wall and a linoleum floor divided in 12 equal rectangles. Animals were left there for 2 min both in the training and the test session, and the number of rearings and crossings between sectors were registered. The difference between the two sessions in the number of rearings and of crossings between rectangles, were considered a measure of habituation to the open-field: if the animals habituated to the field during the first session, they should recognize it as familiar and, in consequence, the number of rearings and crossings should decrease in the second session [31]. The number of crossings in the test session was also used as a control for the possible motor and general performance effects of the drug administered 24 h before.

At the time of the pre-test infusion, 30-gauge cannulae were fitted into the guide cannulae; the tip of the infusion cannulae protruded 1.0 mm beyond that of the guide cannulae and was, therefore, aimed at the pyramidal cell layer of CA1 in the dorsal hippocampus (Fig. 1), with 0.5 µl volume being administered at a 20 µl/h rate. The animals were divided into groups receiving bilateral infusions of 0.5 µl, either of MT3 (0.5, 1.0 and 2.0 mg/side—purified from lyophile by us, according to Jerusalinsky and Harvey [13]), or of its vehicle (phosphate buffered saline) administered 20 min before the test session (IA); only the dose effective in the IA task of each drug was tested in the OF task. The selected doses covered a range consistent with previous post-training studies [1,9].

Statistical analysis of the behavioral data (latencies to step-down in IA and number of rearings and crossings in OF) was limited to the animals with correct placements of the cannula (Fig. 1)—those animals were 83 out of 95 operated, as described in Izquierdo et al. [12]. Since the step-down latencies have not passed a normality test (Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors' correction), differences among groups were evaluated by a Kruskal–Wallis ANOVA with Dunn's all pair-wise multiple comparison *post-hoc* test; training versus test latencies were correspondingly compared by the Wilcoxon signed ranks test. In the OF task, as crossings and rearings were normally distributed, groups were compared by Student's *t*-test; training versus test latencies were correspondingly compared by the paired *t*-test.

Experiments with rats were performed in strict accordance to the Brazilian law, to the recommendations of Brazilian Society for Neurosciences (SBNeC) and the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), the Review Committee of the School of Veterinary at the University of Buenos Aires and the International Brain Research Organization (IBRO), and are in compliance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (publication no. 85-23, revised in 1985).

3. Results

Fig. 2 shows the inhibitory avoidance task results for the MT3 injected groups. As data were not normally distributed

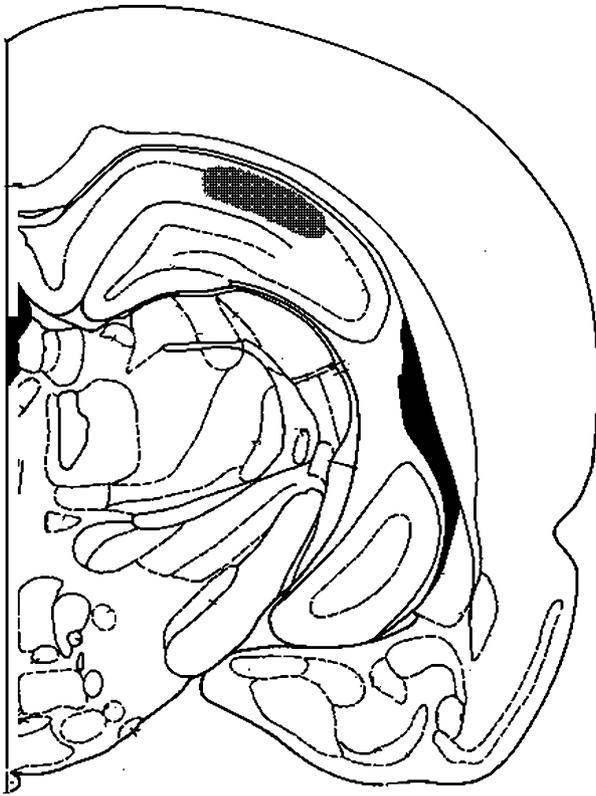


Fig. 1. Drawing representing AP plane -4.2 mm adapted from the Atlas of Paxinos and Watson [27] showing the extent of the area reached by our infusions in the rat dorsal hippocampus (stippled areas represent typical regions of accepted animals, as dyed by $0.5 \mu\text{l}$ of 2% methylene blue in saline infused through the same cannulae).

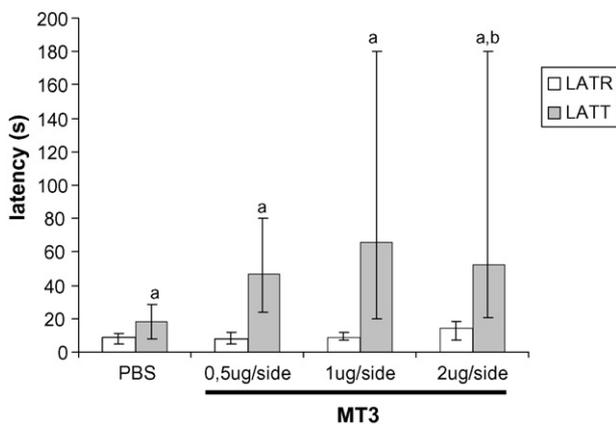


Fig. 2. Effect of MT3 in the step-down inhibitory avoidance task. Data expressed as median and interquartile intervals (training session in white; test session in gray). *Ns* per group, respectively, 21, 15, 11 and 16. Kruskal–Wallis test shows no significant difference among training session latencies ($P=0.786$). (a) Each of the four experimental groups have shown a significant difference between training and test sessions latencies ($P<0.05$, Wilcoxon test). (b) Only the $2.0 \mu\text{g/side}$ group of MT3 show a significant difference in the test session latency compared to the control group ($P<0.05$, Dunn test). LATR: training session latency; LATT: test session latency.

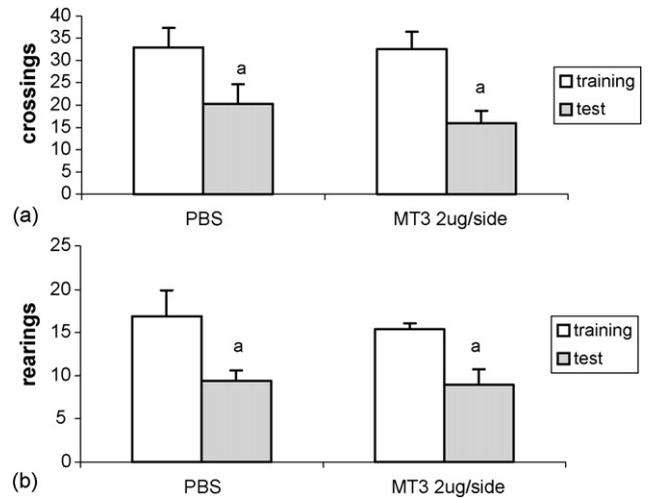


Fig. 3. (a and b) Absence of effect of MT3 in the open-field task. Data expressed as mean \pm S.E.M. *Ns* per group, respectively, 9 and 11. Number of (a) crossings and (b) rearings in the test are significantly different from the corresponding training values for both groups (paired *t*-test, $P<0.05$), but MT3-treated group (in the same dose proven effective in the inhibitory avoidance task) was not significantly different from the control one ($P>0.05$, Student's *t*-test).

(Kolmogorov–Smirnov normality test, $P>0.200$), nonparametric tests were used.

The highest dose of MT3 ($2 \mu\text{g/side}$) administered at 20 min pre-test enhanced the performance of the animals compared to the control and the groups which received lower doses ($P<0.05$, Dunn's all pair-wise multiple comparison *post-hoc* test, after a Kruskal–Wallis ANOVA with $P=0.011$). The increase in the performance with $1 \mu\text{g/side}$ dose was not statistically significant (Fig. 2). Groups were comparable because there were no significant differences among training session latencies ($P=0.229$, Kruskal–Wallis ANOVA); all groups have displayed normal learning, as each test latency was significantly larger than the corresponding training one ($P<0.005$ for all doses, Wilcoxon signed ranks test).

Fig. 3 shows the open-field task results for animals injected with MT3 with the dose that was found to be effective in the inhibitory avoidance task ($2.0 \mu\text{g/side}$). Compared to controls, the drug-treated animals have shown no significant differences in the number of rearings or crossings neither in the training nor in the test sessions ($P>0.05$, Student's *t*-test). Both variables (rearings and crossings) were significantly lower in the test than in the training session for the MT3-treated rats cannula ($P=0.002/0.014$) and the respective control group ($P=0.025/0.027$) evaluated by the paired *t*-test.

Additionally, the fact that there were no differences in the number of crossings between groups suggests that neither locomotor activity nor exploratory effects have been caused by the pre-test MT3.

4. Discussion

Our results show that MT3 ($2 \mu\text{g/side}$) has caused a facilitation of the retrieval of the inhibitory avoidance task when administered 20 min before test (Fig. 2). However, no effect was

found in the less aversive, exploratory open-field habituation task (Fig. 3). The unaltered number of crossings in the open-field, for the effective dose in the IA task, supports the idea that the effect of the drug in the IA is basically cognitive, neither a motor nor an exploratory effect.

We had previously proposed for the first time that M4 receptors are involved in memory consolidation since post-training administration of MT3 in the very same structure and behavioral task used in the present work was amnesic [16]. It has been shown that muscarinic transmission suffers impairments with aging and also in some degenerative diseases where cognitive functions are altered [5,21]. Mulugeta et al. have shown that M4 receptors were specifically lost in CA4 and DG of Alzheimer's patients brains [24].

Since MT3 is highly selective for the M4 receptor subtype – with an antagonist-like activity – and has a negligible binding to M1, M2, M3 and M5 receptors [6,9,12,18,26,28,29], our results suggest a negative modulator role for the M4 receptors in the dorsal hippocampus, at least during the memory retrieval process. Notice that M2 and M4 muscarinic receptors could have an inhibitory role [14,19,37] and can be expressed as heteroreceptors at the pre-synaptic terminals of either inhibitory or excitatory neurons [33,34].

Compared to the ever growing literature about the molecular events underlying the consolidation phase of memory formation [14,23], little is known about the molecular requirements of memory retrieval [36]. Most studies point to an essentially diffuse modulatory role of the cholinergic muscarinic system upon cognitive functions [36]. In both the hippocampus and the amygdala, modulatory actions on memory may be exerted either by extrinsic muscarinic pathways acting upon the “executive” glutamatergic and GABAergic neurons, or by intrinsic projections from cholinergic interneurons, as it seems to be the case in the limbic system (*ibidem*). Concerning our results, it must be taking into account that muscarinic heteroreceptors may be expressed at the pre-synaptic terminals of either inhibitory or excitatory neurons [33,34]; furthermore, it might be speculated that their expression would take place in the glutamatergic neurons of the perforant path, an important input projection to the hippocampal formation [14,34,35,38].

According to immunohistochemical studies, muscarinic M1 and M4 receptor subtypes are localized in the CA and DG hippocampal regions, and M2 subtype is mainly expressed in non-pyramidal cells [32,34]. The fibers of the non-pyramidal pathways—alveus, fimbria and hippocampal commissure, contain M4 [22].

Here we reported the facilitatory effect of MT3 upon retrieval. The molecular mechanisms involved in memory retrieval of hippocampally modulated behavioral tasks seem to be basically similar to those involved in memory formation, though there appear to be some differences [36]. Therefore, the old tenet that retrieval must be a function of, or involve mechanisms similar to the consolidation process, might be at least incomplete (*ibidem*). It might be speculated that the fact that they react in opposite ways in these different circumstances might be due to a modification in the circuitry involved in these processes.

In this sense, one possible explanation raises from the fact that M4 receptors may be located pre-synaptically in the hippocampus, acting as homoreceptors controlling acetylcholine release [33,38]. Since nothing is said about *when* are they expressed in this brain structure, we may speculate that it could be an experience-triggered event.

Despite the fact that the literature is scarce on this subject, we have previously shown that two other muscarinic toxins acting intra-hippocampally as selective agonists, MT1 [11,15] and MT2 [9], induced memory facilitation when administered after training, possibly acting upon M1-bearing glutamatergic neurons [20]. Since MT3 was amnesic when administered post-training in the hippocampus [16], we could think that its M4 target would not be located in the same pathway above mentioned, neither post-, nor pre-synaptically.

Both possibilities – M4 plasticity as hetero- or homoreceptors – are logically feasible and further investigation is necessary to clarify this point. Evidence concerning the possibility of plastic modifications of these receptors is limited: there was an early report that muscarinic receptors undergo rapid changes after an acute stress [8], as well as it was recently shown that particularly M4 in the entorhinal cortex suffers the influence of adrenal hormones [25].

Finally, it must be pointed out that MT3 caused no evident effects in the open-field habituation task (Fig. 3a and b). Hence, the M4 receptors in the dorsal hippocampus seem not to be involved in memory retrieval process for this task suggesting that the muscarinic system demands some degree of aversiveness in order to be recruited, a phenomenon also observed regarding other neuromodulatory systems [1,9,39].

Acknowledgements

This research was supported by fellowships and grants from the CAPES (MEC), CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), FAPERGS and International Foundation for Science (IFS), Stockholm. Authors acknowledge Thiago Henriques, Bruna Pasqualini Genro, Ana Paula Aguiar, Jonathan T. Ramos, Verónica Cheli and Zelma Regina V. de Almeida for their helpful assistance in the experiments.

References

- [1] Alvares LO, Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VMB, et al. Amnesic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2005;83:119–24.
- [2] Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM, et al. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 2003;6:51–8.
- [3] Auerbach JM, Segal M. A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1994;72:2034–40.
- [4] Barros DM, Mello e Souza T, De David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1, b-noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res* 2001;124:1–7.
- [5] Bartus RT, Dean RLI, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982;217:408–17.

- [6] Bradley KN. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol Ther* 2000;85:87–109.
- [7] Caulfield MP, Birdsall NJ. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998;50:279–90.
- [8] Estevez EE, Jerusalinsky D, Medina JH, De Robertis E. Cholinergic muscarinic receptors in rat cerebral cortex, basal ganglia and cerebellum undergo rapid and reversible changes after acute stress. *Neuroscience* 1984;13:1353–7.
- [9] Ferreira AR, Oliveira LF, Blanco C, Kornisiuk E, Sánchez G, Daroit D, et al. Role of hippocampal m1 and m4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74:411–5.
- [10] Figenschou A, Hu GY, Storm JF. Cholinergic modulation of the action potential in rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 1996;8:211–9.
- [11] Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, et al. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon* 1998;36:1635–40.
- [12] Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 1992;58:16–26.
- [13] Jerusalinsky D, Harvey AL. Toxins from mamba venoms: small proteins with selectives for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trend Pharmacol Sci* 1994;15:424–30.
- [14] Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* 1997;22:507–15.
- [15] Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Bernabeu R, Izquierdo I, Cerveñansky C. Muscarinic toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes with agonist-like actions. *Toxicon* 1995;33:389–97.
- [16] Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt JA, Alonso M, Rial Verde E, et al. Muscarinic toxins selective for M4 receptors impairs memory in the rat. *NeuroReport* 1998;9:1407–11.
- [17] Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt JA, Ferreira AR, Rial Verde E, et al. Muscarinic toxins novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* 2000;38:747–61.
- [18] Kimura F, Baughman RW. Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 1997;77:709–16.
- [19] Kornisiuk E, Jerusalinsky D, Cerveñansky C, Harvey AL. Binding of muscarinic toxins MTx1 and MTx2 from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* to cloned human muscarinic cholinergic receptors. *Toxicon* 1995;33:11–8 [Corrigendum: *Toxicon* 1995; 33:1111].
- [20] Lanzotti VB, de Oliveira Alvares L, Henriques TP, Diehl F, Genro BP, Fürstenau de Oliveira L, et al. Intrahippocampal bicuculline and baclofen counteract the post-training amnesic effect of MT3, a selective M4 antagonist (personal communication, 2006). *Eur J Neurosci*, submitted for publication.
- [21] Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13526–41.
- [22] Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ. Expression of m1–m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 1995;15:4077–92.
- [23] McGaugh JL. Memory—a century of consolidation. *Science* 2000;287:248–51.
- [24] Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B, et al. Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res* 2003;960:259–62.
- [25] Mulugeta E, Chandranath I, Karlsson E, Winblad B, Adem A. Temporal and region-dependent changes in muscarinic M4 receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of adrenalectomized rats. *Exp Brain Res* 2006;173:309–17.
- [26] Nathanson NM. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci* 1987;10:195–236.
- [27] Olianias MC. Identification of rat brain muscarinic M4 receptors coupled to cyclic AMP using the selective antagonist muscarinic toxin 3. *Eur J Pharmacol* 1997;357:235–42.
- [28] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.
- [29] Potter LT. Snake toxins that bind specifically to individual subtypes of muscarinic receptors. *Life Sci* 2001;68:2541–7.
- [30] Quillfeldt JA, Schmitz PK, Walz R, Bianchin M, Zanatta MS, Medina JH, et al. CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA reverses the effect. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;48:437–40.
- [31] Rosat R, Da-Silva RC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I. Memory consolidation of a habituation task: role of *N*-methyl-*D*-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:267–73.
- [32] Rouse ST, Levey AI. Expression of m1–m4 muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in septohippocampal neurons and other identified hippocampal afferents. *J Comp Neurol* 1996;375:406–16.
- [33] Rouse ST, Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* 1997;380:382–94.
- [34] Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* 1999;64:501–9.
- [35] Segal M, Auerbach JM. Muscarinic receptor involved in hippocampal plasticity. *Life Sci* 1997;60:1085–91.
- [36] Szapiro G, Galante JM, Barros DM, Stein M, Vianna MRM, Izquierdo LA, et al. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochem Res* 2002;27:1491–8.
- [37] Taylor P, Brown JH. Acetylcholine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed. New York: Raven Press; 1999. p. 231–60.
- [38] Van der Zee EA, Luiten PG. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 1999;58:409–71.
- [39] Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Rodrigues C, Sant’Anna MK, et al. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Braz J Biol Med Res* 2001;34:233–40.
- [40] Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 1995;375:484–7.

Title

Differential role of the hippocampal muscarinic M₄ receptors in the consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction of aversive memories

Felipe Diehl^{1,2}, Josué Haubrich¹, Douglas Senna Engelke¹, Lindsey de Freitas Cassini¹, Lucas de Oliveira Alvares^{1,2}, Robson Scheffer-Teixeira¹, Carlos Cerveñansky³, Edgar Kornisiuk⁴, Diana Jerusalinsky⁴ and Jorge Alberto Quillfeldt^{1,2,#}.

1. Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43422, room 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brasil
2. Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 500, Room107 (Campus Centro), CEP 90.046-900, Porto Alegre, RS, Brasil.
3. Unidad de Bioquímica Analítica, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.
4. Instituto de Biología Celular & Neurociencia “Prof. Eduardo De Robertis”, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Paraguay 2155, 2do piso, 1121 Buenos Aires, Argentina.

Corresponding author: Dr. Jorge A. Quillfeldt

Address: Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43422, room 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone +55(51)3308-7604

Fax +55(51)3308-7003

E-mail address: quillfe@ufrgs.br

Running Title: **M₄ muscarinic receptors, Hippocampus and Memory**

Abstract

The cholinergic muscarinic system plays a central role in learning and memory, yet little is known about the specific roles of each receptor subtype. The shortest path to understand their contribution may be the availability of very selective pharmacological tools, such as muscarinic toxins (MTs) from *D. angusticeps*. The hippocampus M4 subsystem, for instance, was shown to take part in the modulation of memory consolidation and retrieval. The memory phenomenon, by its turn, is being recently unveiled as a much more complex set of processes than previously thought, encompassing post-retrieval situations such as reconsolidation and extinction, each with its particular mechanisms. The scope of this study is to explore the involvement of the hippocampal cholinergic M4 muscarinic subsystem on the consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction of memories. MT3, a very selective M4 antagonist, and the less selective antagonist scopolamine were infused bilaterally into the rat CA1 area, and their effects studied in a contextual fear conditioning task (CFC). When infused immediately after training, both treatments caused disruption of the memory consolidation, however, only MT3 was effective when infused 20 minutes before the test session, and the effect, was the opposite, i.e., memory facilitation. Moreover, MT3, but not scopolamine, enhanced the reconsolidation of CFC following its infusion immediately after a short reactivation session of 3 minutes, or blocked its extinction after a long lasting reactivation session of 25 minutes (both extinction consolidation and extinction retrieval were blocked by MT3). These results suggest an endogenous positive modulation of the cholinergic muscarinic system present during the consolidation or the extinction of an aversive memory, but an opposite action during memory retrieval or memory reconsolidation. A circuit-based hypothesis is advanced to explain these results, suggesting a plastic modification of the position of the presynaptic M4 heteroreceptors, respectively being upon GABAergic inhibitory interneurons, or upon glutamatergic excitatory cells. Some additional observations support the idea that these four memory processes are different, yet still interrelated in different levels.

Keywords

m4 receptors

hippocampus

fear conditioning

retrieval and reactivation of consolidated memories

memory reconsolidation vs. memory extinction

Introduction

The Cholinergic system is long known to be involved in learning and memory processes (Deutsch 1971; Jerusalinsky et al. 1997; Hasselmo 1999, 2006; Rogers and Kesner 2003, 2004). In the CNS, acetylcholine acts as an endogenous modulator of several cellular mechanisms that may lie behind these cognitive functions, such as, e.g., long-term potentiation (Segal and Auerbach 1997; Hasselmo 2006). Cholinergic receptors are expressed throughout the brain in each of its five isoforms M1-M5 (Caulfield and Birdsall 1998), with different concentrations of each subtype at different brain regions and, sometimes, with more than one subtype expressed in the same cell (Rouse et al. 1999; Van der Zee and Luiten, 1999; Wess 2004). Subtypes M1, M3 and M5 interact preferentially with the G_q protein family, stimulating inositol phosphate synthesis, while subtypes M2 and M4 are usually coupled to adenylyl cyclase through G_i proteins, therefore inhibiting cAMP production (Nathanson 1987; Caulfield and Birdsall 1998; Thathiah and De Strooper 2009). The importance of the cholinergic modulation in cognitive processes can be illustrated by some Alzheimer's Disease characteristics, such as a deficit of acetylcholine release and an impaired coupling of the muscarinic acetylcholine receptors (MACHRs) to heterotrimeric GTP-binding proteins (Coyle et al. 1983; Levey 1996; Wilkinson et al. 2004; Thathiah and De Strooper 2009). Of particular interest is the decrease in M4 receptor binding in the hippocampus of Alzheimer's patients compared to controls (Mulugeta et al. 2003).

The hippocampus is extensively innervated by cholinergic fibers coming from the medial septum/diagonal band complex (Mesulam et al. 1983), and the action of the released acetylcholine is mediated mainly by MACHRs (Aubert et al. 1992; Court et al. 1997). This modulatory cholinergic pathway acts both at the cellular and the network levels, being also the framework of the theta rhythm (Teitelbaum et al. 1975; Figenchou et al. 1996; Hasselmo 2006). In relation to memory, a considerable number of systemic studies have corroborated the now "classic" agonists-enhance-antagonists-disrupt scenario, whose effects that have been generally attributed to the hippocampus (Rogers and Kesner 2003, 2004; Hasselmo 1999, 2006). This have been mostly confirmed by muscarinic agonists or antagonists locally infused into the dorsal hippocampus. Thus, for example, the antagonist

scopolamine impairs memory consolidation (Izquierdo et al. 1992; Wallenstein and Vago 2001) and the agonist oxotremorine enhances the memory of an inhibitory avoidance task (Baratti et al. 1979; Izquierdo et al. 1992). That would be the end of the story if it were not for the diversity of receptor subtypes: the low selectivity of drugs such as oxotremorine and scopolamine does not clarify which of the mAChRs were involved. Nevertheless, the classic systemic effect was replicated by local infusions possibly because M1 are the most abundant receptors in the hippocampus (Levey et al. 1991) and, also, the preferred target for these nonspecific drugs (Freedman et al. 1988; Caulfield and Birdsall 1998). The central role played by M1 receptors in memory consolidation may be due to the colocalization with NMDA receptors in hippocampal pyramidal neurons, since coactivation with NMDA receptors results in amplified NMDA currents (Figueredo et al. 2008). Moreover, M1 receptors are required for activation of MAPK, PKC and CAMKII, important enzymes involved in synaptic plasticity (Segal and Auerbach 1997).

During learning, reversible physiological changes in synaptic transmission take place in the nervous system, and these changes must stabilize for the memory to persist. The establishment of a long term memory trace begins with a labile phase named consolidation (McGaugh 1966; 2000; Dudai 2004) that requires a series of biochemical steps that culminate in protein synthesis (Lamprecht and LeDoux 2004; Izquierdo et al. 2006; Bekinschtein et al. 2008). Further processes involving gene expression and even epigenetic mechanisms, combined to assure persistence for longer periods, specially in mammals (Guzowski et al. 2001; Mamiya et al. 2009; Roozendaal et al. 2010). The retrieval, or recall, of this memory trace takes place during the reexposure to the learning context, with or without the previously delivered stimuli, and *per se* does not involve the need of protein synthesis (Davies and Squire, 1984; Szapiro et al. 2002).

The retrieval session may not just be a passive process: depending on how the reexposure session is performed – the so-called reactivation - several molecular cascades and even protein synthesis may be again recruited. Thus, a number of authors have shown that already established memories can become transiently labile by a recall session - usually using the conditioned stimulus (CS) as a reminder cue of the original learning presented for

a limited period of time (Misanin et al. 1968; Przybylski and Sara 1997; Sara 2000; Nader et al. 2000; Debiec et al. 2002; Eisenberg et al. 2003; Pedreira and Maldonado 2003; Debiec and LeDoux 2004; Duvarci and Nader 2004). Inhibition of protein synthesis before or immediately after reactivation of a fear memory disrupts the subsequent expression of that modified memory (Nader et al. 2000; Debiec et al. 2002; Dudai and Eisenberg 2004; Suzuki et al. 2004). Actually, according to the time of reexposure to the context - shorter or longer, two potentially dissociable but opposite processes may take place, respectively, reconsolidation or extinction (Debiec et al. 2002; Pedreira and Maldonado 2003; Suzuki et al. 2004; Boccia et al. 2004, 2007; Bouton 2004; Bouton et al. 2006; Bustos et al. 2006; Myers and Davis 2007; Tronson and Taylor 2007; de Oliveira Alvares et al. 2008b). A number of different endogenous systems was shown to be involved in the modulation of both processes, such as Noradrenergic (Debiec and LeDoux 2006), Glutamatergic (Rose and Rankin 2006, Diergaarde et al. 2008; Sherry and Crowe 2008), GABAergic (Bustos et al. 2006; Amaral et al. 2007), CB1 (Kobilo et al. 2007; De oliveira Alvares et al. 2008a,b) and the muscarinic cholinergic system (Boccia et al. 2004, 2006).

Since each MACHR subtype may have a different role in learning and memory modulation, contradictory results frequently arise (Parent and Baxter 2004; Cobb and Davies 2005). Indeed, there is a high concentration of both M1 and M4 receptor subtypes in the hippocampus (Rouse and Levey 1996), which may explain the different effects observed sometimes (Jerusalinsky et al. 1997, 1998; Barros et al. 2001, 2002; Ferreira et al. 2003; Boccia et al. 2003; Diehl et al., 2007; Rezaiof et al. 2009). The availability of selective pharmacological tools can be the shortest path to understand the contribution of each receptor (Jerusalinsky et al. 2000; Kamsler et al 2010). Among the most selective muscarinic agents available are the Muscarinic Toxins (MTs) extracted from the venom of *Dendroaspis* snakes (Adem et al. 1988; Max et al. 1993; Jerusalinsky et al. 1997, 2000; Olianias et al. 1998; Potter 2001; Servent and Fruchart-Gaillard 2009). Thus, MT2 was shown to be both a M1 agonist and M4 antagonist, while MT3 acts as a highly selective M4 antagonist (Jerusalinsky et al. 2000; Max et al. 1993; Olianias et al. 1998; Sánchez et al. 2009a): MT2 has a 4-fold higher affinity for M1 than for M4 receptors ($K_i=360$ and 1200 nM, respectively), and rather low or negligible affinity for the other subtypes, while MT3

has a much higher affinity for M4 than for M1 receptors ($K_i=1,2$ and 250 nM, respectively).

We have previously shown that the infusion of MT2 into the dorsal hippocampus of rats immediately after training improved performance in the step-down inhibitory avoidance task, while pirenzepine, a somewhat selective M1 antagonist, was amnesic (Ferreira et al. 2003). The intrahippocampal infusion of MT3, on the other hand, was *amnesic* upon the consolidation of this aversive task (Jerusalinsky et al. 1997, 1998; Ferreira et al. 2003), has disrupted long-term potentiation in CA1 (Sánchez et al. 2009b) and, surprisingly, caused memory *facilitation* when infused before the test in the same behavioral task (Diehl et al. 2007): these opposed results suggests different roles for the M4 modulation in each of the two different phases of memory, consolidation and retrieval.

The conversion of the MT3 effect from amnesic into facilitatory allow us to suppose some plasticity events taking place in the M4 modulation, at least in the dorsal hippocampus. To this date, there are few previous studies dealing with the role of M4 subsystem in memory (Harvey et al. 1998; Jerusalinsky et al. 1998, 2000; Ferreira et al. 2003; Diehl et al. 2007; Sánchez et al. 2009a,b; Jerusalinsky et al. 2000; Kamsler et al 2010) or in other affective/cognitive mechanisms (Degroot and Nomikos 2006; Mulugeta et al. 2006; Betz et al. 2007), basically due to shortage of satisfactory pharmacological tools. Therefore, the aim of the present study is to investigate the role of the hippocampal M4 subsystem in four “phases” of memory processing - consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction - of the contextual fear conditioning (CFC) task.

Material and Methods

Male Whistar rats (age 2-3 months, weight 250-300g) from our breeding colony were used in this experiment. Animals were housed in plastic cages, 4-5 to a cage, under a 12h light/dark cycle and at a constant temperature of $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, with water and food *ad libitum*. All animals were anesthetized by a mixture of Ketamine and Xilazine (i.p., 75 and 10mg/Kg, respectively) and bilaterally implanted with a 27-gauge guide cannulae aimed at AP -4.2mm (from bregma), LL $\pm 3.0\text{mm}$, DV 1.5mm, just 1.0mm above area CA1 of the dorsal hippocampus (adjusted from [Paxinos and Watson 1998](#)).

Once recovered from surgery (48h), the animals were submitted to a behavioral task of Contextual Fear Conditioning (CFC). The conditioning chamber consisted in an automatically operated brightly illuminated box with a grid floor (25.0 x 25.0cm grid of parallel 0.1cm caliber stainless steel bars spaced 1.0cm apart) which footshocks could be delivered. In the conditioning trial (training session), rats were placed in the chamber for 2 min and received a 2-sec 0.5 mA foot-shock twice, with an interval between the shocks of 30 sec. Before return to the home cages, the animals were kept in the conditioning environment for an additional minute. Twenty four hour later, the test session takes place where the animals were re-exposed to the same context for 4 minutes without receiving foot-shocks.

In the reconsolidation or extinction protocols, the animals were re-exposed to the same context, twenty four hours later the training session, for 3 or 25 minutes (reactivation session), respectively, without receiving foot-shock. The 4 minutes test session takes place twenty-four hours later the reactivation. A control group was submitted to the same procedure, but without the memory reactivation session. Freezing behavior (defined as complete lack of movement, except for respiration) was registered in percentage of time session by an experienced observer (blind to the treatment conditions) and employed as a memory index.

At the time of infusion, immediately after training session, 20 minutes pre-test session or immediately after the reactivation session, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannulae, with its tip protruding 1.0mm beyond the guide cannulae and aimed at the pyramidal cell layer of CA1 in the dorsal hippocampus (Figure 1). A bilateral

infusion of 0.5 μ l was performed at a 20 μ l/h rate. Animals were divided into 3 groups, each receiving one of these drugs: scopolamine, low selective cholinergic muscarinic antagonist (Sigma, 10.0 μ g per side/hemistructure injected); MT3, selective M4 receptors antagonist (2.0 μ g per side/hemistructure injected - purified from lyophile by us according to [Jerusalinsky et al. 1998](#)); or its vehicle (phosphate buffered saline - PBS). The selected doses were chosen on the basis of previous experiments in our Lab ([Diehl et al. 2007](#)).

Statistical analysis of the behavioral data was limited to the 170 animals with correct cannulae placements (see Figure 1). Since the freezing percentage in the test or reactivation session passed a normality test (Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors' correction), differences among groups were evaluated by parametric tests such as t test and One-way ANOVA with Tukey's all pair wise multiple comparison *post hoc* test ([Zar 1999](#)).

All experimental procedures were performed in strict accordance to the recommendations of Brazilian Society for Neurosciences (SBNeC), the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and the International Brain Research Organization (IBRO), being previously approved by the Ethics on Research Review Committee of our institution, UFRGS, meaning that they are in compliance with the U.S. National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (publication no. 85-23, revised in 1985), the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), and the Brazilian law (Law no. 6.638/1979).

Results

Experiment 1 - *Effects of cholinergic antagonists upon memory consolidation of CFC*

Rats received intrahippocampal bilateral infusion either of the muscarinic antagonist scopolamine (2.0 or 10.0 µg/side), or the M4 selective antagonist MT3 (2.0 µg/side), or their vehicle (PBS: control group) immediately after a contextual fear conditioning (CFC) training session (Figure 1). One-way ANOVA revealed a significant difference among the infused groups in the test session ($F(3,41)=13.899$, $P<0.001$), and the results were ordered by the *post hoc* test of Tukey: groups infused with scopolamine 10 µg/side or MT3 2 µg/side froze significantly less than the control group ($P<0.001$), indicating an amnesic effect, i.e., both posttraining treatments disrupted the consolidation process in these animals.

Experiment 2 - *Effects of cholinergic antagonists upon memory retrieval of CFC*

In the following experiment, rats received intrahippocampal bilateral infusion either of the muscarinic antagonist scopolamine (10.0 µg/side – the concentration effective in experiment 1), or the M4 selective antagonist MT3 (2.0 µg/side), or their vehicle (PBS: control group) 20 min before a CFC test session (Figure 2). One-way ANOVA revealed a significant difference among the infused groups in the test session ($F(2,27)=4.381$, $P<0.022$), however only the MT3-treated group showed a significantly higher freezing time compared to the controls ($P= 0.021$, Tukey's *post hoc* test), i.e., this selective antagonist was able to cause a facilitatory effect upon the memory retrieval of this task.

Experiment 3 - *Effects of cholinergic antagonists upon memory reconsolidation of CFC*

Studying postreactivation effects of these antagonists we next proceeded to infuse scopolamine (10 µg/side), MT3 (2 µg/side) or their vehicle (PBS) immediately after a 3 min reactivation session, i.e., a re-exposure to the CFC CS without the US (Figure 3). There was no significant difference among groups in the reactivation session (One-Way

ANOVA), but the MT3-infused groups was significantly different from its control group, both in the first test session ($F(2,29)=7.129$, $P= 0.003$, One-Way ANOVA) - that took place only 24 h after reactivation - and in the second test session, five days later ($F(2,29)=6.498$, $P= 0.005$, One-Way ANOVA): this difference was confirmed by the *post hoc* test of Tukey, respectively with $P=0.002$ (in test 1) and $P= 0.003$ (test 2). These results show that MT3 was facilitatory also upon memory reconsolidation of this aversive task. Furthermore, the % freezing values of the control group tests were not significantly different from the reactivation session values ($P=0.288$, ANOVA for Repeated Measures), i.e., there is no extinction taking place here.

Experiment 4 - Effects of cholinergic antagonists upon consolidation of extinction of CFC

A longer reactivation session leads to a memory extinction, so we studied the effects of these antagonists when infused immediately after a 25 min reactivation session where the US was absent (Figure 4). Since treatments were all applied after the reactivation session, it was predictable that all groups exhibited a similar extinction curve, such as the one we obtained (b; $P<0.001$, ANOVA for Repeated Measures). However, considering that (i) in the test session, the % freezing time of MT3-treated animals differed significantly from its control group (a; $P= 0.010$, Tukey *post hoc* test after an One-Way ANOVA with $F(2,28)=5.298$, $P=0.011$), (ii) the control group % freezing was significantly smaller in the test session than in the first 4 min of the reactivation session (c; $P= 0.005$, paired t test), and that (iii) the MT3-treated group did not differ significantly from its corresponding first 4 min average % freezing ($P=0.955$, paired t test), we can suggest that the selective M4 receptor antagonist, but not the less selective scopolamine (which appears to have a partial effect only), is causing the disruption of the consolidation of extinction, the best explanation for the high % freezing displayed in the test session.

Experiment 5 - Effect of M4 antagonist upon retrieval of extinction of CFC

Next, we have studied the effect of the selective M4 antagonist MT3 when infused 20 min before the test session performed 24h after the extinction session (a 25 min

reactivation session without the US). **Figure 5** shows an extinction curve (b; $P < 0.001$, ANOVA for Repeated Measures) similar between the groups, both treated after the reactivation session. A significant difference in the test session % freezing time compared to the first 4 min of the reactivation session was found only for the control group (c; < 0.001 , paired t test), not for the MT3-treated group ($P = 0.339$, paired t test). Moreover, MT3-treated animals were significantly different from its control group in the test session (a; $P < 0.001$, Student's t test), indicating an inhibition of the extinction recall.

Experiment 6 - *Effect of cholinergic antagonists upon CFC memory without reactivation*

Rats injected with scopolamine and MT3, but not exposed to the memory reactivation or extinction sessions froze similarly to PBS infused controls (**Figure 6**): one-way ANOVA revealed no effect of any treatment upon the freezing levels displayed 24h after the injection ($F(2,23) = 0.238$, $P = 0.790$). Fear memory appears to be fully consolidated 24h after the acquisition, and any of the effects of scopolamine or MT3 – be it upon memory reconsolidation or extinction – were detected only when the reactivation session was omitted.

Discussion

In order to investigate the modulatory role of M4 muscarinic cholinergic receptor subsystem upon different memory phases – consolidation, retrieval, reconsolidation or extinction (Pedreira and Maldonado 2003; Debiec and LeDoux 2004; Dudai 2004; Boccia et al. 2007b; De Oliveira Alvares et al. 2008b), we trained rats in the contextual fear conditioning (CFC), a hippocampal dependent task with a strong aversive component that can be easily learned in a single trial. It is a pavlovian-like conditioning procedure where the unconditioning stimulus (context box) is paired with a conditioning stimulus (footshock) to produce a conditioned response - freezing (Bustos et al. 2006). Effects upon acquisition were not studied here once they may involve non-mnemonic processes (McGaugh 1966; 2000). MT3, one of the muscarinic antagonists we used in these experiments, is 214 times more selective for M4 than M1 receptors, making it one of the best pharmacological tools to study this subsystem of receptors (Jerusalinsky et al. 1997, 1998).

The first experiment indicates that post-training intra-hippocampal administration of both 10 µg/side of scopolamine - a non-selective cholinergic muscarinic antagonist, or MT3 (2 µg/side), can impair retention of the CFC task in the rat (Figure 1). This result is in agreement with previous findings (Izquierdo et al. 1992) and add to the classical observation that central or systemic administration of anticholinergic drugs, or even lesions of the cholinergic system, lead to the impairment of memory consolidation (Winkler et al. 1995; Van der Zee and Luiten 1999; Anagnostaras et al. 1999; 2003; Power et al. 2003). In a recent collaboration of our lab we have shown that local infusion of scopolamine or MT3, in concentrations similar to those used here, was also able to disrupt the induction of LTP in the CA1 area (Sánchez et al. 2009b). The involvement of M1 receptors in the consolidation process, as suggested by the scopolamine effect, is well described in the literature (Izquierdo et al. 1992; Jerusalinsky et al. 1998; Ferreira et al., 2003). All things considered, they support the idea of a positive modulatory role of the hippocampal cholinergic muscarinic system upon the memory consolidation process, both through M1 and M4 receptors.

The second experiment (Figure 2) describes a facilitatory effect of MT3, but not of scopolamine, when infused into the dorsal hippocampus 20 minutes *before* the CFC test. Contradictory results have been described sometimes by different authors, and, at least in the case of the hippocampus function, this may be due to the diversity of receptor subtypes/responses and their multiple locations (Parent and Baxter, 2004; Cobb and Davies, 2005). This facilitatory effect, however, is consistent with the one we have observed before with the same selective drug MT3 in a different aversive task – the step-down inhibitory avoidance (Diehl et al. 2007), and may be interpreted in terms of a local inhibitory role of the hippocampal M4 receptors upon the retrieval process. We cannot theorize about other receptor subtypes since we have not studied the effect of scopolamine in this previous work, but it is plausible to assume that M4 receptors are being recruited by the stress level / aversiveness involved (see, e.g., Mulugeta et al. 2006). We have advanced this idea in previous works where intrahippocampal MT3 affected the memory of the inhibitory avoidance, but not of the open field habituation, a non-aversive task, both when infused after training (Ferreira et al., 2003) and pretest (Diehl et al. 2007). An analogous causation was described elsewhere for the endocannabinoid modulation (De Oliveira Alvares et al. 2010).

Few studies have focused on the cholinergic muscarinic modulation of the *retrieval* process, and they generally show the classic antagonists-inhibit-agonists-enhance effect, different from what we have found here. Boccia et al. (2003), for instance, have found an amnesic action of atropine. However, the antagonist was infused systemically and it was not possible to circumscribe which area was responsible for the effect. Intra-amygdala infusion of the muscarinic agonist pilocarpine, on the other hand, was able to improve memory retrieval, reinstating the well known phenomenon of “morphine-induced state-dependent memory retrieval” and compensating for an ineffective s.c. dose of morphine (Rezayof et al. 2009): this facilitatory effect, despite similar, cannot compare to ours since it involves a less selective muscarinic agonist acting upon a different brain structure. The only comparable study is the one from Barros et al. (2001), that describes, among several other results, a blocking effect of pretest scopolamine when infused into the hippocampus

at concentrations 0.4 and 2.0 µg/side. Since 2.0 µg/side of scopolamine was ineffective in the posttraining experiment (Figure 1) we did not check for pretest effects at this or lower concentrations. In reality, 10.0 µg/side of scopolamine was not able to affect memory retrieval either, probably due to its non-selective nature (Figure 2). The apparently conflicting results may be due to differences in the concentrations used, combined with the time of infusion – the closer the infusion is to the test session, the more it tends to interfere with animal performance.

In our view, the fact that MT3 have opposite effects upon the consolidation and the retrieval of memory may be best explained by a Systems Consolidation mechanism (Dudai and Morris 2000), in particular, a modification of the local circuit involved in these processes, such as a receptor subtype being differently expressed in each phase. This idea was partially advanced before (Diehl et al. 2007), when we hypothesized that in the initial phase of the consolidation M4 receptors may be predominant upon the GABAergic interneurons (basket cells) that control Schaeffer's collaterals terminals - here considered a putative engram-recording pathway. Thus, our data suggest a negative modulatory role of the CA1 hippocampal cholinergic muscarinic system when a memory is already consolidated, and MT3 would be blocking memory recall due to a suppression of an endogenous cholinergic "brake" that modulate the GABAergic inhibition.

Literature supports the idea of presynaptic positioning of M4 MACHRs (Rouse et al. 1999; Van der Zee and Luiten, 1999; Wess 2004), where they may reduce neurotransmitter release through the activation of K⁺ channels (Taylor and Brown 1999; Levey 1996; Rouse and Levey 1996; 1997; Rouse et al. 1999). In fact, M4 receptors may be acting either as autorreceptors, controlling the cholinergic tonus, or as heteroreceptors, modulating both inhibitory (GABAergic) or excitatory (glutamatergic) neurons (Segal and Auerbach 1997; Tzavara et al. 2003), and this implies two possibilities from which a circuit-based explanation for our results stems: the terminals upon which the cholinergic modulation is acting may belong either to a glutamatergic excitatory cell, or a GABAergic inhibitory interneuron (Rouse and Levey 1996; 1997; Rouse et al. 1999; Van der Zee and Luiten 1999). Thus, one explanation for the MT3 pre-test facilitatory effect may be that, among

the plasticity events taking place during consolidation, the M4 receptors are now – different from what could be taking place during consolidation ([Figure 1](#)) - being more expressed directly upon the excitatory input to CA1 pyramidal cells, i.e., upon the CA3-borne Schaeffer's collaterals. An analogous phenomenon was described for mGlu5 receptors after LTP induction at the perforant path - dentate gyrus synapse ([Manahan-Vaughan et al. 2003](#)). Hayes et al ([2008](#)) have described *in vivo* that the persistent enhancement of hippocampal excitatory transmission induced by the muscarinic antagonists methoctramine and gallamine may be interpreted as being caused by the M2 muscarinic *autoreceptor* blockage ([Kitaichi et al. 1999](#)) through a NMDA receptor-independent persistent synaptic enhancement that also required the activation of PKA and PKM ζ . M2 and M4 have similar transduction mechanisms, and both may be acting as inhibitory presynaptic autoreceptors controlling ACh release ([Vannucchi et al. 1997](#); [Carey et al. 2001](#)), so we cannot overlook the putative heteroreceptor actions they may be involved with ([Wess 2004](#); [Scheiderer et al. 2008](#); [Lopes-Aguiar et al. 2008](#); [Kamsler et al. 2010](#)).

Further exploring the memory stability after consolidation, recent work suggest that consolidated memories, when reactivated by retrieval cues, may be transiently sensitive to the same treatments that affect memory consolidation ([Nader et al. 2000](#); [Sara 2000](#); [Debiec et al. 2002](#); [Dudai and Eisenberg 2004](#); [Suzuki et al 2004](#)). For instance, reactivated memories return to a labile state which is sensitive to protein synthesis inhibitors ([Nader et al. 2000](#); [Suzuki et al. 2004](#); [De Oliveira Alvares et al. 2008b](#)). The duration of the reactivation session defines the process: *reconsolidation* demands a brief reactivation session, whereas *extinction* takes place after longer CS presentation (or after repeated presentations of the CS without the US). This vulnerability, however, decreases over time, suggesting that memory reactivation triggers a rebuilding process of the original trace ([Sara 2000](#); [Bustos et al. 2006, 2009](#)).

In this respect, [Figure 3](#) shows a facilitatory effect of MT3, but not of scopolamine, upon memory reconsolidation – the infusion took place right after a 3 min reactivation session ([Bustos et al. 2006](#); [De Oliveira Alvares et al. 2008b](#)). Disregarding the systematic behavioral interference due to the pretest manipulations, the effect was similar to that

observed upon retrieval (Figure 2). Neither of these drugs, in these doses, caused any *per se* effect when the reactivation session was omitted (Figure 6), supporting the idea of a purely cognitive effect of the reactivation session.

The facilitatory effect resembles the one observed in the retrieval, both in the response level (compare Figure 2 to test1 in Figure 3) and the specific M4 modulation, once scopolamine was ineffective. The result agrees with some recent findings, such as the study where i.c.v. infusion of hemicholinium, a specific inhibitor of high-affinity choline uptake, caused a deleterious effect on retention only when given immediately after memory reactivation (Boccia et al. 2004; 2007). This is consistent with the idea of reconsolidation as a protein synthesis dependent relabilization process undergone by already consolidated memories (Misanin et al., 1968; Przybylski and Sara, 1997; Pedreira and Maldonado, 2003; Debiec and LeDoux, 2004; Duvarci and Nader, 2004; Bustos et al. 2006; De Oliveira Alvares et al. 2008b): at least it can suggest the hypothesis that M4 plasticity took place during the first consolidation – changing predominance of these receptors in CA1 from inhibitory to excitatory terminals – and that this state remained unaltered as would be expected for an already recorded memory trace. Interestingly, this observation raise the question of how adequate the “reconsolidation” label is when applied to this phenomenon: the effect is quite the opposite of what we observed during “consolidation”, when that memory was new (see Figure 1), and at least the response of the M4 modulatory subsystem differs in both processes.

Memory extinction - when the animal learns that the presentation of the CS no longer predicts the occurrence of the US - was investigated in further details. Since it is widely considered as the acquisition of a new, transient trace, without the erasure of the original one (Bouton, 2004; Bouton et al., 2006; Myers and Davis, 2007), it is only logical to speak about a “consolidation of extinction” and a “retrieval of extinction” (Quirk and Mueller 2008; Duvarci et al., 2006; Lin et al., 2003; Santini et al., 2001). The effects of the muscarinic antagonists were investigated for these two situations, respectively with a post-reactivation/extinction (Figure 4) and a pretest (Figure 5) infusion: in both cases MT3 disrupted this new memory. Since scopolamine was ineffective upon the consolidation of

extinction (Figure 4), it was not tested upon retrieval (Figure 5). The reactivation session was necessary for the MT3 to be effective (Figure 6). Both figures show that a single but prolonged re-exposure to the conditioned environment without the US led to a gradual reduction of the fear response along the reactivation session, resulting in memory extinction (Suzuki et al. 2004; De Oliveira Alvares et al. 2008b). The disruptive effect of the M4 antagonist is consistent with the enhancement caused by the agonist oxotremorine when infused into the basolateral amygdala upon the consolidation of extinction (Boccia et al. 2009).

Different from what was observed for the first memory consolidation, however, the deleterious effect of MT3 upon the consolidation of extinction (Figure 4) remained intact up till the retrieval session (Figure 5). If it is true that extinction is the acquisition of a new memory without removal the original one (Bouton, 2004; Bouton et al., 2006; Myers and Davis, 2007) it seems that the putative involvement of M4 plasticity in the CA1 area observed for memories consolidated for the first time here is not taking place for the second trace. This suggest a difference in their nature, a phenomenon first described here. Considering that spontaneous recovery of the original trace is a defining property of classical extinction (Quirk and Mueller 2008; Bouton et al. 2006), it is possible that this, and the new, overlapping memory trace, differ in their hierarchical importance - then the different course of putative local plasticities. In some way, however, they would remain connected, with the second trace depending on the stronger, initially obliterated original one.

That both postreactivation situations - extinction and reconsolidation – exhibit opposite responses for the same pharmacological manipulation was something we have already observed for the CA1 endocannabinoid modulation, in this same behavioral task (De Oliveira Alvares et al. 2008b). Indeed, the similarity of the two modulatory systems is remarkable: both are based on presynaptic, inhibitory metabotropic receptors, that may be located either upon excitatory or inhibitory neurons, and selective antagonists infused in the same four memory processing situations above – consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction – resulted in exactly the same qualitative results: disruption of consolidation

and extinction and facilitation of retrieval and reconsolidation (De Oliveira Alvares et al. 2008a,b). This suggests that endocannabinoids - through CB1 receptors, and acetylcholine - through M4 receptors, may be collaborating as synergic or even redundant modulatory systems in the CA1 area in what concerns to memory plasticity events (Christopoulos and Wilson 2001; Tzavara et al. 2003b; Falenski et al. 2009; McPartland et al. 2008; Lau et al. 2008).

The present findings suggest a differential M4 muscarinic modulatory role in each different stage of aversive memory processing in the CA1 area of the dorsal hippocampus. Some suggestions can be drawn:

- (a) the amnesic effect of MT3 upon consolidation “shifts” to a facilitatory one upon retrieval (after 24h), suggesting that the M4 presynaptic receptors endure some kind of plasticity, possibly changing anatomical targets (and this would be a Systems Consolidation phenomenon);
- (b) the facilitatory effect upon reconsolidation is similar to the one observed upon retrieval, consistent with the idea that they both act upon the same memory trace;
- (c) at least from the M4 point of view, reconsolidation is very different from consolidation;
- (d) the amnesic effect upon the consolidation of extinction is similar to that observed upon a first-time consolidated memory, which is in agreement with the idea of extinction as the acquisition of a new memory;
- (e) contrary to what was seen in the first-time memory process, there was no “shift” of the MT3 effect between the consolidation and the retrieval of an extinction trace, suggesting the absence of further plasticity events which, in turn, can explain the weaker, spontaneously degrading nature of this second trace;
- (f) also from a M4 standpoint, reconsolidation exhibits an opposite response profile compared to extinction, similarly to what was described for the endocannabinoids, another presynaptic modulatory system.

Acknowledgements

This research was supported by fellowships and grants from the CAPES (MEC), CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), International Foundation for Science (IFS, Stockholm), and FINEP (“Rede Instituto Brasileiro de Neurociências” - IBN-Net, No. 01.06.0842-00). Authors would like to acknowledge Fabiana S. dos Santos, Ana Paula Crestani, Querushe Klippel Zanona and Zelma Regina V. de Almeida for her helpful assistance in the experiments.

Figure Legends

Figure 1 – Effect of bilateral intrahippocampal infusion of scopolamine (2 or 10 $\mu\text{g}/\text{side}$), MT3 (2 $\mu\text{g}/\text{side}$) or their vehicle (PBS), upon percentual *freezing* time in a test session performed 24h after a Contextual Fear Conditioning (CFC) training session. The treatment was performed immediately after the training session. The diagram above the histogram depicts the corresponding experimental design. Data expressed as Mean \pm S.E.M. of percentual freezing time in a 4 min test session. N= 13, 10, 13 and 9, respectively. (a) significantly different from the control group ($P < 0.001$, Tukey *post hoc* test).

Figure 2 – Effect of bilateral intrahippocampal infusion of scopolamine (10 $\mu\text{g}/\text{side}$), MT3 (2 $\mu\text{g}/\text{side}$) or their vehicle (PBS), upon percentual *freezing* time in a test session performed 24h after a Contextual Fear Conditioning (CFC) training session. The treatment was performed 20 min before the test session. The diagram above the histogram depicts the corresponding experimental design. Data expressed as Mean \pm S.E.M. of percentual freezing time in a 4 min test session. N= 11, 10 and 9, respectively. (a) significantly different from the control group ($P = 0.021$, Tukey *post hoc* test).

Figure 3 – Effect of bilateral intrahippocampal infusion of scopolamine (10 $\mu\text{g}/\text{side}$), MT3 (2 $\mu\text{g}/\text{side}$) or their vehicle (PBS) immediately after a 3 min reactivation session (re-exposure to the context without the US) of a contextual fear conditioning memory. The diagram above the histogram depicts the corresponding experimental design. Data are the mean \pm S.E.M. of percentual *freezing* time of rats, either in the reactivation session, or in each of the 4 min test sessions. N= 11, 10 and 11, respectively. There is no significant difference among groups in the reactivation session (One-Way ANOVA). (a) significantly different from the control group in the same session, respectively in test 1 ($P = 0.002$, Tukey *post hoc* test) and in text ($P = 0.003$, Tukey *post hoc* test).

Figure 4 – Effect of bilateral intrahippocampal infusion of scopolamine (10 µg/side), MT3 (2 µg/side) or their vehicle (PBS) immediately after a 25 min reactivation session (re-exposure to the context without the US) of a contextual fear conditioning task. The diagram above the histogram depicts the corresponding experimental design. Data are the mean \pm S.E.M. of percentual *freezing* time of rats, either in the reactivation session, or in the 4 min test session. Graph displays the average % freezing for successive 2.5 min intervals. N= 9, 10 and 12, respectively. There is no significant difference among groups in the reactivation session (ANOVA for Repeated Measures). (a) significantly different from the control group in the same session (P= 0.011, Tukey *post hoc* test); (b) significant effect of time in the reactivation session (P<0.001, ANOVA for Repeated Measures); (c) significantly different from average % freezing of the first 4 min in the reactivation session (P= 0.005, paired t test).

Figure 5 – Effect of bilateral intrahippocampal infusion of MT3 (2 µg/side) or its vehicle (PBS) 20 min before the test session taking place 24h after a 25 min reactivation session (re-exposure to the context without the US) of a contextual fear conditioning task. The diagram above the histogram depicts the corresponding experimental design. Data are the mean \pm S.E.M. of percentual *freezing* time of rats, either in the reactivation session, or in the 4 min test session. Graph displays the average % freezing for successive 2.5 min intervals. N= 9 and 12, respectively. There is no significant difference among groups in the reactivation session (ANOVA for Repeated Measures). (a) significantly different from the control group in the same session (P<0.001, t test); (b) significant effect of time in the reactivation session (P<0.001, ANOVA for Repeated Measures); (c) significantly different from average % freezing of the first 4 min in the reactivation session (P<0.001, paired t test).

Figure 6 – Effect of bilateral intrahippocampal infusion of scopolamine (10 µg/side), MT3 (2 µg/side) or their vehicle (PBS) in the contextual fear conditioning task when the

animal is not exposed to a reactivation session. Diagram above describes the behavioral procedure used in this experiment. Data are the mean \pm S.E.M. of percentual *freezing* time rats spent freezing in the 4 min test session, actually the first re-exposure to the training context. N= 8, 9 and 9, respectively. There is no significant difference among groups in the test session (One-Way ANOVA).

Figure 7 – Coronal section of rat dorsal hippocampus stained with cresyl violet to illustrate a typical acceptable needle placement targetting the CA1 area (according to [Paxinos and Watson 1998](#)).

References

- Adem A, Asblom A, Johansson G, Mbugua PM, Karlsson E. 1988. Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. *Biochim Biophys Acta* **968**(3):340-5.
- Amaral OB, Luft T, Cammarota M, Izquierdo I, Roesler R. 2007. Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory. *Behav Brain Res* **180**(2):113-8.
- Anagnostaras SG, Maren S, Sage JR, Goodrich S., Fanselow MS 1999. Scopolamine and pavlovian fear conditioning in rats: dose-effect analysis. *Neuropsychopharmacol* **21**: 731–744.
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnema NP, Nathanson NM, Silva AJ. 2003. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* **6**(1):51-8.
- Aubert I, Araujo DM, Cécyre D, Robitaille Y, Gauthier S, Quirion R. 1992. Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurochem* **58**(2):529-41.
- Baratti CM, Boccia MM, Blake MG, Acosta GB. 2008. Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurobiol Learn Mem* **89**(4):426-40.
- Baratti CN, Huygens P, Miño J, Merlo A, Gardella J. 1979. Memory facilitation with posttrial injection of oxotremorine and physostigmine in mice. *Psychopharmacology* **64**: 85–88.
- Barros DM, Mello e Souza T, De David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, Ardenghi P, Medina JH, Izquierdo I. 2001. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1, b-noradrenergic, serotonergic 1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res* **124**: 1–7.
- Barros DM, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. *Behav Pharmacol* **13**(2):163-7.

- Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(7):2711-6.
- Betz AJ, McLaughlin PJ, Burgos M, Weber SM, Salamone JD. 2007. The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* **194**(3):347-59.
- Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, Romano A. 2007a. Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci* **27**(49):13436-45.
- Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Baratti CM. 2004. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neurosci* **124**(4): 735–741.
- Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM. 2003. Atropine, an anticholinergic drug, impairs memory retrieval of a high consolidated avoidance response in mice. *Neurosci Lett* **345**: 97–100
- Boccia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM. 2007b. Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learn Mem* **13**(3):376–381.
- Boccia MM, Blake MG, Baratti CM, McGaugh JL. 2009. Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiol Learn and Mem* **91**: 93–97.
- Bouton ME, Westbrook FR, Corcoran KA, Maren S (2006) Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* **60**(4):352–360.
- Bouton ME. 2004. A general role for early onset cues and intra-event learning: comment on McDonald and Siegel. *Exp Clin Psychopharmacol* **12**(1):18–19.
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neurosci* **139**(3):831-42.

- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacol* **34**(2):446-57.
- Carey GJ, Billard W, Binch H 3rd, Cohen-Williams M, Crosby G, Grzelak M, Guzik H, Kozlowski JA, Lowe DB, Pond AJ, Tedesco RP, Watkins RW, Coffin VL. 2001. SCH 57790, a selective muscarinic M(2) receptor antagonist, releases acetylcholine and produces cognitive enhancement in laboratory animals. *Eur J Pharmacol* **431**(2):189-200.
- Caulfield MP, Birdsall NJ. 1998. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**: 279–90.
- Christopoulos A, Wilson K. 2001. Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res* **915**(1):70-8.
- Cobb SR, Davies CH. 2005. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol* **562**(Pt 1):81-8.
- Court JA, Lloyd S, Johnson M, Griffiths M, Birdsall NJ, Piggott MA, Oakley AE, Ince PG, Perry EK, Perry RH. 1997. Nicotinic and muscarinic cholinergic receptor binding in the human hippocampal formation during development and aging. *Brain Res Dev* **101**(1-2):93-105.
- Coyle JT, Price DL, DeLong ML. 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation, *Science* **219**: 1184-90.
- Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. 1984. *Psychol Bull* **96**(3):518-59.
- De Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Quillfeldt JA. 2008a. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* **90**:1–9.
- De Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA. 2008b. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neurosci* **154**:1648–1655.
- De Oliveira Alvares L, Engelke DS, Diehl F, Scheffer-Teixeira R, Haubrich J, Cassini Lde F, Molina VA, Quillfeldt JA. 2010. Stress response recruits the hippocampal

- endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learn Mem* **17**(4):202-9.
- Debiec J, LeDoux JE. 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neurosci* **129**(2):267-72.
- Debiec J, LeDoux JE. 2006. Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: treatment implications for PTSD. *Ann N Y Acad Sci.* **1071**:521-4.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* **36**: 527–538.
- Degroot A, Nomikos GG. 2006. Genetic deletion of muscarinic M4 receptors is anxiolytic in the shock-probe burying model. *Eur J Pharmacol* **531**(1-3):183-6.
- Deutsch JA. The cholinergic synapse and the site of memory. 1971. *Science* **174**(11):788-94.
- Diehl F, Oliveira LF, Sánchez G, Camboim C, De Oliveira Alvares L, Lanziotti VB, Cerveñansky C, Kornisiuk E, Jerusalinky D, Quillfeldt JA. 2007. Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. *Behav Brain Res* **177**: 227–231.
- Diergaarde L, Schoffemeer AN, De Vries TJ. 2008. Pharmacological manipulation of memory reconsolidation: towards a novel treatment of pathogenic memories. *Eur J Pharmacol* **585**(2-3):453-7.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**:51-86.
- Dudai Y, Eisenberg M. 2004. Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**: 93–100.
- Dudai Y, Morris RGM. 2000. To consolidate or not to consolidate: what are the questions?. In: *Brain, Perception, Memory. Advances in Cognitive Sciences*. Bolhuis JJ (ed). Oxford University Press, Oxford.
- Duvarci S, Mamou CB, Nader K. 2006. Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* **24**(1):249–260.

- Duvarci S, Nader K. 2004. Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* **24**(42):9269-75.
- Eisenberg M, Kobilko T, Berman DE, Dudai Y. 2003. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* **301**(5636):1102-4.
- Falenski KW, Carter DS, Harrison AJ, Martin BR, Blair RE, DeLorenzo RJ. 2009. Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB(1) receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* **1262**:64-72.
- Ferreira AR, Fürstenau L, Blanco C, Kornisiuk E, Sánchez G, Daroit D, Castro e Silva M, Cerveñansky C, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. 2003. Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **74**(2):411-5.
- Figenschou A, Hu GY, Storm JF. 1996. Cholinergic modulation of the action potential in rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* **8**: 211-219.
- Figueredo LZP, Moreira KDM, Ferreira TL, Fornari RV, De Oliveira MGM. 2008. Interaction between glutamatergic–NMDA and cholinergic–muscarinic systems in classical fear conditioning. *Brain Res Bull* **77**(2-3): 71-6.
- Freedman SB, Beer MS, Harley EA. 1988. Muscarinic M1, M2 receptor binding. Relationship with functional efficacy. *Eur J Pharmacol* **156**(1):133-42.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* **21**(14):5089-98.
- Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quillfeldt JA, Jerusalinsky DA. 1998. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicol* **36**(11):1635-40.
- Hasselmo ME. 1999. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* **3**(9):351-359.
- Hasselmo ME. 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* **16**: 710–715
- Hayes J, Li S, Anwyl R, Rowan MJ. 2008. A role for protein kinase A and protein kinase M zeta in muscarinic acetylcholine receptor-initiated persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* **151**(2):604-12.

- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosci* **29**(9), 496–505.
- Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. 1992. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* **58**(1):16-26.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. 1997. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* **22**: 507–15.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Alonso M, Verde ER, Cerveñansky C, Harvey A. 1998. Muscarinic toxins selective for M4 receptors impairs memory in the rat. *NeuroReport* **9**: 1407–11.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Ferreira A, Rial VE, Durán R, Cerveñansky C. 2000. Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* **38**(6):747-61.
- Kamsler A, McHugh TJ, Gerber D, Huang SY, Tonegawa S. 2010. Presynaptic m1 muscarinic receptors are necessary for mGluR long-term depression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(4):1618-23.
- Kitaichi K, Hori T, Srivastava LK, Quirion R. 1999. Antisense oligodeoxynucleotides against the muscarinic m2, but not m4, receptor supports its role as autoreceptors in the rat hippocampus. *Mol Brain Res* **67**(1):98-106.
- Kobilo T, Hazvi S, Dudai Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. 2007. *Eur J Neurosci* **25**(11):3417-21.
- Lamprecht R., LeDoux J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**(1): 45–54.
- Lau BK, Vaughan CW. 2008. Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal gray. *Mol Pharmacol* **74**(5):1392-8.
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. 1991. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* **11**: 3218–3226.

- Levey AI. 1996. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(24):13541-6.
- Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW. 2003. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci* **23**:8310–8317.
- Lopes Aguiar C, Romcy-Pereira RN, Escorsim Szawka R, Galvis-Alonso OY, Anselmo-Franci JA, Pereira Leite J. 2008. Muscarinic acetylcholine neurotransmission enhances the late-phase of long-term potentiation in the hippocampal-prefrontal cortex pathway of rats in vivo: a possible involvement of monoaminergic systems. *Neurosci* **153**(4):1309-19.
- Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, Kida S. 2009. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci* **29**(2):402-13.
- Manahan-Vaughan D, Ngomba RT, Storto M, Kulla A, Catania MV, Chiechio S, Rampello L, Passarelli F, Capece A, Reymann KG, Nicoletti F. 2003. An increased expression of the mGlu5 receptor protein following LTP induction at the perforant path-dentate gyrus synapse in freely moving rats. *Neuropharmacol* **44**(1):17-25.
- Max SI, Liang JS, Potter LT. 1993. Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors. *J Neurosci* **13**(10):4293-300.
- McGaugh JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* **153**: 1351–1358.
- McGaugh JL. 2000. Memory: a century of consolidation. *Science* **287**: 248–251.
- McPartland JM, Blanchon DJ, Musty RE. 2008. Cannabimimetic effects modulated by cholinergic compounds. *Addict Biol* **13**(3-4):411-5.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neurosci* **10**(4):1185-201.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**(827):554-5.

- Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B, Adem A. 2003. Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res* **960**(1-2):259-62.
- Mulugeta E, Chandranath I, Karlsson E, Winblad B, Adem A. 2006. Temporal and region-dependent changes in muscarinic M4 receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of adrenalectomized rats. *Exp Brain Res* **173**(2):309-17.
- Myers KM, Davis M. 2007. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* **12**(2):120–150.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**: 722–726.
- Nathanson NM. 1987. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci* **10**: 195–236.
- Olianas MC, Adem A, Karlsson E, Onali P. 1998. Identification of rat brain muscarinic M4 receptors coupled to cyclic AMP using the selective antagonist muscarinic toxin 3. *Eur J Pharmacol* **357**(2-3):235-42.
- Parent MB, Baxter MG. 2004. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* **11**(1):9-20.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Pedreira ME, Maldonado H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* **38**(6):863-9.
- Potter LT. 2001. Snake toxins that bind specifically to individual subtypes of muscarinic receptors. *Life Sci* **68**(22-23):2541-7.
- Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL. 2003. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* **80**: 178–193
- Przybylski J, Sara SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* **84**(1-2):241-6.
- Quirk GJ, Mueller D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacol* **33**(1):56-72.
- Rezayof A, Khajepour L, Zarrindast MR. 2009. The amygdala modulates morphine-induced state-dependent memory retrieval via muscarinic acetylcholine receptors. *Neurosci* **160**(2):255-63.

- Rogers JL, Kesner RP. 2003. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiol Learn Mem* **80**(3):332-42.
- Rogers JL, Kesner RP. 2004. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. *Learn Mem* **11**(1):102-7.
- Roosendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA. 2010. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci* **30**(14):5037-46.
- Rose JK, Rankin CH. 2006. Blocking memory reconsolidation reverses memory-associated changes in glutamate receptor expression. *J Neurosci* **26**(45):11582-7.
- Rouse ST, Levey AI. 1996. Expression of m1–m4 muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in septohippocampal neurons and other identified hippocampal afferents. *J Comp Neurol* **375**: 406–16.
- Rouse ST, Levey AI. 1997. Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* **380**: 382–94.
- Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI. 1999. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* **64**: 501–9.
- Sánchez G, Colettis N, Vázquez P, Cerveñansky C, Aguirre A, Quillfeldt JA, Jerusalinsky D, Kornisiuk E. 2009a . Muscarinic inhibition of hippocampal and striatal adenylyl cyclase is mainly due to the M(4) receptor. *Neurochem Res* **34**(8):1363-71.
- Sánchez G, De Oliveira Alvares L, Oberholzer MV, Genro B, Quillfeldt JA, Da Costa JC, Cerveñansky C, Jerusalinsky D, Kornisiuk E. 2009b. M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J Neurosci Res* **87**(3):691-700.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ. 2001. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci* **21**(22):9009–9017.
- Sara SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* **7**: 73–84.

- Scheiderer CL, Smith CC, McCutchen E, McCoy PA, Thacker EE, Kolasa K, Dobrunz LE, McMahan LL. 2008. Coactivation of M(1) muscarinic and alpha1 adrenergic receptors stimulates extracellular signal-regulated protein kinase and induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in rat hippocampus. *J Neurosci* **28**(20):5350-8.
- Segal M, Auerbach JM. 1997. Muscarinic receptor involved in hippocampal plasticity. *Life Sci* **60**: 1085–91.
- Servent D, Fruchart-Gaillard C. 2009. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem* **109**(5):1193-202.
- Sherry JM, Crowe SF. 2008. The non-NMDA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) impairs late reconsolidation of passive avoidance learning in the day-old chick. *Neurosci Lett* **442**(3):244-8.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* **24**(20): 4787–4795.
- Szapiro, G., Galante, J.M., Barros, D.M., Stein, M., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., et al. 2002. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochem. Res.* **27**: 1491–8.
- Taylor P, Brown JH. 1999. Acetylcholine. In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D., editors. *Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed. New York: Raven Press; p. 231–60.
- Teitelbaum H, Lee JF, Johannessen JN. 1975. Behaviorally evoked hippocampal theta waves: a cholinergic response. *Science* **188**(4193):1114-6.
- Thathiah A, De Strooper B. 2009. G protein-coupled receptors, cholinergic dysfunction, and Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Sci Signal* **2**(93):re8.
- Tronson NC, Taylor JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* **8**(4):262-75.
- Tzavara ET, Bymaster FP, Felder CC, Wade M, Gomeza J, Wess J, McKinzie DL, Nomikos GG. 2003a. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. *Mol Psychiatry*. **8**(7):673-9.

- Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG. 2003b. Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci* 23(28):9374-84.
- Van der Zee EA, Luiten PG. 1999. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58: 409–71.
- Vannucchi MG, Scali C, Kopf SR, Pepeu G, Casamenti F. 1997. Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience* 79(3):837-46.
- Wallenstein GV, Vago DR. 2001. Intrahippocampal Scopolamine Impairs Both Acquisition and Consolidation of Contextual Fear Conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 75, 245–252
- Wess J. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:423-50.
- Wilkinson DG, Francis PT, Schwam E, Payne-Parrish J. 2004. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging* 21(7):453-78.
- Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ. 1995. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375: 484–7.
- Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663 pp.

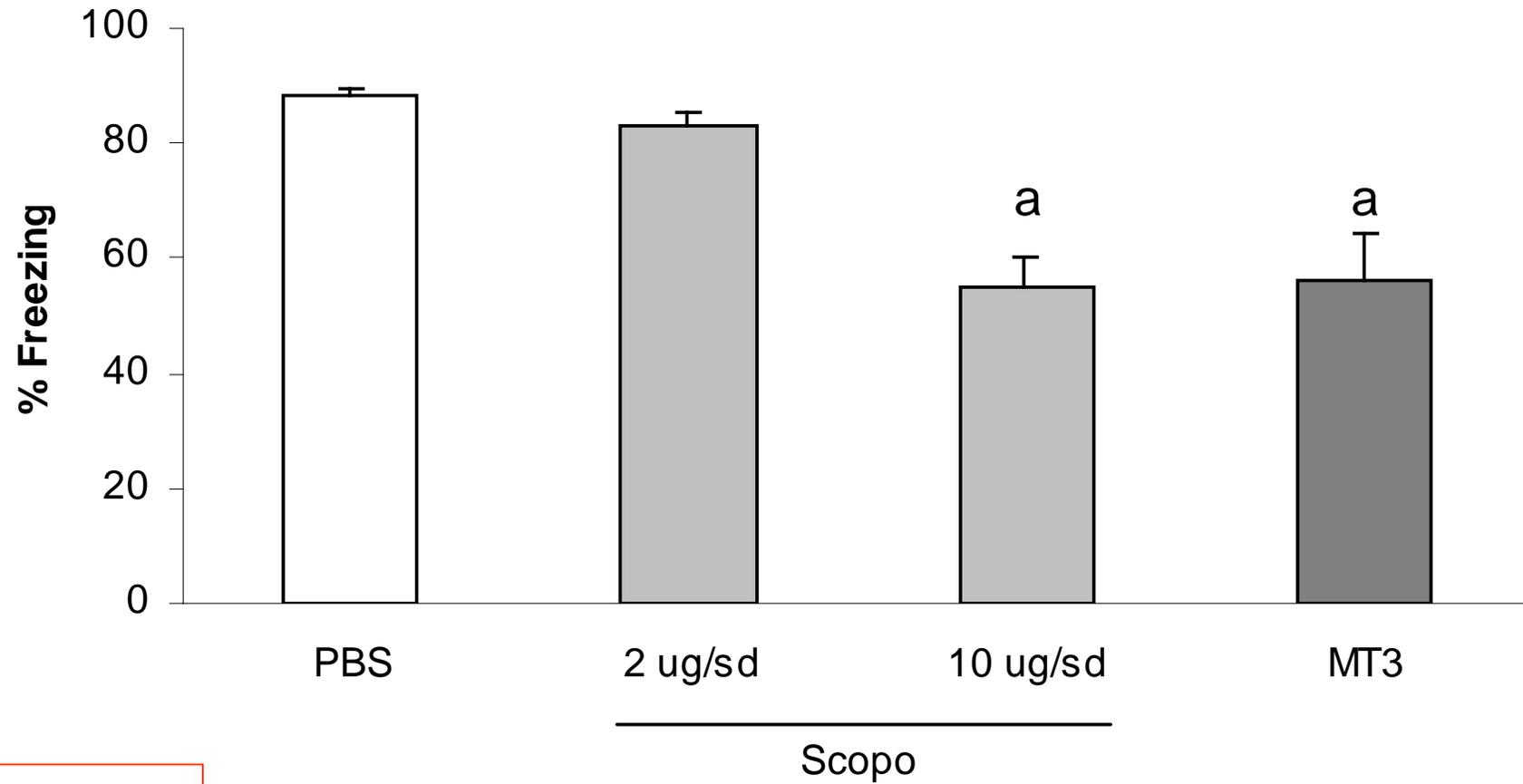
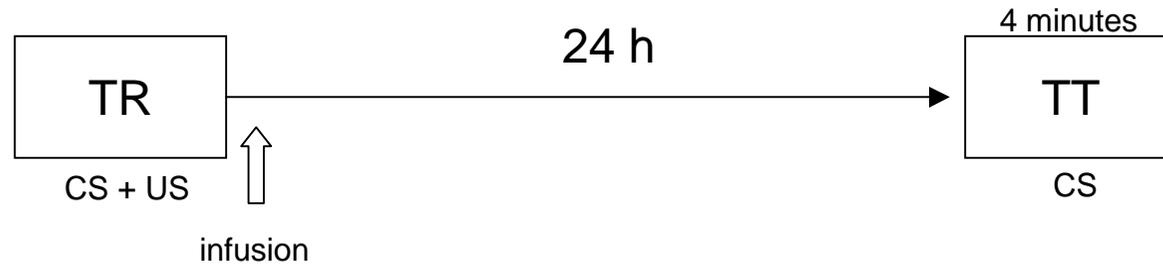


Figure 1

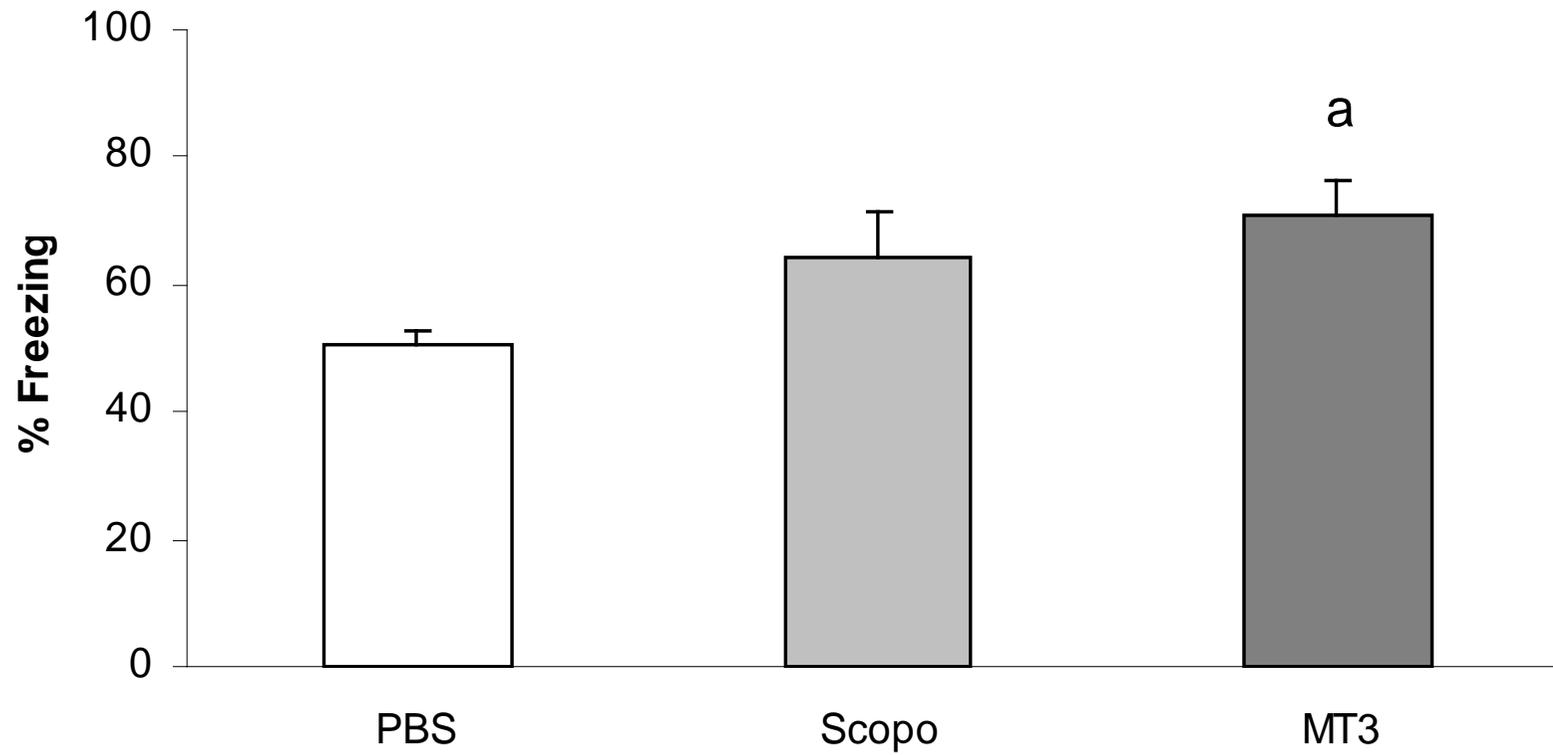
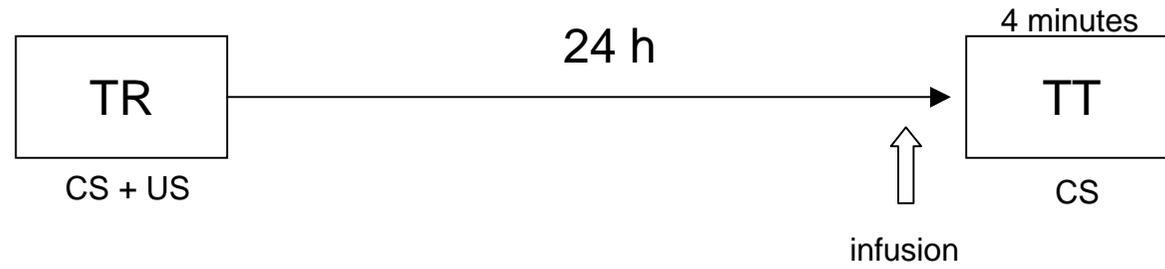


Figure 2

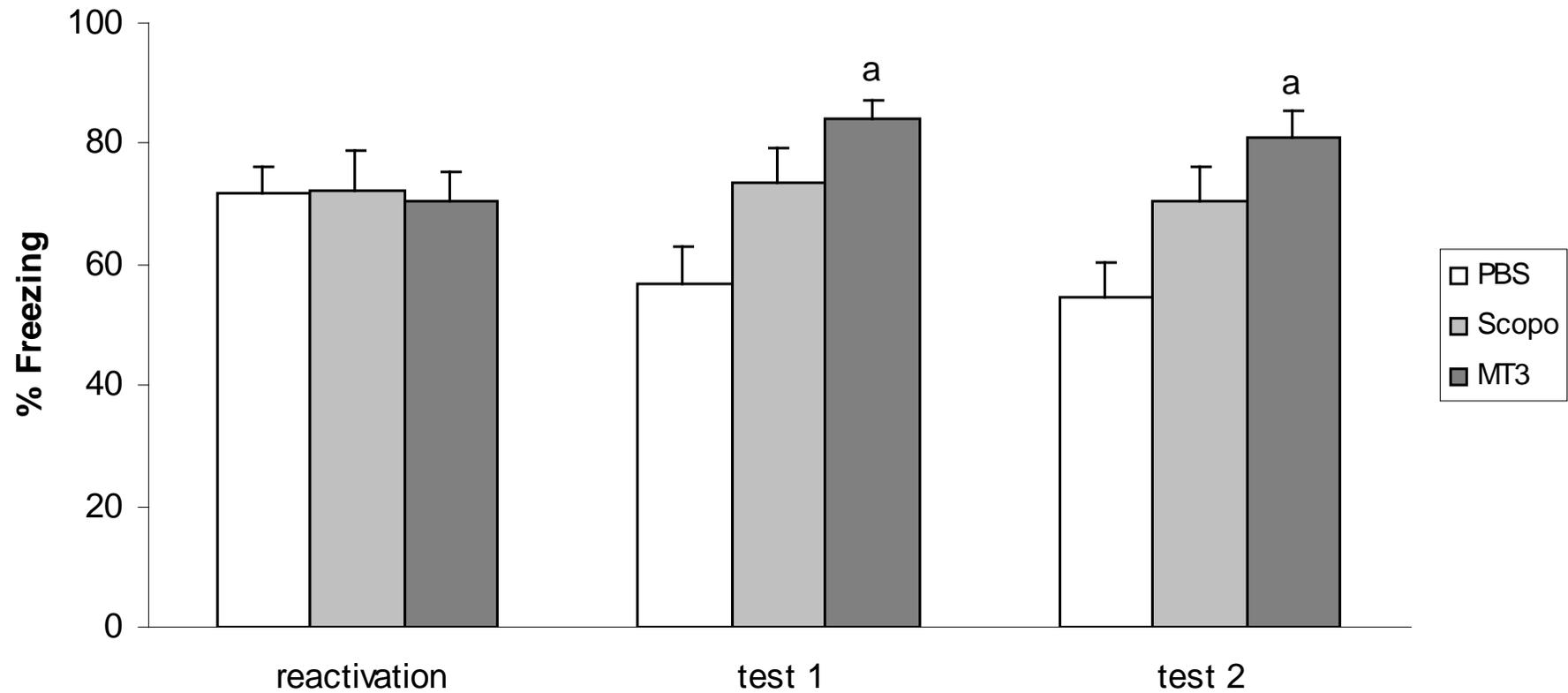
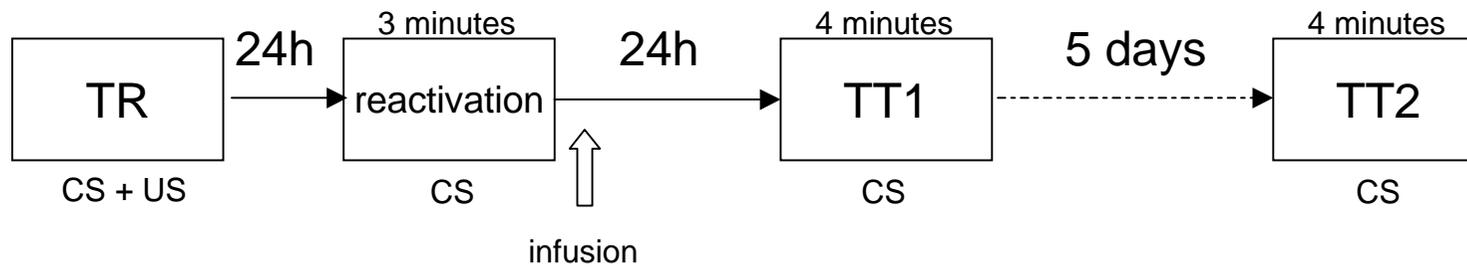


Figure 3

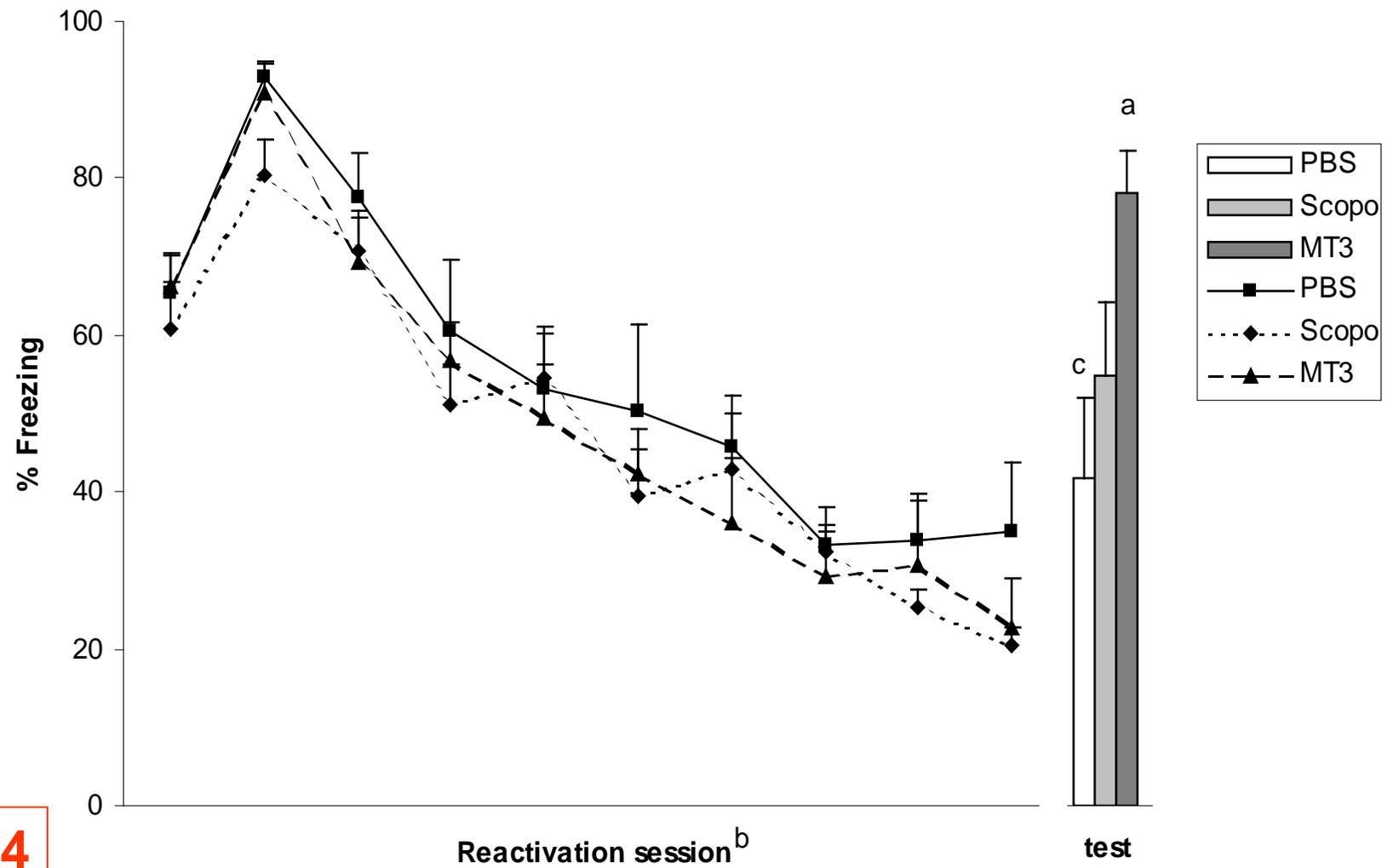
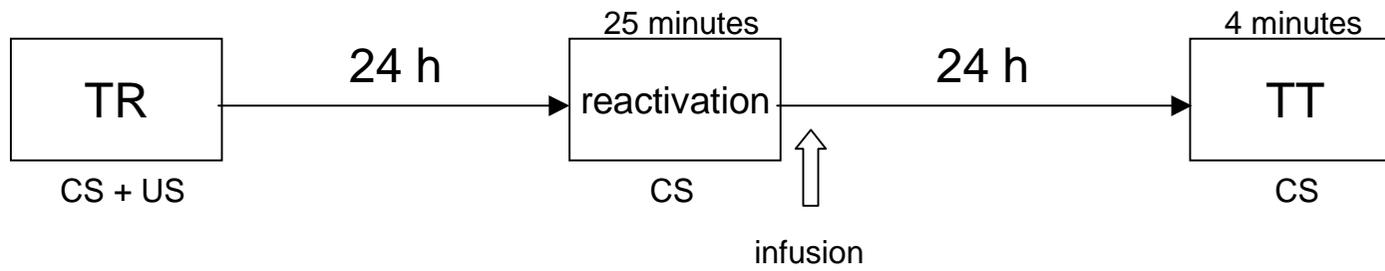


Figure 4

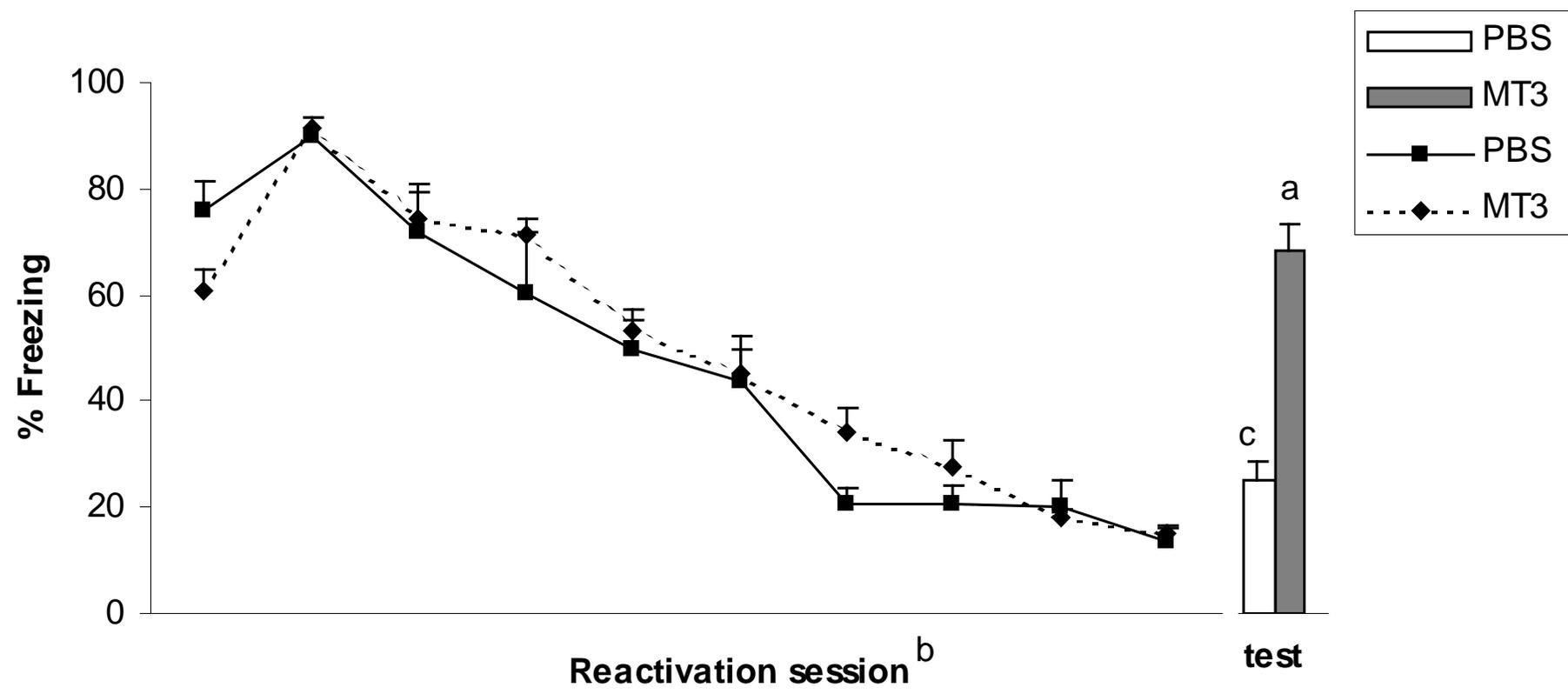
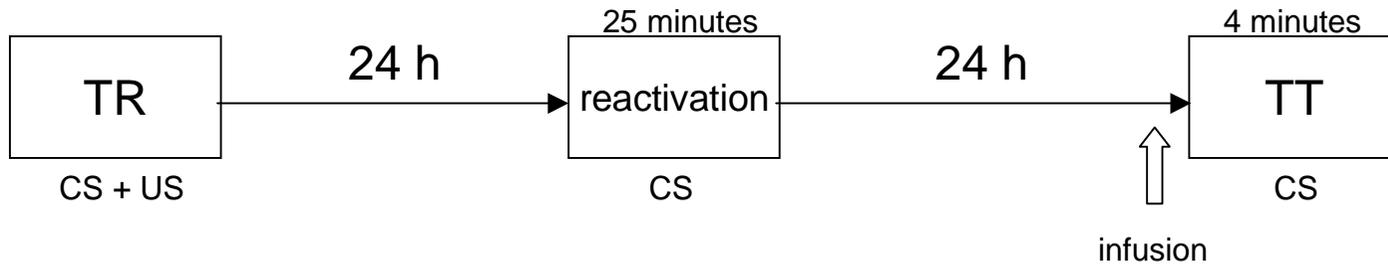


Figure 5

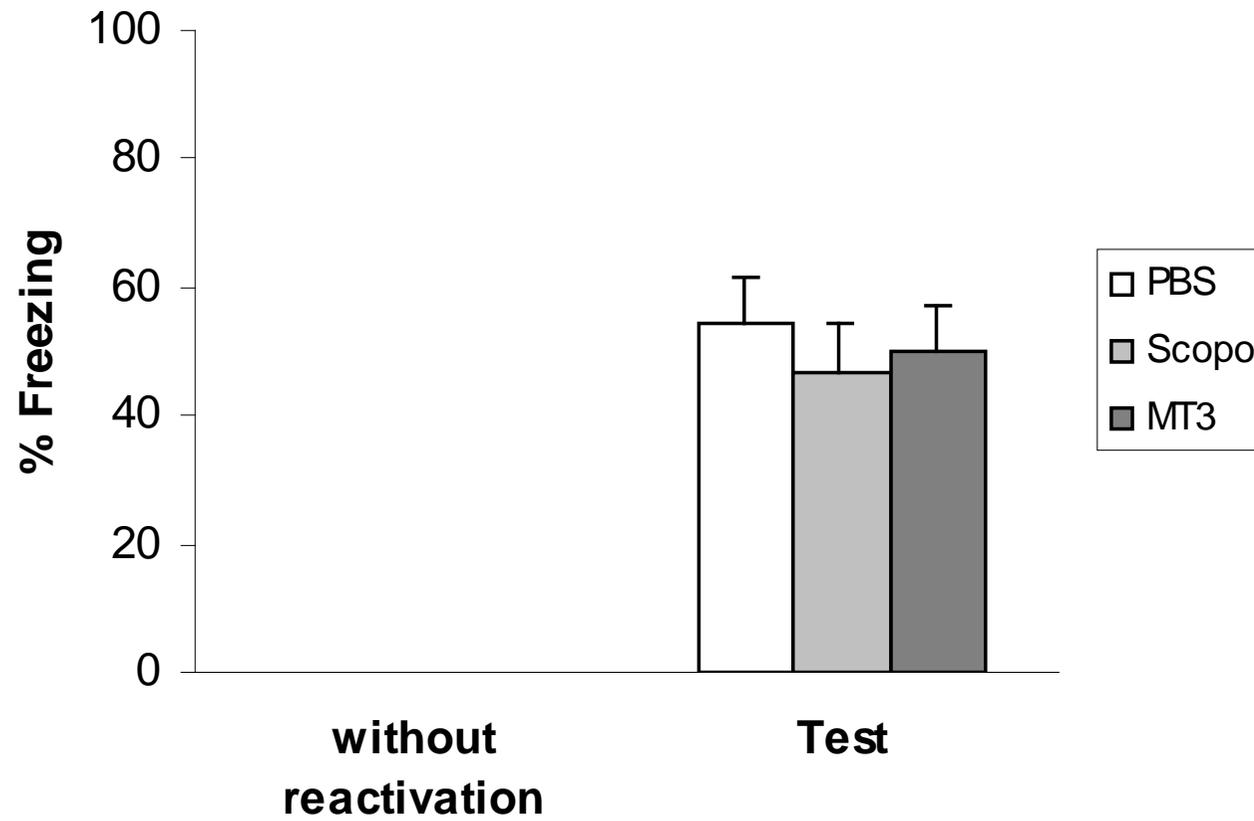
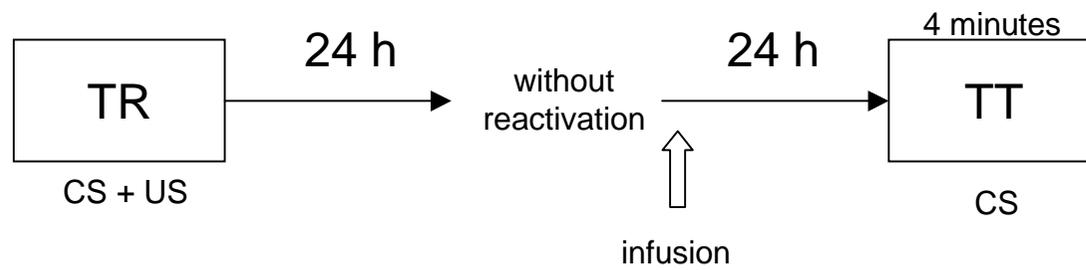


Figure 6

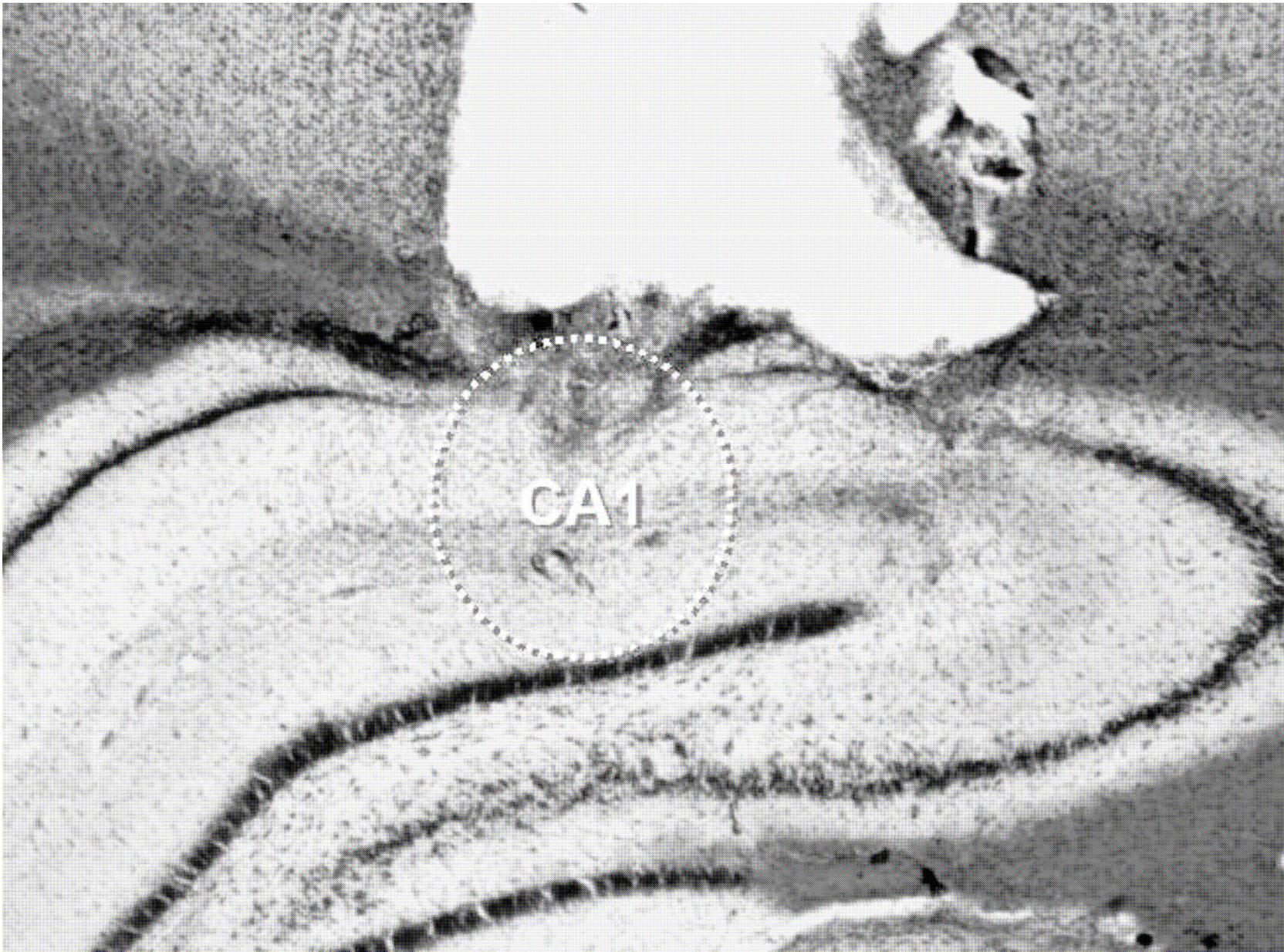


Figure 7