

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA
LABORATÓRIO DE PSICOBIOLOGIA E NEUROCOMPUTAÇÃO

Flávia Zacouteguy Boos

**REPADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO NA TAREFA DE
CONDICIONAMENTO AVERSIVO AO CONTEXTO
PARA EMPREGO COM NOVA CEPA DE RATOS**

Porto Alegre

2013

Flávia Zacouteguy Boos

**REPADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO NA TAREFA DE
CONDICIONAMENTO AVERSIVO AO CONTEXTO
PARA EMPREGO COM NOVA CEPA DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso na forma de monografia como requisito para obtenção de Grau de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Jorge Alberto Quillfeldt
Coorientador: Prof. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Jorge por toda inspiração que me causou durante esses anos (desde o primeiro semestre do curso), por sua inquietude e movimento em relação a questões político-sociais, pelas conversas sobre ciências, política, música e sobre a vida, e pela grande oportunidade de fazer parte desse grupo que é muito importante para mim.

Agradeço ao Lucas por estar sempre presente e disponível, por todo arcabouço de conhecimentos e pela capacidade exemplar de lembrar-se de uma infinidade de trabalhos publicados, o que contribui muito nas nossas discussões científicas.

Agradeço a Dona Zelma pelo fundamental cuidado e carinho no trato com os nossos ratinhos, por toda dedicação na organização e manutenção do nosso laboratório e pelo carinho e companheirismo com todos.

Agradeço a Querusche pelo apoio neste trabalho quando eu mais precisei, ao Fabrício pela revisão do trabalho, a Luiza que me ajudou na maior parte dos experimentos, ao Rodri que sempre me dá apoio científico e emocional, a Ana por ser sempre presente.

Agradeço a todos deste grupo pelas discussões científicas sempre frutíferas, pela amizade e por ser tão prazeroso o ambiente de trabalho.

Agradeço a minha família pelo apoio crítico, por me auxiliarem com contra-pontos e pela paciência.

RESUMO

Introdução: Centenas de trabalhos foram publicados demonstrando que memórias consolidadas, quando evocadas, podem ser reativadas/desestabilizadas, precisando de síntese de novas proteínas para que sejam reconsolidadas e persistam. Interferir nesse processo e prejudicar memórias patológicas permanentemente é uma estratégia com apelo terapêutico. Há anos no Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (UFRGS) estuda-se o processo de reconsolidação com um protocolo efetivo em desestabilizar uma memória de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC). Porém, a recente mudança da cepa de ratos fornecida ao laboratório exigiu mudanças no protocolo padrão utilizado anteriormente, pois esse não era mais capaz de desestabilizar a memória. **Objetivo geral:** repadronizar a tarefa de CAC, buscando um protocolo efetivo em desestabilizar a memória, e, se possível, investigar a origem das diferenças observadas. **Material e métodos:** foram utilizados ratos Wistar machos (3 meses, 290-400g) da nova cepa em uma tarefa de CAC (2x2 choques 0,7 ou 0,5mA, reativação de 3 ou 5min) com injeção i.p. de CHX (2,2, 2,2x2 ou 4,4 mg/mL/kg) ou seu veículo (DMSO 1%) imediatamente após o treino (para avaliar as doses sobre a consolidação) ou após a reativação (dose efetiva em prejudicar a consolidação sobre a reconsolidação). O n de cada grupo variou de 6-10. **Resultados:** A CHX 2,2 mg/mL/kg não teve efeito sobre a consolidação ($p=0,760$). Em outro experimento foi testado diferentes doses de CHX (2,2, 2,2x2 ou 4,4 mg/mL/kg) após o treino, e somente o grupo CHX 4,4 mg/mL/kg diferiu do controle ($p<0,05$). A dose de CHX efetiva em inibir a consolidação (4,4 mg/mL/kg) foi utilizada nos demais experimentos após a reativação. A administração de CHX pós-reativação no protocolo padrão (choque 0,7mA, reativação 3min) não teve efeito sobre a memória ($p=0,935$). A CHX pós-reativação não teve efeito sobre a memória no protocolo com choque 0,7mA e reativação de 5min ($p=0,487$). Foi realizada uma sessão de treino mais fraca (choque 0,5mA), mas a CHX não teve efeito no protocolo com 3min de reativação ($p=0,141$) nem no protocolo com 5min ($p=0,885$). **Conclusões:** Mesmo alterando as principais variáveis que influenciam a desestabilização da memória no protocolo de CAC não foi possível encontrar um protocolo adequado que desestabilize a memória de medo nos animais da nova cepa, de forma que essa seja prejudicada através da inibição de sua reconsolidação pela CHX. Talvez essa linhagem de ratos seja muito sensível ao choque e forme memórias ainda mais robustas, ou que tenha níveis basais de estresse mais elevados. Investigar a origem dessa inesperada diferença, porém, vai além do escopo deste trabalho. Uma das implicações deste estudo é que o laboratório está solicitando nova cepa de animais para contornar o problema e prosseguir seus estudos.

Palavras chave: Memória; Reconsolidação; Condicionamento Aversivo ao Contexto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. TIPOS DE MEMÓRIA	10
1.2. FASES DA MEMÓRIA	11
1.3. FORMAÇÃO DAS MEMÓRIAS DE LONGA DURAÇÃO: TEORIA DA CONSOLIDAÇÃO	11
1.4. RECONSOLIDAÇÃO: MODIFICANDO MEMÓRIAS CONSOLIDADAS	12
1.5. VARIÁVEIS QUE INTERFEREM NA REATIVAÇÃO/DESESTABILIZAÇÃO DA MEMÓRIA	15
1.6. DESCRIÇÃO DO PROBLEMA QUE JUSTIFICA OS EXPERIMENTOS	15
1.7. REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.8. OBJETIVOS	17
1.8.1. Objetivo geral	17
1.8.2. Objetivos específicos	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. ANIMAIS	19
2.2. FÁRMACOS UTILIZADOS:	19
2.3. PROCEDIMENTO COMPORTAMENTAL	19
2.4. MEDIDA DE MEMÓRIA	21
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3. RESULTADOS	23
3.1. A DOSE PADRÃO DE CHX UTILIZADA ATÉ ENTÃO É EFETIVA EM INIBIR O PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO/ESTABILIZAÇÃO NOS RATOS DA NOVA CEPA?	23
3.2. QUE DOSE DE CHX É EFETIVA EM INIBIR O PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO/ESTABILIZAÇÃO NOS RATOS DA NOVA CEPA?	24
3.3. A NOVA DOSE (EFETIVA) É CAPAZ DE INIBIR O PROCESSO DE RECONSOLIDAÇÃO/REESTABILIZAÇÃO NO PROTOCOLO PADRÃO?	25
3.4. MODIFICANDO A VARIÁVEL DURAÇÃO DA SESSÃO DE REATIVAÇÃO/REEXPOSIÇÃO É POSSÍVEL REATIVAR/DESESTABILIZAR ESSA MEMÓRIA?	26

3.5. MODIFICANDO A VARIÁVEL INTENSIDADE DE CHOQUE É POSSÍVEL REATIVAR/DESESTABILIZAR ESSA MEMÓRIA, MANTENDO A DURAÇÃO PADRÃO DA REATIVAÇÃO?	27
3.6. MODIFICANDO A VARIÁVEL INTENSIDADE DE CHOQUE E A VARIÁVEL DURAÇÃO DA SESSÃO DE REATIVAÇÃO É POSSÍVEL DESESTABILIZAR ESSA MEMÓRIA?	28
4. DISCUSSÃO E ANÁLISE	29
CONCLUSÕES	33
PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reconsolidação da memória.	13
Figura 2: Caixa de condicionamento com dicas espaciais e chão de grade metálica.	20
Figura 3: Desenho experimental dos experimentos que avaliaram o efeito da CHX sobre a <i>consolidação</i> .	21
Figura 4: Desenho experimental dos experimentos que avaliaram o efeito da CHX sobre a <i>reconsolidação</i> .	21
Figura 5: Dose padrão de CHX (2,2 mg/mL/kg) imediatamente após sessão de treino.	23
Figura 6: Diferentes doses de CHX imediatamente após o treino.	24
Figura 7: Dose efetiva de CHX pós-treino imediatamente após a sessão de reativação/reexposição.	25
Figura 8: Sessão de reativação/reexposição de 5min.	26
Figura 9: Treino com choque 0,5mA e reativação de 3min.	27
Figura 10: Treino com choque 0,5mA e reativação de 5min.	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAC: Condicionamento Aversivo ao Contexto

CHX: cicloheximida, inibidor de síntese protéica

CREAL: Centro de Reprodução de Animais de Laboratório

EC: Estímulo Condicionado

EI: Estímulo Incondicionado

i.p.: injeção intraperitoneal

RC: Resposta Condicionada

REAT: sessão de reativação

RI: Resposta incondicionada

TR: sessão de treino

TT: sessão de teste

VEI: veículo utilizado na diluição da CHX (DMSO 1%); denomina o grupo controle dos experimentos

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de aprender e formar memórias é um fenótipo adaptativo pertencente a inúmeras espécies do reino animal, incluindo organismos com sistema nervoso bastante simples, como a lesma do mar *Aplysia californica* e a mosca das frutas *Drosophila melanogaster* (KANDEL, 2012), até organismos com sistema nervoso altamente especializado e complexo, como os mamíferos. Uma das hipóteses mais citadas para a evolução do aprendizado e memória é que essas habilidades cognitivas permitem aos organismos adaptarem-se às mudanças ambientais (MEYER, 2013). Inclusive, os mecanismos moleculares de formação das memórias de longa duração (ver definição adiante) são conservados em diferentes espécies - como a ativação da cinase PKA, fosforilação de CREB e síntese de novas proteínas (MCGUIRE; DESHAZER; DAVIS, 2005; HAWKINS; KANDEL; BAILEY, 2006; ALBERINI, 2009; KANDEL, 2012).

Conceitualmente, memória é o processo pelo qual experiências ou informações do ambiente podem ser “armazenadas” no encéfalo através do aprendizado, de modo a ser possível acessá-las, posteriormente, pela recuperação/evocação dessas informações (QUILLFELDT, 1994). Acredita-se que a memória é resultado da modificação da efetividade sináptica em certas células nervosas, que pode ser acompanhada ou não de mudança morfológica.

Informações relevantes a um indivíduo são armazenadas, enquanto outras situações triviais, normalmente, passam sem deixar marcas. A aquisição de memórias é uma capacidade que depende de fatores genéticos, da motivação e atenção do indivíduo e da relevância da experiência, dentre outros. Esse armazenamento é fundamental para que os animais modifiquem comportamentos, o que acaba aumentando a taxa de sobrevivência em algumas situações, tais como saber identificar ambientes potencialmente perigosos e locais onde encontrar alimento, ambos aprendidos com experiências passadas.

Em humanos, principalmente, o repertório de memórias torna um indivíduo único, fazendo parte da constituição da sua personalidade e modulando seus comportamentos. O arcabouço de memórias é o fio que costura a história de vida de uma pessoa, fazendo-a

lembrar de experiências passadas (individuais e coletivas) e possibilitando-a a fazer melhores planejamentos e tomar decisões mais acertadas.

1.1. TIPOS DE MEMÓRIA

As memórias podem ser classificadas com base em diferentes critérios (QUILLFELDT, 2010). O critério tempo de duração permite-nos pensar o quão durável será a alteração de um comportamento. *Memórias de trabalho* duram de apenas alguns segundos a poucos minutos (no máximo 3) (IZQUIERDO, 2010), sendo as informações mantidas na mente apenas para realizar alguma tarefa que necessite delas - como lembrar a ordem das palavras que antecedem o que o leitor está lendo neste momento, a fim de compreender o sentido da frase. Se não houver uma motivação maior para reter a ordem das palavras e a construção da frase (ao contrário de um poema que tenha um valor emocional, por exemplo), normalmente, essas informações desaparecem em seguida.

Algumas memórias duram de minutos a algumas horas (em torno de 6h), estas são referidas como *memórias de curta duração*. Mas caso a experiência tenha um valor importante para o organismo, como associar uma tomada de luz a um choque, as memórias podem durar de várias horas a várias semanas - as denominadas *memórias de longa duração* -, ou mesmo de semanas até várias décadas (ou até mesmo a vida toda), as chamadas *memórias remotas*.

Outro critério bastante utilizado para classificar as memórias é o conteúdo dessas (mesmo que esta seja um pouco limitada e algumas tarefas em estudo com animais não caiba simploriamente em uma bem delimitada classificação) (QUILLFELDT, 2010). Memórias *declarativas* (humanos) ou *explícitas* (outros animais) são aquelas que registram fatos ou eventos e podem facilmente ser relatadas verbalmente, no caso de humanos. Quando a lembrança é de um fato, como o dia em que uma mulher deu a luz a seu filho, esta é denominada de *memória episódica*. Já memórias relacionadas a conhecimentos gerais, como saber que comer gordura em demasia faz mal à saúde, são denominadas *memórias semânticas* (IZQUIERDO, 2010). Nesse tipo de memória, estruturas do lobo temporal medial - como o hipocampo, giro para-hipocampal e amígdala - são ativadas (SQUIRE, 1992).

Memórias não-*declarativas* (humanos) ou *implícitas* (outros animais) são aquelas não acessadas de forma consciente e são divididas em uma série de subtipos. O mais comum é a *memória de procedimento*, que armazena informações relativas a habilidades motoras, como praticar esportes ou tocar um instrumento musical, e hábitos, como sair com os amigos todas as sextas-feiras. Esse tipo de memórias recruta outras estruturas encefálicas, como o cerebelo e o estriado (KANDEL, 2012).

1.2. FASES DA MEMÓRIA

A memória é um processo complexo e comumente é dividida em fases, assim é possível estudá-las independentemente e compreendê-las melhor. A memória ao ser armazenada passa pela fase de formação e pode, posteriormente, passar pela evocação.

A formação passa pelo processo de *aquisição* (também chamada de *aprendizado*), o momento em que o organismo está percebendo a experiência através de seus sistemas sensoriais, e pelo processo de *evocação* ou *recuperação*, quando o organismo pode fazer uso das informações registradas.

1.3. FORMAÇÃO DAS MEMÓRIAS DE LONGA DURAÇÃO: TEORIA DA CONSOLIDAÇÃO

Memórias de longa duração não são formadas instantaneamente, necessitam da fase chamada *consolidação* para persistirem (DUNCAN, 1949; LECHNER; SQUIRE; BYRNE, 1999). O processo de *consolidação* ou *estabilização* da memória consiste em processos celulares e/ou moleculares que ocorrem algum tempo após sua aquisição em estruturas encefálicas recrutadas. Entre eles estão ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, influxo de Ca^{+2} , ativação de uma série de cinases, de fatores de transcrição e síntese de mRNA e de novas proteínas (MCGAUGH, 2000).

Durante essa fase de estabilização, a memória fica suscetível a interferências comportamentais (outros aprendizados temporalmente próximos), físicas (traumas ou lesões) (MCGAUGH, 1966; SCHNEIDER; SHERMAN, 1968; MCGAUGH, 2000) e farmacológicas (inibição de síntese protéica, agonistas ou antagonistas) (FLEXNER; STELLAR, 1963; AGRANOFF; KLINGER, 1964; BARONDES; COHEN, 1965; LECHNER; SQUIRE;

BYRNE, 1999; IZQUIERDO et al, 1998; DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2005), que podem alterar sua força ou inibir sua persistência.

Em determinadas condições, uma memória originalmente de trabalho pode ser “transformada” em uma memória de curta ou mesmo de longa duração. É o caso de um número de telefone de alguém em que o leitor está interessado, ou mesmo o telefone de uma tele-pizza que está constantemente ocupada. De tanto olhar e discar o telefone, a informação que no início tinha o intuito de ser registrada apenas para discar o número, foi tantas vezes repetida que foi “gravada” por mais minutos ou mesmo algumas horas (*memória de curta duração*) ou até dias ou anos (*memória de longa duração*), como no caso do telefone pertencer a um ente querido ou os pedidos de pizza serem muito frequentes.

A *memória de trabalho* é necessária para a formação de uma *memória de longa duração*, pois faz a comparação entre as informações externas e as memórias armazenadas no cérebro. Uma *memória de curta duração* pode ser transformada em de longa, o que nos faria pensar que a memória de curta é apenas um “estágio” para a de longa. Porém, há fortes evidências de que os mecanismos para ambas são paralelos e independentes. Izquierdo e colaboradores (1998, 1999) demonstraram na tarefa de esquiva inibitória que é possível prejudicar a formação da memória de longa duração (que dura mais de 6h) sem afetar a memória de curta (até 6h).

Então, embora as memórias de curta e de longa duração não sejam, necessariamente, diferentes no conteúdo nem nas estruturas ativadas (IZQUIERDO, 2010) - hipocampo, córtex entorrinal e giro parahipocampal -, parece que alguns mecanismos neurais são diferentes (VIANNA et al, 2000). Uma diferença bastante importante é que memórias de longa duração necessitam de síntese de novas proteínas para persistirem (FLEXNER; STELLAR, 1963; AGRANOFF; KLINGER, 1964; BARONDES; COHEN, 1965), enquanto memórias de curta não.

1.4. RECONSOLIDAÇÃO: MODIFICANDO MEMÓRIAS CONSOLIDADAS

Até final da década de 60, influenciada pela teoria de consolidação estava implícita a idéia de que as memórias são formadas e permanecem fixas/imutáveis enquanto durarem (consolidar, tornar sólido). Porém, nas décadas de 60 e 70, alguns estudos foram publicados demonstrando que tratamentos farmacológicos amnésicos durante o processo de consolidação

também foram amnésicos quando administrados após a reativação (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968; DEVIETTI; KIRKPATRICK, 1976; MACTUTUS; RICCIO; FERREK, 1979). Então, uma memória previamente consolidada e no estado inativo (que não pode sofrer interferências), quando reativada pode ficar novamente em estado ativo (suscetível a interferências) (Figura 1), necessitando ser *reconsolidada/reestabilizada* para persistir (NADER e HARDT, 2009).

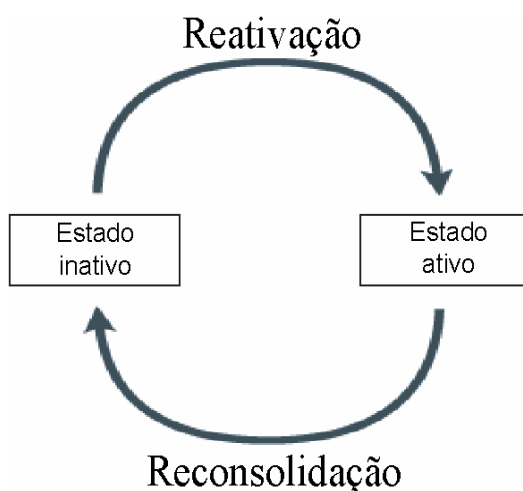


Figura 1: Reconsolidação da memória. Uma memória é reativada (desestabilizada) de maneira que passa de um estado quiescente, inativo, a um estado ativo, passível de modificações. Posteriormente retorna a um estado de inatividade através da reconsolidação.

Fonte: (modificado de NADER e HARDT, 2009)

Porém, apesar das evidências de que memórias já consolidadas poderiam sofrer alterações, esse debate permaneceu sem a atenção merecida até 2000, ano em que Karin Nader publicou um trabalho demonstrando que um inibidor de síntese protéica infundido na amígdala, após a reativação, foi capaz de prejudicar uma memória de medo (NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000). A partir deste trabalho, houve um aumento no número de publicações com as palavras chave “memory” e “reconsolidation” no site PubMed [380 até 2011 (BESNARD, A.; CABOCHE, J.; LAROCHE S., 2012) e 567 até 2 de novembro de 2013 (site PubMed)].

Hoje existe uma série de trabalhos publicados demonstrando que a reconsolidação da memória ocorre em diferentes protocolos de diferentes tarefas comportamentais (de natureza aversiva ou recompensatória), e em diferentes espécies (incluindo humanos) (MILEKIC et al.,

2006; BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009). Portanto, essas evidências “apoiam fortemente a noção de que a reconsolidação representa um processo mnemônico conservado evolutivamente e contribui (para se pensar) a universalidade desse fenômeno” (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009, tradução livre da autora).

A função biológica da reconsolidação ainda é discutida, mas um trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa este ano (DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2013) demonstrou que a reconsolidação pode atualizar uma memória (incorporando novas informações à memória original), mantê-la precisa (com detalhes mantidos) ou fortalecê-la, o que corrobora com outros trabalhos.

Enfraquecer ou acabar com memórias patológicas, como as traumáticas ou relacionadas a drogas, apesar das questões éticas, tem um forte apelo terapêutico (DUDAI, 2006; MILEKIC et al., 2006; BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009). Comumente a tentativa de diminuir uma resposta condicionada em psicoterapias, assim como em pesquisas com animais, é feita através de sessões de extinção (MYERS e DAVUS, 2002). O procedimento de extinção é realizado com a evocação da memória na ausência do estímulo que gerou a resposta condicionada (estímulo incondicionado, EI) e na presença de estímulos associados ao EI (estímulo condicionado, EC). Essa abordagem, ao contrário do que o nome sugere, não resulta no esquecimento da memória aversiva, e sim na formação de uma nova memória (EC não está mais associado com o EI) com valência oposta à memória original (EC associado com o EI). E, em decorrência disso, percebe-se que com o tempo a memória original retorna a ser dominante (recuperação espontânea) (PHELPS et al., 2004; NADER e HARDT, 2009), o que é uma limitação desse procedimento.

Enquanto sessões de extinção não são tão efetivas em acabar com a associação entre o EC e o EI a longo prazo, a *reconsolidação* da memória altera a própria memória original e essa mudança é permanente (NADER e HARDT, 2009). Por isso, o processo de *reconsolidação* da memória é uma oportunidade de enfraquecer efetiva e permanentemente memórias patológicas, como as de medo e as relacionadas a drogas.

A reconsolidação da memória é a reestabilização a nível celular e molecular da memória. Essa reestabilização tem em comum alguns mecanismos com a consolidação, como a síntese de novas proteínas (NADER et al., 2000; SUZUKI et al., 2004; ALBERINI, 2009). Porém, a reconsolidação somente ocorre quando uma memória é reativada (ou, também,

desestabilizada). Para isso, é necessário que haja evocação da memória em questão, mas nem sempre quando uma memória é evocada ela é reativada/desestabilizada (LEE, 2009).

1.5. VARIÁVEIS QUE INTERFEREM NA REATIVAÇÃO/DESESTABILIZAÇÃO DA MEMÓRIA

Uma série de variáveis pode influenciar a desestabilização da memória (essas são denominadas *boundary conditions*, na literatura em inglês) (NADER; EINARSSON, 2010). Memórias mais fortes (como a de um estresse pós-traumático) e mais antigas (remotas) são mais difíceis de sofrerem reconsolidação do que as mais fracas e mais recentes. O tempo de evocação é um fator extremamente crítico para a reativação: geralmente reexposições muito longas desencadeiam extinção, enquanto que reexposições mais rápidas podem reativar a memória (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009; NADER; EINARSSON, 2010). Mas memórias mais fortes ou mais antigas precisam ser evocadas por mais tempo para gerar desestabilização (MILEKIC; ALBERINI, 2002; SUZUKI et al., 2004).

Nader e Einarsson em uma revisão de 2010 (NADER; EINARSSON, 2010), citam o trabalho de Wang e colaboradores que demonstraram a inibição pré-reativação da subunidade NR2B do receptor de NMDA na amígdala tornou a memória insensível à infusão de anisomicina (inibidor de síntese proteica), sem afetar a evocação da memória. O autor discute que, se a ativação dessa subunidade é necessária para a memória ser desestabilizada e sensível a inibição da reconsolidação, as *boundary conditions* podem produzir uma diminuição dos níveis da subunidade NR2B em sinapses relacionadas à memória, o que tornaria a memória resistente à desestabilização (NADER; EINARSSON, 2010).

As condições para que ocorra a desestabilização da memória dependem, além das variáveis já mencionadas, do tipo de memória, da tarefa utilizada, das condições do laboratório onde os experimentos são realizados e da linhagem genética do modelo animal escolhido. Mas de qualquer forma, as condições experimentais para que uma memória sofra ou não desestabilização, não são claramente definidas.

1.6. DESCRIÇÃO DO PROBLEMA QUE JUSTIFICA OS EXPERIMENTOS

No Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS), há anos são realizados experimentos com reconsolidação

da memória empregando a tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC), usando um protocolo eficaz para reativar a memória em ratos Wistar machos. Esses ratos eram fornecidos pelo Centro de Reprodução de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, localizado no Campus Centro da Universidade. Porém, este ano (2013) foi inaugurada uma nova sede do CREAL no Campus do Vale e, desde março, os ratos que chegam ao laboratório são oriundos de uma nova cepa de ratos Wistar, provenientes da FIOCRUZ. Uma vez que animais diferentes podem reagir diferentemente a novos ambientes e situações comportamentais, ou, considerando-se que as instalações são novas e nem todas as variáveis ambientais estão devidamente ajustadas, é natural esperar que resultados diferentes surjam quando tentamos realizar os mesmos experimentos de antes com esses novos animais: pequenas mudanças foram observadas nos anos anteriores, sempre que uma cepa era trocada (o que é necessário fazer a cada poucos anos), e agora não haveria motivo para ser diferente.

Para avaliar se os ratos dessa nova cepa se comportavam de maneira semelhante aos anteriores foi realizado um experimento inicial, em que se utilizou o mesmo protocolo padrão de reconsolidação do CAC – choque de 0,7mA, reativação de 3 minutos – e cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal do inibidor de síntese protéica *cicloheximida* (2,2 mg/mL/kg) ou seu veículo (DMSO 1%, 1mL/kg) logo após sessão de reexposição/reativação ao contexto (sem o choque). A *cicloheximida* é comumente usada (inclusive neste laboratório), pois mostra-se efetiva em prejudicar a reestabilização dessa memória quando injetada logo após a reativação, fazendo com que a memória fique muito fraca. Porém, esse resultado esperado de prejuízo na reconsolidação da memória não foi observado com esse protocolo, e os resultados sugerem que o protocolo não foi capaz de desestabilizar a memória desses animais, já que o inibidor de síntese protéica não foi efetivo.

O objetivo deste trabalho de conclusão, então, é o de avaliar a modificação de algumas variáveis do protocolo de reativação da tarefa de CAC, a fim de ajustar o protocolo para que a memória consiga ser efetivamente desestabilizada e, conseqüentemente, suscetível a interferências.

1.7. REFERENCIAL TEÓRICO

Os experimentos são baseados na teoria da reconsolidação, em que uma memória pode sofrer alterações em sua força, persistência e/ou conteúdo. A evocação de uma memória, em certas condições, provoca sua reativação/desestabilização. Se os mecanismos de reconsolidação/reestabilização forem inibidos, essa memória se torna, robustamente, mais fraca.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. Objetivo geral

Padronizar um protocolo de reativação da memória no Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC), a fim de conseguir reproduzir o resultado conhecido (descrito em nosso e em outros laboratórios) de prejuízo da resposta condicionada de medo mediante a inibição farmacológica da *reconsolidação*, com infusão sistêmica (i.p.) imediatamente após a sessão de reexposição/reativação ao contexto (sem choque). Para fins de comparação, também será verificado se a *consolidação* da memória (neste caso com injeção logo após a sessão de treino) também responde da forma como respondia ao tratamento farmacológico.

1.8.2. Objetivos específicos

1. Efeito da infusão de CHX i.p. imediatamente pós-treino na tarefa do CAC (choque 0,7mA) – A pergunta é: tem efeito sobre a *consolidação* dessa memória aversiva? (reproduzindo achados anteriores nossos e de outros autores (INDA; MURAVIEVA; ALBERINI, 2011; BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009)*;
2. Se tiver efeito sobre a consolidação, passar diretamente ao item 3, caso contrário, investigar as três variáveis que podem afetar esse resultado: dose do fármaco, intensidade do choque e duração da sessão (de treino, no caso):

- 2.1. Como não houve efeito *pós-treino*, testar diferentes **doses de CHX** i.p. (entre 1 e 5mg/mL/kg) para ver se alguma é efetiva, mantendo o choque e a duração do treino originais;
 - 2.2. Se ainda assim não houver efeito *pós-treino*, variar a **intensidade do choque** no treino (entre 0,5 e 1,0mA), mantendo a dose e a duração do treino originais;
 - 2.3. Se ainda assim não houver efeito *pós-treino*, variar a **duração da sessão** de treino (entre 3 e 8min), usando a mesma dose e o choque original;
 - 2.4. Se ainda assim não houver efeito *pós-treino*, reavaliar a *reprodutibilidade experimental* dos resultados e investigar a possibilidade de os animais da nova cepa terem, por exemplo, um nível de ansiedade basal maior, que afete seu desempenho: isso pode ser avaliado na tarefa do Labirinto em Cruz Elevado comparando animais treinados no CAC com não-treinados;
3. Infundir a dose efetiva de CHX imediatamente após uma sessão de *reexposição* ao contexto do treino na tarefa do CAC, intercalada entre o treino e o teste, seguindo o protocolo-padrão que utilizamos há anos – choque de 0,7mA no treino + reativação de 3min sem choque – para saber se a memória será ou não *reativada* – A pergunta é: tem efeito sobre a *reconsolidação* desta memória? (reproduzindo achados anteriores nossos e de outros autores*);
 - 3.1. Se não tiver efeito *pós-reexposição*, variar a **duração da sessão** de reativação (entre 3 e 5min) usando a mesma dose e o choque original – testamos essa possibilidade primeiro pois é sabido que para promover uma reativação/reconsolidação, essa janela temporal é muito crítica (SUZUKI et al., 2005)
 - 3.2. Se ainda assim não houver efeito *pós-reexposição*, variar a **intensidade do choque** no treino (entre 0,5 e 1,0mA), mantendo a dose e a duração da reexposição originais;
 - 3.3. Se ainda assim não houver efeito *pós-reexposição*, reavaliar a *reprodutibilidade experimental* dos resultados examinando possível alteração da ansiedade basal (na tarefa do Labirinto em Cruz Elevado) e discutindo outros fatores envolvidos.

(*) Em nosso laboratório ainda não publicamos resultados especificamente com esse inibidor da síntese proteica, apenas com DRB (inibidor de transcrição) e outros fármacos (como Midazolam) (DE OLIVEIRA ALVARES, 2008).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Serão utilizados ratos Wistar machos, 3 meses, pesando entre 290 e 400 gramas, fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em grupos de 4-6 por caixa, receberam água e ração *ad libitum* e foram submetidos a um ciclo de iluminação de 12h claro / 12h escuro e temperatura padrão de biotério.

Esses experimentos e animais fazem parte do projeto HIPÓTESE DA RECONSOLIDAÇÃO NA TERAPIA DO REPROCESSAMENTO: EFEITO DE DISTRATORES DURANTE A REATIVAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS, nº 23326, aprovado pelo CEUA – UFRGS.

2.2. FÁRMACOS UTILIZADOS:

Cicloheximida (CHX): é um inibidor de sínteses protéica em organismos eucariotos e produzido pela bactéria *Streptomyces griseus*. A administração da CHX (Sigma) foi realizada pela via intraperitoneal (i.p.) e a dose variou de 2,2 mg/mL/kg (1 ou duas administrações) e 4,4 mg/mL/kg.

Dimetilsulfóxido (DMSO) 1%: é um solvente aprótico polar utilizado como veículo para diluir a cicloheximida. O veículo (Merck) foi injetado i.p. no volume de 1mL/kg nos animais do grupo controle.

2.3. PROCEDIMENTO COMPORTAMENTAL

Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC)

Essa tarefa é um condicionamento Pavloviano em que um estímulo neutro inicial (estímulo condicionado, EC) é associado a uma resposta incondicionada (RI), esta provocada por um estímulo incondicionado (EI). O condicionamento ocorre quando, nessa associação

(EI-EC), o EC sozinho é capaz de evocar a RI, que nesse caso passa a se chamar resposta condicionada (RC).

No CAC, o contexto (caixa de condicionamento) é o estímulo neutro inicial (EC) e é associado ao comportamento de congelamento (RI), provocado pelo choque nas patas (EI, estímulo aversivo). Em uma sessão seguinte ao condicionamento, o contexto é capaz de evocar o comportamento de congelamento (RC).

O protocolo de CAC utilizado é composto por três sessões, em dias diferentes: sessão de condicionamento (treino), sessão de reativação e sessão de teste.

Sessão de treino: cada animal foi colocado em uma caixa de condicionamento, com dicas espaciais e o chão de grade metálica (Figura 2), a ser explorada durante 3 minutos. Aos 3min, o animal recebeu 2 choques nas patas (0,7 ou 0,5mA, com duração de 1s cada), e outros 2 choques aos 3,5 minutos. O animal foi retirado da caixa aos 4 *minutos*. No experimento para avaliar o efeito da CHX na consolidação, cada animal recebeu uma injeção i.p. de DMSO 1% (veículo, 1 mL/kg) ou CHX (2,2 mg/mL/kg em 1 ou 2 administrações ou 4,4 mg/mL/kg) logo após o treino (Figura 3).

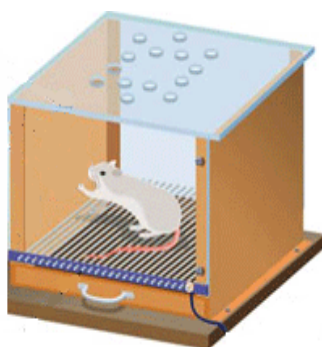


Figura 2: Caixa de condicionamento com dicas espaciais e chão de grade metálica.

Sessão de reativação: A sessão ocorreu 48 horas após o treino (Figura 4). Cada animal foi colocado na caixa de condicionamento por 3 ou 5 *minutos* e a resposta de medo (congelamento) foi avaliada. Nos experimentos que avaliaram a reconsolidação (Figura 3), cada animal recebeu uma injeção i.p. de DMSO 1% (veículo, 1mL/kg) ou CHX (2,2mg/mL/kg ou 4,4 mg/mL/kg) logo após a sessão de reativação.

Sessão de teste: a sessão de teste ocorreu 48 horas após a reativação (experimentos para avaliar a reconsolidação), seguindo o protocolo padrão utilizado no nosso laboratório. Nos experimentos para avaliar a consolidação, o teste ocorreu 24h após a sessão de treino, intervalo capaz de avaliar a formação de uma memória de longa duração. Durante a sessão de teste, cada animal foi colocado na caixa de condicionamento por 4 minutos e a resposta de medo (congelamento) foi avaliada.

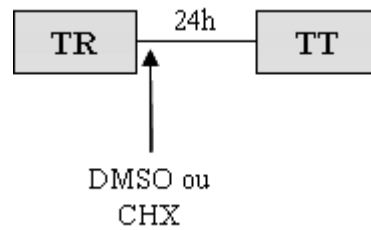


Figura 3: Desenho experimental dos experimentos que avaliaram o efeito da CHX sobre a *consolidação*.

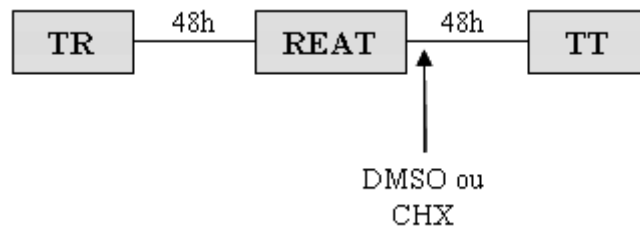


Figura 4: Desenho experimental dos experimentos que avaliaram o efeito da CHX sobre a *reconsolidação*.

2.4. MEDIDA DE MEMÓRIA

A memória pode ser medida indiretamente através de sua evocação, que é expressa pela aquisição ou inibição de um determinado comportamento em um mesmo contexto. No caso do CAC, a evocação da memória de medo será quantificada pelo comportamento de congelamento (do inglês, *freezing*), em que o animal fica imóvel, exceto pelo movimento da respiração. A supressão do comportamento exploratório e a adoção da postura característica de congelamento pode ser um comportamento adaptativo na presença de um predador, pois

este terá maiores chances de atacar se o animal estiver se movendo (FANSELOW, 1980). Nas sessões de reativação e de teste, o congelamento será demonstrado na porcentagem de tempo da sessão em que o animal exibe essa resposta [$\text{tempo de congelamento (s)} \times 100 / \text{tempo total da sessão (s)}$].

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A medida de memória, o congelamento, para essa população é uma resposta que apresenta distribuição normal. Assim, para cada experimento foi realizado um teste de normalidade para confirmar essa distribuição, e os dados foram analisados com testes paramétricos. Nos experimentos com 2 grupos, foi utilizado teste t de Student; no experimento em que há 4 grupos, foi utilizado ANOVA de uma via, com *post hoc* Student-Newman-Keuls com nível de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

Nos gráficos o eixo y indica a porcentagem (%) de tempo das sessões (teste e reativação) em que os ratos evocam a memória de medo (*congelamento*), e o eixo x indica os grupos experimentais. Os dados estão expressos em média + barra de erro padrão de cada grupo.

3.1. A DOSE PADRÃO DE CHX UTILIZADA ATÉ ENTÃO É EFETIVA EM INIBIR O PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO/ESTABILIZAÇÃO NOS RATOS DA NOVA CEPA?

Para responder essa questão, foi realizado um experimento em que os ratos foram submetidos ao protocolo padrão de condicionamento na tarefa de CAC utilizado no laboratório (treino com choque 0,7mA, reativação de 3min), com injeção i.p. de CHX 2,2 mg/mL/kg imediatamente após o treino. Na sessão de teste, os grupos VEI e CHX não apresentaram níveis de congelamento diferentes, como mostra a figura 5.

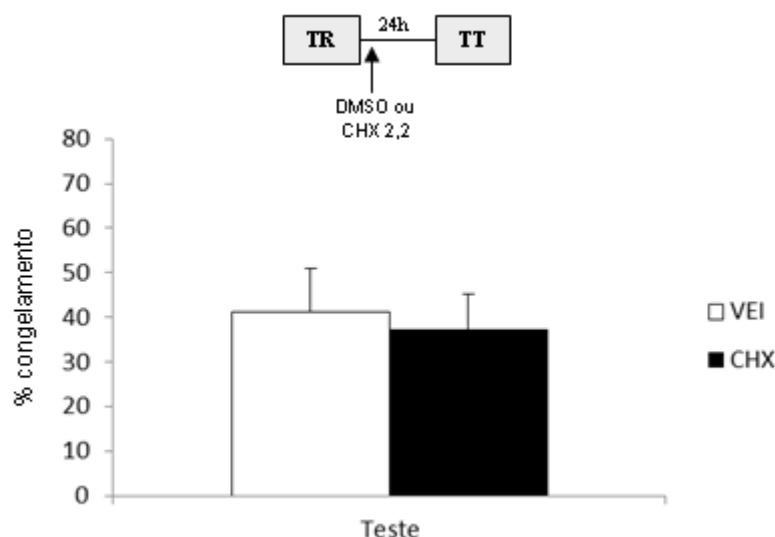


Figura 5: Dose padrão de CHX (2,2 mg/mL/kg) imediatamente após sessão de treino. O grupo CHX (n=6) apresentou níveis de congelamento semelhantes estatisticamente ao grupo VEI (n=6) ($p=0,760$, teste t de Student para amostras independentes).

3.2. QUE DOSE DE CHX É EFETIVA EM INIBIR O PROCESSO DE CONSOLIDAÇÃO/ESTABILIZAÇÃO NOS RATOS DA NOVA CEPA?

Memórias de longo prazo necessitam de síntese de novas proteínas para persistir, assim como memórias reativadas/desestabilizadas. Experimentos demonstram que existem pelo menos dois picos de síntese de proteínas após a consolidação: um próximo à aquisição e outro de 3-6h depois (IGAZ et al., 2002; ALBERINI, 2009). Além disso, o trabalho do grupo da Alberini (MILEKIC et al., 2006) mostrou que uma administração sistêmica de CHX 2,2 mg/mL/kg, após a reativação de uma memória de preferência de lugar com morfina, a quantidade de proteínas no encéfalo homogeneizado diminuiu em 70%.

Com isso, realizamos um experimento em que 3 dosagens de cicloheximida foram utilizadas logo após o treino na tarefa de CAC (protocolo padrão: choque 0,7mA, reativação de 3min): (a) 2,2 mg/mL/kg (a dose padrão no nosso laboratório), (b) duas injeções de 2,2 mg/mL/kg (uma imediatamente após e outra 3h depois, coincidindo com os picos de síntese) e (c) 4,4 mg/mL/kg (com o objetivo de aumentar o nível de inibição de síntese protéica). O gráfico 2 demonstra que apenas o grupo CHX 4,4 mg/mL/kg apresentou níveis menores de congelamento em relação ao grupo controle (Figura 6).

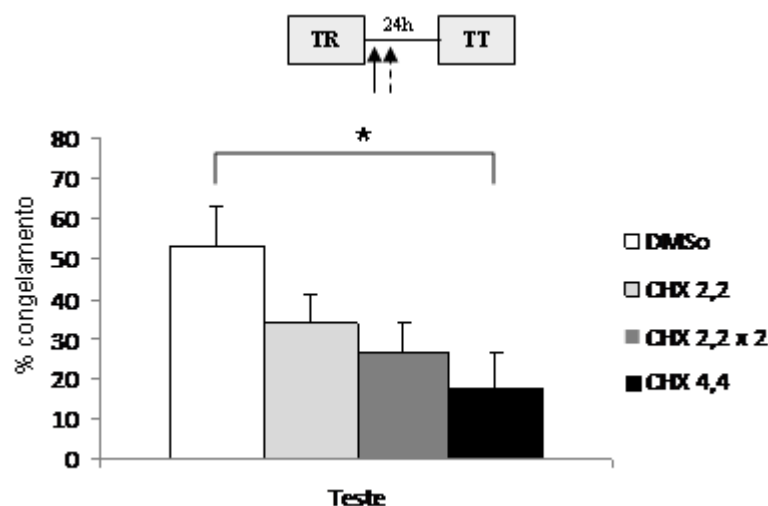


Figura 6: Diferentes doses de CHX imediatamente após o treino. O teste ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p=0,041$). O grupo CHX 4,4 apresentou nível de congelamento diferente do DMSO (*post hoc* SNK com $p<0,05$; grupo DMSO com $n=7$ e demais grupos $n=6$).

3.3. A NOVA DOSE (EFETIVA) É CAPAZ DE INIBIR O PROCESSO DE RECONSOLIDAÇÃO/REESTABILIZAÇÃO NO PROTOCOLO PADRÃO?

Para responder essa questão, foi realizado um experimento na tarefa de CAC (protocolo padrão: choque 0,7mA, reativação de 3min) em que os animais receberam uma injeção i.p. da dose de CHX efetiva em inibir a consolidação (4,4 mg/mL/kg) ou seu veículo, logo após a sessão de reexposição/reativação da memória. Na sessão de teste o grupo CHX não diferiu estatisticamente do grupo VEI (Figura 7).

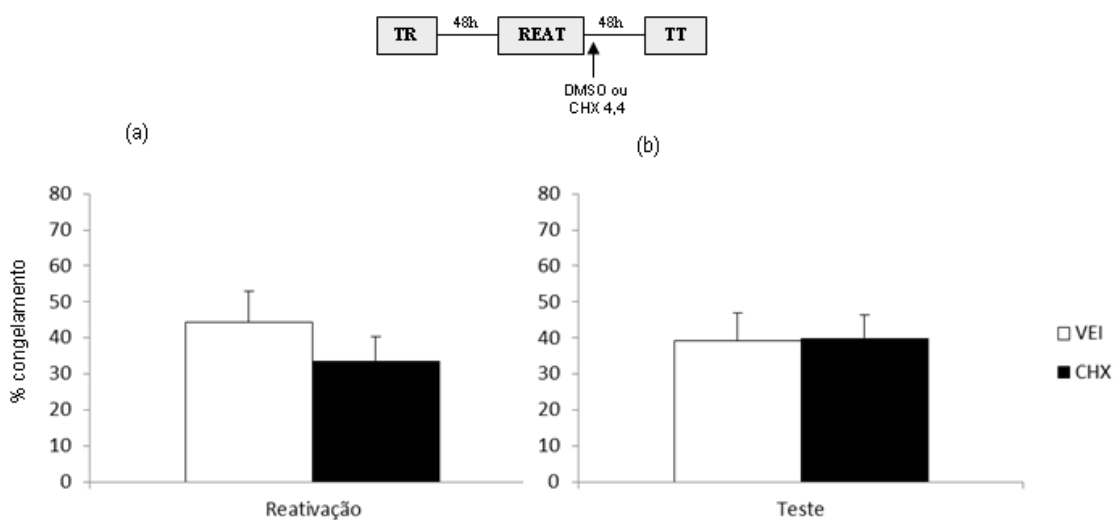


Figura 7: Dose efetiva de CHX pós-treino imediatamente após a sessão de reativação/reexposição. (a) Na sessão de reativação os grupos não diferiram significativamente ($p= 0,36$, teste t de Student para amostras independentes). (b) Na sessão de teste o grupo CHX não diferiu estatisticamente do grupo VEI ($p= 0,936$, teste t de Student para amostras independentes; $n=8$ no grupo CHX, $n=7$ no grupo VEI em ambas as sessões).

3.4. MODIFICANDO A VARIÁVEL DURAÇÃO DA SESSÃO DE REATIVAÇÃO/REEXPOSIÇÃO É POSSÍVEL REATIVAR/DESESTABILIZAR ESSA MEMÓRIA?

O resultado anterior mostrou que a dose que teve efeito pós-treino (sobre o processo de consolidação) não teve efeito pós-reativação (sobre a reconsolidação), o que sugere que o protocolo que utilizamos não foi capaz de reativar/desestabilizar a memória em questão.

A variável duração da sessão de reativação/reexposição é extremamente crítica na desestabilização de uma memória (SUZUKI et al., 2004). Memórias mais fortes ou mais antigas são mais difíceis de serem desestabilizadas, e é comum que o aumento do tempo de reativação facilite essa desestabilização.

Por isso, foi realizado um experimento na tarefa de CAC, mantendo a sessão de treino igual (choque 0,7mA) e alterando apenas a duração da sessão de reativação/reexposição para 5min (a injeção i.p. de CHX 4,4 mg/mL/kg ou seu veículo se manteve igual, após sessão de reativação). Na sessão de teste, os grupos VEI e CHX não diferiram estatisticamente (Figura 8).

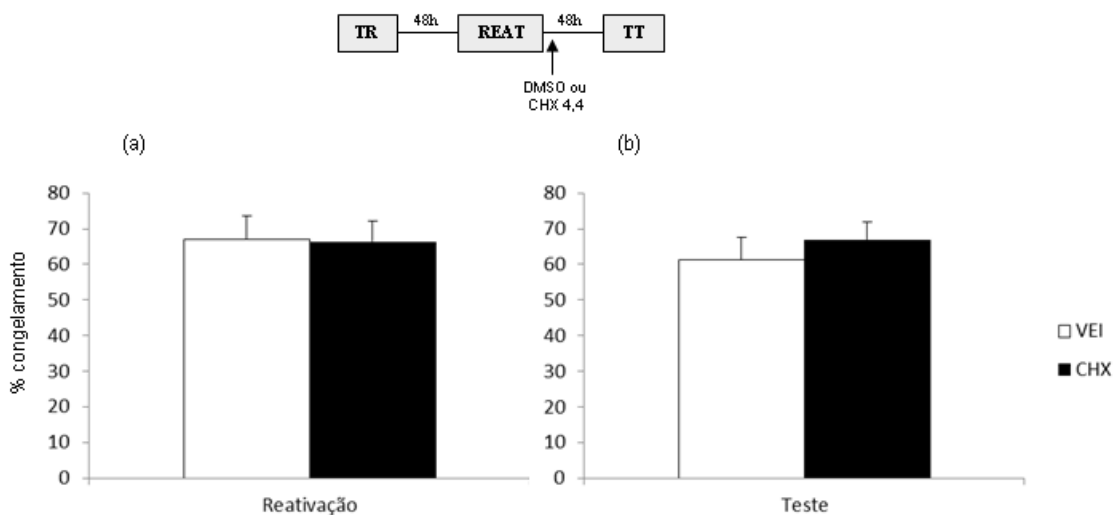


Figura 8: Sessão de reativação/reexposição de 5min (a) Na sessão de reativação os grupos não diferiram significativamente ($p= 0,92$, teste t de Student para a mostras independentes). (b) Na sessão de teste o grupo CHX não diferiu estatisticamente do grupo VEI ($p=0,487$, teste t de Student para a mostras independentes; $n=10$ por grupo em ambas sessões).

3.5. MODIFICANDO A VARIÁVEL INTENSIDADE DE CHOQUE É POSSÍVEL REATIVAR/DESESTABILIZAR ESSA MEMÓRIA, MANTENDO A DURAÇÃO PADRÃO DA REATIVAÇÃO?

Condicionamentos com treinos mais fortes, que pode ser atribuído ao choque mais intenso, formam memórias mais robustas. Além disso, memórias mais fortes são mais difíceis de serem reativadas/desestabilizadas. Por isso, formulamos a hipótese de que se a variável intensidade do choque for menos intensa, uma memória menos forte será formada e será mais facilmente reativada/desestabilizada.

Para isso, realizamos um experimento em que apenas a variável intensidade do choque foi alterada para 0,5mA em relação ao protocolo padrão (reativação de 3min, foi utilizada a dose efetiva de CHX 4,4 mg/mL/kg após a reativação). Como a Figura 9 demonstra, os grupos não diferiram estatisticamente entre si na sessão de teste.

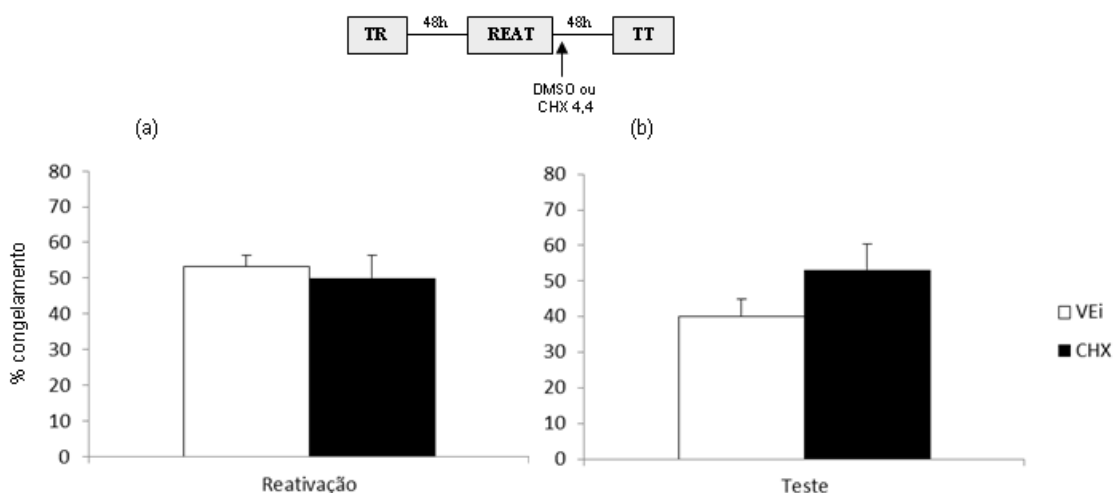


Figura 9: Treino com choque 0,5mA e reativação de 3min.(a) Na sessão de reativação os grupos não diferiram significativamente ($p= 0,68$, teste t de Student para amostras independentes). (b) Na sessão de teste o grupo CHX não diferiu estatisticamente do grupo VEI ($p= 0,141$, teste t de Student para amostras independentes; $n=9$ no grupo CHX, $n=10$ no grupo VEI em ambas sessões).

3.6. MODIFICANDO A VARIÁVEL INTENSIDADE DE CHOQUE E A VARIÁVEL DURAÇÃO DA SESSÃO DE REATIVAÇÃO É POSSÍVEL DESESTABILIZAR ESSA MEMÓRIA?

No experimento anterior o treino foi menos intenso (choque 0,5mA) mas mesmo assim o protocolo com sessão de reativação de 3min não foi eficaz em desestabilizar a memória. Por isso, realizamos um experimento com o choque mais fraco (0,5mA) e uma sessão de reativação mais prolongada (5min), pelos motivos que já foram exibidos anteriormente. Porém, os grupos não diferiram estatisticamente na sessão de teste (Figura 10).

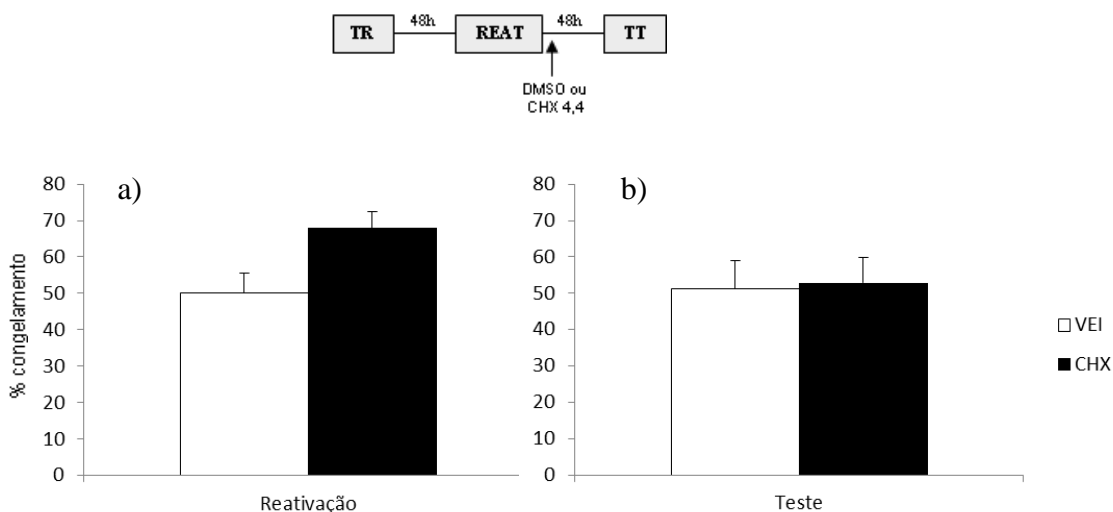


Figura 10: Treino com choque 0,5mA e reativação de 5min. (a) Na sessão de reativação os grupos não diferiram significativamente ($p= 0,09$, teste t de Student para a mostras independentes). (b) Na sessão de teste os grupos não diferiram estatisticamente ($p= 0,885$, teste t de Student para a mostras independentes; $n=7$ no grupo CHX, $n=9$ no grupo VEI em ambas sessões).

4. DISCUSSÃO E ANÁLISE

A condução dos experimentos na tentativa de repadronizar a tarefa de CAC seguiu a seguinte lógica:

- 1- Verificar se a dose efetiva do inibidor de síntese protéica (CHX, 2,2 mg/mL/kg) para prejudicar processos de consolidação e reconsolidação nos ratos da antiga cepa era efetiva também para prejudicar o processo de consolidação nos animais da nova cepa de ratos.
- 2- Descobrir a dose adequada em prejudicar o processo de consolidação nos animais da nova cepa de ratos.
- 3- Verificar se a dose efetiva de CHX (4,4 mg/mL/kg) encontrada no experimento anterior seria efetiva em prejudicar a memória de medo dos animais da nova cepa de ratos no dia do teste, usando o protocolo padrão do laboratório (choque 0,7mA, reativação de 3min).
- 4- Alterar a variável tempo da sessão de reativação/reexposição do protocolo usado para 5min e verificar se a dose efetiva de CHX prejudicaria a memória de medo no teste.
- 5- Alterar a variável força do treino (intensidade do choque) para 0,5mA (sessão de reativação padrão, 3min) e verificar se, assim, a dose efetiva de CHX prejudicaria a memória de medo no dia do teste.
- 6- Alterar a variável tempo da sessão de reativação/reexposição para 5min, conjuntamente com a diminuição da intensidade do choque (0,5mA), e verificar se a dose efetiva de CHX prejudicaria a memória de medo no teste.

A formação de memórias de longa duração e a manutenção de uma memória já formada, que foi reativada, dependem de síntese de novas proteínas, além de uma série de outras cascatas celulares envolvidas na plasticidade sináptica (JOHANSEN et al., 2011). Por isso, inibidores de síntese protéica administrados logo após o treino ou a reativação são capazes de prejudicar esses processos (consolidação e reconsolidação) e impedir a formação

ou a manutenção de uma memória (NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; SUZUKI, 2004; MILEKIC et al., 2006).

Memórias de longa duração nem sempre que são evocadas são reativadas/desestabilizadas. Existe uma série de fatores no protocolo utilizado que influenciam essa desestabilização ou não da memória. Portanto, para testar se a dose do inibidor de síntese protéica CHX seria efetiva em prejudicar esses processos dependentes de síntese protéica nos animais da nova cepa, e remover a variável protocolo capaz de desestabilizar a memória, testamos a dose injetando-a i.p. imediatamente após o treino (sobre a consolidação). Como a Figura 5 demonstra, os animais que receberam CHX 2,2 mg/mL/kg não apresentaram nível de congelamento diferente significativamente dos animais controle. Esse resultado indica que a dose de CHX não é adequada para prejudicar o processo de consolidação nos animais da nova cepa. Esse resultado sobre a consolidação nos fez inferir que no processo de reconsolidação essa dose de CHX também não seria eficaz.

O passo seguinte foi investigar a dose adequada para prejudicar o processo de consolidação. As doses utilizadas foram: (I) 2,2 mg/mL/kg (dose padrão) logo após o treino, (II) 2 administrações de CHX 2,2 mg/mL/kg (uma logo após e outra 3h após o treino) e (III) 4,4 mg/mL/kg logo após o treino. Na literatura encontra-se que existem pelo menos dois momentos de pico de síntese de proteínas após a consolidação: no período próximo à aquisição e de 3-6h depois (IGAZ et al., 2002; ALBERINI, 2009), por isso talvez fosse eficaz a segunda injeção de CHX. Além disso, o trabalho do grupo da Alberini (MILEKIC et al., 2006) mostrou que uma administração sistêmica de CHX 2,2mg/mL/kg, após a reativação de uma memória de preferência de lugar com morfina, a quantidade de proteínas no encéfalo homogeneizado diminuiu em 70%.

A Figura 6 mostra que o único grupo que apresentou nível de congelamento diferente do controle foi o que recebeu a dose de CHX mais alta. O que demonstra que a única dose de CHX testada capaz de prejudicar a consolidação foi de 4,4 mg/mL/kg, provavelmente porque com essa dose há uma maior porcentagem de inibição de síntese de proteínas do que a dose mais baixa (MILEKIC et al., 2006). Inferimos, então, que essa mesma dose seria capaz de prejudicar também a reconsolidação se encontrássemos um protocolo capaz de desestabilizar a memória. A partir deste experimento, os demais utilizaram a dose efetiva de 4,4 mg/mL/kg.

O terceiro experimento (Figura 7) demonstra que os grupos CHX e VEI não diferiram significativamente na sessão de reativação (ambos os grupos apresentam resposta de medo

estatisticamente semelhantes) nem na sessão de teste. O que indica que, apesar de a dose ser eficaz em inibir a consolidação (e, por inferência, a reconsolidação), o protocolo da tarefa de CAC não foi capaz de desestabilizar a memória.

Fortes evidências indicam que o fator tempo de reexposição ao estímulo condicionado é fator bastante crítico para a desestabilização ou não da memória. Sessões de reexposição muito longas geram extinção do traço (formação de nova memória com valência emocional oposta à original), enquanto sessões mais curtas podem desestabilizar o traço (SUZUKI, 2004; BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009). Porém em sessões curtas demais os animais podem apenas evocar sem desestabilizar a memória em questão. Por isso, no experimento 4 o tempo da sessão de reativação foi aumentado para 5min (tempo de reexposição que não desencadeia extinção com a antiga cepa de ratos). Mas esse protocolo não foi capaz de desestabilizar essa memória (Figura 8), pois os grupos na sessão de teste apresentaram altos níveis de congelamento e não diferiram entre si.

Outro fator importante na tentativa de desestabilizar a memória é a força da memória. Memórias mais fortes são mais difíceis de serem desestabilizadas (SUZUKI et al., 2004). Por isso, talvez mesmo ajustando a dose do inibidor de síntese protéica e modificando o tempo de reativação, de alguma forma esses animais sejam mais sensíveis e talvez o treino com choque de 0,7mA seja um treino intenso e gere uma memória mais forte que nos ratos da cepa antiga, assim sendo muito difícil essa memória ser desestabilizada. No experimento 5 diminuimos o choque para 0,5mA, mantivemos o tempo de reativação padrão (3min) e a dose efetiva de CHX. Mas, como a Figura 9 nos indica, a memória de medo do grupo CHX é semelhante estatisticamente a do grupo VEI, o que demonstra que o protocolo não foi capaz de reativar a memória.

No nosso último experimento, tentamos alterar as duas variáveis (intensidade do treino e tempo de reativação) conjuntamente: choque 0,5mA e reativação de 5min. Nossa hipótese era de que com uma memória menos forte e um tempo maior de reativação, fosse possível desestabilizar a memória e prejudicá-la bloqueando a síntese de proteínas. Mas a Figura 10 demonstra que os grupos mantiveram os níveis de congelamento semelhantes estatisticamente, e que o tratamento não teve efeito sobre a memória. Esse protocolo também não foi capaz de desestabilizar a memória no CAC dos ratos da nova cepa.

A variável tempo durante o treino não foi alterada porque avaliamos que o treino foi adequado para gerar uma memória de longa duração robusta, o que se pode verificar nas

sessões de teste 24h após o treino (Figura 5 e Figura 6) e nas sessões de reativação (Figura 7, Figura 8, Figura 9 e Figura 10), 48h após o treino. Diminuir ainda mais a intensidade do choque significaria diminuir ainda mais a força da memória, o que seria expressa por níveis menores de congelamento. Como o objetivo dessa tarefa no nosso laboratório é criar uma memória aversiva dos animais e conseguir reverter alguns consequentes prejuízos, avaliamos que diminuir ainda mais a intensidade do choque pode não ser adequado para esse objetivo. Se a média de congelamento for muito menor que 50% (valores médios encontrado na reativação de 0,5mA), talvez seja difícil verificar a ação da CHX em prejudicar a memória, já que há achados em relação à média do grupo reativado e tratado com CHX em torno de 20% (dados não publicados do nosso grupo).

A ansiedade basal desses animais não foi medida. Talvez esses animais apresentem níveis elevados de estresse, que interfiram de alguma maneira no processo de desestabilização da memória.

Uma hipótese a ser testada para não termos verificado reconsolidação na tarefa de CAC, é que essa linhagem de ratos Wistar seria mais sensível ao choque, apresentando níveis menores da subunidade NR2B do receptor NMDA, o que deixaria a memória em questão insensível à reativação/desestabilização. Nos animais da antiga cepa, 12min de reativação eram suficientes para desencadear uma extinção fraca. Mas Suzuki (2004) demonstrou que no CAC com camundongos a memória gerada por um treino fraco (1 choque 2s, 0,75mA) era desestabilizada com 3min, mas no treino forte (3 choques 2s, 0,75mA) eram necessários 10min de reativação. Então, se for verdade que esses animais são mais sensíveis, e por isso o treino é suficientemente forte para gerar uma memória robusta, talvez usar 10min de reativação seja capaz de desestabilizar a memória.

Por fim, não foi possível encontrar um protocolo adequado que desestabilize a memória no CAC nos animais da nova cepa, de forma que esta seja prejudicada através da inibição de sua reconsolidação pela CHX. Os motivos pelos quais isso aconteceu, vão além do escopo deste trabalho.

CONCLUSÕES

1 – Foi constatado que a dose padrão utilizada nos animais da antiga cepa não é adequada para inibir o processo de consolidação, quando injetada imediatamente após treino.

2 – Foi verificado que uma dose CHX de 2,2 mg/mL/kg imediatamente após o treino ou 2 doses de 2,2 mg/mL/kg (imediatamente após e 3h após) não foram eficientes em inibir a consolidação. A dose que conseguiu prejudicar a consolidação nos animais da nova cepa foi a de 4,4 mg/mL/kg.

3 – O protocolo de CAC padrão (choque 0,7mA e reativação de 3min) não foi capaz de desestabilizar a memória, já que a dose efetiva em inibir a consolidação (4,4 mg/mL/kg) não teve efeito sobre a memória nos animais da nova cepa, quando injetada após a reativação.

4 – O protocolo de CAC com choque 0,7mA e reativação de 5min não foi capaz de desestabilizar a memória, já que a dose efetiva em inibir a consolidação (4,4 mg/mL/kg) não teve efeito sobre a memória nos animais da nova cepa, quando injetada após a reativação.

5 – O protocolo de choque 0,5mA e reativação de 3min não foi capaz de desestabilizar a memória, já que a dose efetiva em inibir a consolidação (4,4 mg/mL/kg) não teve efeito sobre a memória nos animais da nova cepa, quando injetada após a reativação.

6 – O protocolo de choque 0,5mA e reativação de 5min não foi capaz de desestabilizar a memória, já que a dose efetiva em inibir a consolidação (4,4 mg/mL/kg) não teve efeito sobre a memória nos animais da nova cepa, quando injetada após a reativação.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a ansiedade basal seria interessante como mais uma informação a respeito desses animais que pode influenciar a repadronização da tarefa em questão.

- Realizar experimento aumentando ainda mais o tempo da sessão de reativação/reexposição (5-10min), com treino de choque 0,7 e 0,5mA.

Estamos propondo junto ao Centro de Reprodução de Animais de Laboratório (CREAL) a troca da cepa fundadora de ratos Wistar. A grande parte dos projetos de mestrado e de doutorado do nosso laboratório é baseada na teoria da reconsolidação e desde março de 2013 estamos tentando repadronizar a tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto. Muitos animais já foram utilizados neste laboratório para essa tentativa de repadronização. Em consonância com esses resultados negativos, mesmo as variáveis mais importantes tendo sido investigadas, há relatos (não publicados) de que outros pesquisadores dessa universidade notaram algumas diferenças comportamentais e estão com dificuldade de adequar protocolos.

Por motivos éticos em relação aos ratos e ao dinheiro público sendo gasto infrutiferamente (em relação ao nosso laboratório) na manutenção desses animais, dos materiais de laboratório e das bolsas (iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado), além do tempo e da motivação dos pesquisadores, acredito que o melhor a ser feito é a troca de cepa.

Se não for possível trocar a cepa de animais, após realizarmos os experimentos acima comentados, a perspectiva será mudar o foco da investigação e a maior parte dos projetos do laboratório para investigação de outras fases da memória, que não a reconsolidação.

REFERÊNCIAS

- AGRANOFF, B.W.; KLINGER, P. D. Puromycin effect on memory fixation in the goldfish. *Science*, v 146,p: 952–953, 1964
- ALBERINI, C. M. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiol Ver*, v 89, p 121–145, 2009
- BARONDES, S. H.; COHEN, H. D. Puromycin effect on successive phases of memory storage. *Science*, v 151, p 594–595, 1965
- BESNARD, A.; CABOCHE, J.; LAROCHE, S. Reconsolidation of memory: A decade of debate. *Progress in Neurobiology*, v 99, p 61–80, 2012
- BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Disruptive Effect of Midazolam on Fear Memory Reconsolidation: Decisive Influence of Reactivation Time Span and Memory Age. *Neuropsychopharmacology*, v 34, p 446–457, 2009
- DE OLIVEIRA ALVARES, L et al. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, v 83, p 119–124, 2005
- DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, v 244, p 42-48, 2013, 2013
- DEVIETTI, T. L.; KIRKPATRICK, B. R. The amnesia gradient: inadequate as evidence for a memory consolidation process. *Science*, v 194, p 438-440, 1976
- DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Current Opinion in Neurobiology*, v 16, p174–178, 2006
- DUNCAN, C. P. The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, vol 42(1), p 32-44, 1949
- FANSELOW, M. S. Conditional and Unconditional Components of Post-Shock Freezing. *Pay. J. Biol. Sei.*, v 15, p 177-182, 1980
- FLEXNER, L.B.; STELLAR, E. Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science*, v 141, p 57–59, 1963
- HAWKINS, R. D.; KANDEL, E. R.; BAILEY, C. H. Molecular Mechanisms of Memory Storage in *Aplysia*. *The Biological Bulletin Virtual Symposium*, p 174–191, 2006
- IGAZ, L. M., et al. Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *The Journal of Neuroscience*, v 22, p 6781–6789, 2002

- INDA, M. C.; MURAVIEVA, E. V.; ALBERINI, C.M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *Journal of Neuroscience*, v 31, p 1635–1643, 2011
- IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, v 393, p 635-636, jun. 1998
- IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, vol 103, p 1–11, fev 1999
- IZQUIERDO, I. *Memória*. Editora Artmed, 2010 (livro)
- JOHANSEN, J. P. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, v 28;147(3), p 509-24, 2011
- KANDEL, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Molecular Brain*, v 5:14, 2012
- LECHNER, H. A.; SQUIRE, L. R.; BYRNE, J. H. 100 Years of Consolidation--Remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*, v 6, p 77-87, 1999
- LEE, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory Relevance. *Trends in Neurosciences*, v 32, p 413-420
- MACTUTUS, C. F.; RICCIO, D. C.; FERREK, J. M. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science*, v 204, p 1319-20, 1979
- MCGAUGH, J. L. Memory - a Century of Consolidation. *Science*, v 287, p 248-251, 2000
- MCGAUGH, J. L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. *Science*, v 153, p 1351-1358, 1966
- MCGUIRE, S. E.; DESHAZER, M.; DAVIS, R.L. Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Progress in Neurobiology*, v 76, p 328–347, setembro 2005
- MERY, F. Natural variation in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, v 23, p 52–56, 2013
- MILEKIC, M. H. et al. Persistent Disruption of an Established Morphine Conditioned Place Preference. *The Journal of Neuroscience*, v 26, p 3010 –3020, 2006
- MILEKIC, M. H.; ALBERINI, C. M. Temporally Graded Requirement for Protein Synthesis following Memory Reactivation. *Neuron*, v 36, p 521–525, 2002
- MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, v 160.3827, p 554-55, 1968

- MYERS; DAVIS, 2002. Behavioral and Neural Review Analysis of Extinction. *Neuron*, v 36, p 567–584, 2002
- NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406.6797, p 722-26, 2000
- NADER, K.; EINARSSON, E. O. Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v 1191, p 27–41, 2010
- NADER, 2000 Nader, K., G. E. Schafe, and J. E. Le Doux. "Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval." *Nature* 406.6797 (2000): 722-26.
- NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature*, vol 10, p 224-234, mar 2009
- PHELPS, E. A. et al. Extinction Learning in Humans: Role of the Amygdala and vmPFC. *Neuron*, v. 43, p 897–905, 2004
- QUILLFELDT, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In: ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. *Animals Models of as Tools in Ethical Biomedical Research*, ed AFIP, 2010. Cap 20, p 341-383
- QUILLFELDT, J. A. Papel dos Receptores Glutamatérgicos do Tipo AMPA na Expressão da Memória no Córtex Entorrinal e Estruturas Relacionadas. Porto Alegre: UFRGS. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994
- SCHNEIDER, A. M.; SHERMAN, W. Amnesia: A Function of the Temporal Relation of Footshock to Electroconvulsive Shock. *Science*, v 159, p 219-221, 1968
- SQUIRE, L.R. Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychological Review*, vol. 99, N° 2, p 195-231, 1992
- SUZUKI, A. et al. Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *The Journal of Neuroscience*, v 24, p 4787– 4795, 2004
- VIANNA, M. R. M. et al. Short- and Long-term memory: Differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascade. *An. Acad. Bras. Ci.*, 72(3), p 354-364