

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE (ICBS)
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA**

ANNE KARINE BOSETTO FIEBRANTZ

**ESTUDO DO PAPEL DOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS NA RECONSOLIDAÇÃO
TARDIA DE MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO**

Porto Alegre

2023

ANNE KARINE BOSETTO FIEBRANTZ

**ESTUDO DO PAPEL DOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS NA RECONSOLIDAÇÃO
TARDIA DE MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva.

Porto Alegre

2023

*À flor mais linda do meu jardim,
Maria Clara, minha filha, você é perfume do Senhor.
Mamãe te ama muito!*

AGRADECIMENTOS

Quando comecei meu doutorado, jamais imaginaria tudo que aconteceria nesses 4 anos, nesse momento passa um filme na minha cabeça.

Agradeço à Deus. Obrigada Pai por tudo que o Senhor fez, está fazendo e ainda vai fazer na minha vida. Sou grata pelas oportunidades, pelas experiências, pelas vitórias e por todas as dificuldades. O Senhor é soberano, onipresente, onisciente e onipotente. Tua vontade é boa, perfeita e agradável. Maravilhosas são as Tuas obras.

“Portanto eu lhes digo: Não se preocupem com sua própria vida, quanto ao que comer ou beber; nem com seu próprio corpo, quanto ao que vestir. Não é a vida mais importante que a comida, e o corpo mais importante que a roupa? observem as aves do céu: não semeiam nem colhem nem armazenam em celeiros; contudo, o Pai celestial as alimenta. Não têm vocês muito mais valor do que elas?” Mt 6:25-26.

Agradeço ao meu marido, companheiro, homem inquebrantável. Obrigada por ser mão forte e olhar amoroso. Obrigada por cuidar de mim, da nossa família e do meu coração em tantos momentos que vivemos juntos, durante cada fase da nossa vida. Te amo muito! Juntos até depois do fim!

“O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. Não maltrata, não procura seus interesses, não se ira facilmente, não guarda rancor. O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta” 1Cor 13:4-7.

Agradeço à minha filha Maria Clara, por existir e por me tornar mãe. Sou uma pessoa melhor, porque Deus me deu você no dia 20 de janeiro de 2022. Como cientista achava que sabia algo sobre a vida e você me mostrou tudo diferente. Mas, tudo bem! Eu também achava que sabia o que era amor antes de te conhecer. Te amo filha, infinitamente mais do que um dia poderia imaginar.

“Como é feliz quem teme o Senhor, quem anda em seus caminhos! Você comerá do fruto do seu trabalho e será feliz e próspero. Sua mulher será como videira frutífera em sua casa; seus filhos serão como brotos de oliveira ao redor da sua mesa” Sl 128:1-3.

Agradeço aos meus pais, meus sogros, meus irmãos, cunhadas (os) pelo carinho, palavras de incentivo e apoio das mais diferentes formas. Se hoje consigo defender essa tese, cada um de vocês teve uma participação única e essencial em diferentes momentos.

“Quando um membro sofre, todos os outros sofrem com ele; quando um membro é honrado, todos os outros se alegram com ele” 1Cor 12:26.

Agradeço ao Prof Weber por mais uma vez depositar sua confiança em mim. Percorremos um caminho longo juntos, onde mais que um orientador, ganhei um amigo que por tantas vezes desabafei. Já te disse algumas vezes, mas sua inteligência é uma inspiração. Torço para que mais alunos tenham a oportunidade de conhecer o cientista e ser humano que você é. Obrigada por me escolher.

“O coração do que tem discernimento adquire conhecimento; os ouvidos dos sábios saem à sua procura” Pv 18:15

Agradeço ao pessoal do laboratório onde compartilhamos tantas horas juntos. Obrigada pelo auxílio nos experimentos, pela conversa leve e por todos os mates que tomamos juntos. Levo cada aprendizado e cada um de vocês no meu coração, contem comigo sempre.

“É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudá-lo a levantar-se. Mas pobre do homem que cai e não tem quem o ajude a levantar-se!” Ec 4:9-10

Agradeço ao financiamento da minha bolsa pela CAPES, pois em um período de pandemia, seguido da minha gravidez e nascimento da minha filha, pude contar com o meu salário. Sonho que um dia a pesquisa seja vista com outros olhos no nosso país e que reconheçam todo esforço que existe por trás de um documento desse ou de um título conquistado.

Agradeço também ao PPG pelo olhar compreensivo, pela disposição e por toda capacitação que nos fornece.

Muito obrigada!

Anne Karine Bosetto Fiebrantz.

Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, deve ser alcançada a qualquer custo.

Marie Curie

Mulher, cientista e primeira pessoa a ganhar o Nobel duas vezes.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC** - Adenilato ciclase
- ADA** – Adenosina desaminase
- ADP** – Adenosina difosfato
- AK** – Adenosina quinase
- AMPA** – Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol propiônico
- ATP** – Adenosina trifosfato
- CA1, CA2 e CA3** – Corno de Amon 1, 2 ou 3
- CaMKII** - Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina isoforma II
- cAMP** – Adenosilil monofosfato cíclico
- CRE** – Elemento responsivo ao cAMP
- CREB** – Proteína ligante ao CRE
- DAG** - Diacilglicerol
- ENT** – Transportador de nucleosídeos
- ERK1/2** – Proteína quinase regulada por sinal extracelular isoformas 1 e 2
- GABA** – Ácido C- aminobutírico
- GDP** – Guanisilil difosfato
- GTP** – Guanisilil trifosfato
- IMP** – Inosina monofosfato
- IP₃** – Inositol 3 fosfato
- LAM** – Labirinto aquático de Morris
- LTM** – Memória de longa duração
- LTP** - Potenciação de longa duração
- MAPK** – Proteína quinase ativada por mitógeno
- mRNA** – RNA mensageiro
- NOS** – NO sintase
- NTDases** – Ecto – 5 – nucleotidases
- PIP₂** – Fosfatidil – inositol- bifosfato
- PKA** – Proteína quinase A
- PLC** – Fosfolipase C
- PPSE** – Potencial Pós-Sináptico Excitatório
- RAP1**- Proteína associada a Ras, isoforma 1
- Rsk2** - Proteína quinase S6 – ribossomal isoforma 2

SNC – Sistema Nervoso Central

STM – Memória de curta duração

UDP – Uridina difosfato

UTP – Uridina trifosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos processos relacionados à memória. A etapa inicial para a formação de uma memória é a entrada dessas informações no respectivo sistema mnemônico, seguida pela seleção dessas informações, elegendo assim o que será de fato aprendido. Após a aquisição ocorre o armazenamento da mesma por um determinado período de tempo, chamado de memória de curta duração, a qual pode tornar-se ou não uma memória de longa duração pelo processo denominado consolidação. Quando evocada, essa memória pode ser esquecida, extinta, reconsolidada ou reforçada, de acordo com o uso e com os estímulos presentes durante a evocação da mesma..... 14

Figura 2: Estrutura interna do hipocampo e suas principais conexões. O córtex entorrinal se comunica com o hipocampo através de duas vias principais, uma direta e outra indireta. Na via direta a comunicação se faz dos neurônios da camada III do córtex entorrinal, diretamente com os neurônios de CA1. Já na via indireta, os neurônios da camada III do córtex entorrinal fazem sinapse com as células granulares do giro denteado, que por sua vez fazem conexão com as células piramidais de CA3. Estes axônios conectam o subículo e a CA1. Dentate gyrus: giro denteado Adaptado de: (DE MICHELE, 2015)..... 16

Figura 3: Representação das place cells ou células de lugar no cérebro de ratos com um mapa de calor de acordo com a taxa de disparo de uma célula local registrado no momento em que animal explorou um ambiente circular. As abreviações presentes na figura são: HPC hipocampo; Sub = subículo, RSC = córtex retrosplenial; PrS = pré - ubículo; PaS = parasubículo; mEC = córtex entorrinal medial; CEI = córtex entorrinal lateral; PFC = córtex pré-frontal; OFC = córtex orbitofrontal. Adaptado de (GRIEVES; JEFFERY, 2017)..... 19

Figura 4: Formação e captação de adenosina. A formação extracelular de adenosina deriva da quebra dos seus precursores ATP, ADP e AMP por uma família de enzimas denominadas ectonucleotidases, na figura CD39 e CD73. Essa adenosina extracelular é convertida em inosina pela enzima adenosina desaminase. O transporte de adenosina do meio extracelular para o meio intracelular é feito de acordo com o gradiente de concentração por meio dos transportadores de nucleosídeos (ENTs). A formação intracelular de adenosina é via S-adenosil-homocisteína (SAH) através da enzima SAH-hidrolase e também a partir de 5'AMP através de uma enzima endo-5-nucleotidase. Já o consumo dessa adenosina intracelular pode ser feito tanto pela adenosina quinase,

que converte essa adenosina em 5'AMP ou pela adenosina desaminase que a converte em inosina. Adaptado de: (BOREA et al., 2018)	25
Figura 5: Distribuição dos receptores adenosinérgicos no Sistema Nervoso Central. Olfactory bulb: bulbo olfatório. Amygdala: amígdala Striatumpallidal: núcleo estriado. Substantia nigra: substância negra. Nucleus tractus solitarius: núcleo do trato solitário. Cerebellum: Cerebelo. Thalamus: Tálamo. Hippocampus: Hipocampo Adaptado de: (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009).....	27
Figura 6: Organização dos animais. Após a chegada, os ratos foram separados em caixas com etiquetas de acordo com o grupo, em quantidade de 5 animais por caixa, sendo essas forradas com maravalha esterilizada. Receberam água e comida a vontade em um ambiente climatizado entre 23 a 25 graus celsius. Fonte: Foto da própria autora.	34
Figura 7: Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia para a administração dos fármacos diretamente na região de interesse, nesse caso a área CA1 do hipocampo dorsal, foi necessária a realização da cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia que seriam necessárias para os próximos passos do experimento. A primeira ação cirúrgica é a exposição do crânio do animal para que se obtenha a confirmação visual do local do bregma, que serve como direção para as coordenadas de implantação. Após, ocorre o posicionamento dos parafusos que servem como suporte e sustentação para o capacete de acrílico. Neste caso utilizamos dois parafusos, um anterior ao bregma e um posterior ao lambda, para diminuir a probabilidade de queda destes capacetes, uma vez que os animais permaneceram com os mesmos durante aproximadamente 15 dias. Feito isso, as cânulas são implantadas e o capacete é construído com acrílico autopolimerizável. Fonte: Foto da própria autora.	35
Figura 8: Desenho experimental para reconsolidação recente de memória espacial de longa duração	37
Figura 9: Desenho experimental para reconsolidação remota de memória espacial de longa duração	38
Figura 10: Aparato de infusão. O aparato é composto por uma seringa Hamilton, um tubo de polietileno e uma cânula de infusão. Após a realização do teste, a seringa Hamilton foi carregada, o animal imobilizado e então feita a infusão lentamente. Fonte: Foto da própria autora.	39
Figura 11: Infusão. Após a infusão lenta de salina no caso do grupo controle ou das drogas de interesse de acordo com o grupo do animal, a cânula é deixada na luz da cânula guia por um tempo de 30 segundos, para evitar refluxo da droga. Fonte: Foto da própria autora.	40

Figura 12: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina e do agonista adenosinérgico A3 imediatamente pós-teste sem reforço afetou a reconsolidação remota de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas após. O mesmo efeito não foi produzido quando essa memória remota foi de longa duração remota, testada 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de CPA 10 nmol/lado (Agonista A₁, barra hachurada horizontal) ou HEMADO 10 nmol/lado (Agonista A₃, barra hachurada vertical) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. O grupo Adenosina e Agonista A₃, no teste 24 horas pós-teste são os grupos que apresentaram desempenho prejudicado em relação ao percentual de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * p < 0,05, ** p < 0,01 vs. Salina, em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: F(4, 34) = 0,8639; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: F(4, 34) = 5,478; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: F(4, 34) = 1,641. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) (n = 6 – 11 por grupo)..... 44

Figura 13: O efeito amnésico induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é parcialmente revertido por co-infusão com antagonista A1 e com antagonista A3. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Adenosina 10 nmol + DPCPX 50 nmol/lado (Antagonista A₁, barra hachurada horizontal) ou Adenosina 10 nmol + MRS3777 50 nmol/lado (Antagonista A₃, barra hachurada vertical) imediatamente após

este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo.* $p < 0,05$ vs. Salina, em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: $F(4, 42) = 1,164$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 42) = 3,122$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 42) = 0,6615$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n = 10-18$ por grupo)..... 47

Figura 14: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de antagonistas A1e A3 imediatamente pós-teste sem reforço não afeta a reconsolidação remota de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 μ l) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Adenosina DPCPX 50 nmol/lado (Antagonista A₁, barra hachurada horizontal) ou MRS 3777 50 nmol/lado (Antagonista A₃, barra hachurada vertical) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo* $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: $F(4, 37) = 0,6432$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 37) = 3,201$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 37) = 0,6534$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n= 10- 12$ por grupo). 49

Figura 15: O efeito amnésico da reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é inibido por co-infusão com lactacistina. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 horas depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência

da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Lactacistina (Lactacistina, barra quadriculada de fundo branco) ou Adenosina 10 nmol/lado + Lactacistina (Adenosina + Lactacistina, quadriculada de fundo cinza) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo.* $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 24 h pós-treino: $F(4, 46) = 1,300$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 46) = 4,900$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 46) = 5,836$. Os outros grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) (n = 7 a 13 por grupo)..... 51

Figura 16: O efeito amnésico na reconsolidação remota de memória de longa duração recente e remota induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é inibido por co-infusão com lactacistina. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Lactacistina (Lactacistina, barra quadriculada de fundo branco) ou Adenosina 10 nmol/lado + Lactacistina (Adenosina + Lactacistina, quadriculada de fundo cinza) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo.* $p < 0,05$ vs. em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: $F(4, 38) = 0,6728$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 38) = 2,494$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 38) = 0,7719$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) (n = 6 a 14 por grupo)..... 53

Figura 17: O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de rapamicina sobre a reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota é dose-

dependente. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 horas depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de rapamicina 1 µg/µl/lado (Rapamicina 1 µg/µl, barra cinza claro), de rapamicina 5 µg/µl/lado (Rapamicina 5 µg/µl, barra cinza escuro) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 24 horas pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Os outros grupos diferiram significativamente do porcentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) (n = 9 a 16 por grupo). 56

Figura 18: O efeito amnésico sobre a reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota causado pela infusão intra-CA1 de rapamicina é dose-dependente, e reversível pela coadministração com o antagonista A₃ MRS 3777.

Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 horas depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de antagonista A₃ 50nmol/lado (Anti A₃ 50 nmol, barra cinza), de rapamicina 1 µg/µl (Rapamicina 1 µg/µl, barra quadriculada de fundo branco) ou rapamicina 1 µg/µl + antagonista A₃ 50 nmol/lado (Rapamicina 1 µg/µl + Antagonista A₃ 50 nmol, quadriculada de fundo cinza) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 24 horas pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 24 h pós-treino: $F(5, 66) = 0,6263$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(5, 66) = 5,171$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(5, 66) = 5,951$. Todos os grupos diferiram significativamente do porcentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) (n = 8 a 15 por grupo) 58

Figura 19: A administração dos fármacos foi realizada no hipocampo dos animais.

Um corte transversal foi realizando onde se pode observar na figura 19.A e 19.B a infusão realizada diretamente no hipocampo dos animais. Já nos animais controles 19.C e 19.D vemos a mancha azul na região acima, no córtex occipital. 60

Figura 20: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 24 horas após a última sessão de treino não prejudica a evocação de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 48 horas e 6 dias após a última sessão de treino. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram 68 treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais. Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 24 horas pós-treino (INF). (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um teste de 60 s realizado 48 h pós-treino, e em um segundo teste de 60 s realizado 6 d pós-treino. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student.. (n = 10 – 11 por grupo)..... 62

Figura 21: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste com reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram 70 treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s com a presença da plataforma de escape (R, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste, ambos com a plataforma de escape ausente. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro

do quadrante-alvo quando a plataforma de escape esteve ausente (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student.. (n = 6 por grupo). 64

Figura 22: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 3 horas pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados 72 durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 3 h após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (± EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. (n = 6 – 8 por grupo)..... 66

Figura 23: Infusão bilateral intracórtex occipital médio-lateral de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando 1 mm acima da 74 região CA1 do hipocampo dorsal, ou seja, a região cortical occipital médio-lateral, foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região cortical occipital médio-lateral de ratos imediatamente após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste

de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. (n = 6 – 7 por grupo)..... 68

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
I INTRODUÇÃO	13
I.1 Memória.....	13
I.1.1. Localização das memórias	15
I.1.2 Classificação das memórias	16
I.1.3 Memória espacial.....	18
I.2 Consolidação da memória	20
I.3 Reconsolidação da memória.....	21
I.4 Sistema adenosinérgico.....	23
I.4.1 Receptor Adenosinérgico A ₁	27
I.4.2 Receptor Adenosinérgico A ₃	28
I.5 Objetivos	29
II.5.1 Objetivo Geral.....	29
II.5.2 Objetivos específicos	29
I.6 Hipótese.....	30
II METODOLOGIA.....	33
II.1 Amostra.....	33
I.2 Cirurgia esterotáxica	35
II.3 Tarefa comportamental do Labirinto Aquático de Morris.....	36
II.3.1 Treinamento.....	36
II.3.2 Teste – Reconsolidação recente de memória espacial de longa duração.....	37

II.3.3 Teste - Reconsolidação remota de memória espacial de longa duração.....	37
II.4 Tratamento farmacológico	38
II.4.1 Fármacos utilizados	40
II.5 Controle histológico da localização das cânulas-guia e local de infusão	41
II.6 Controle Reforço	41
II.7 Controle Infusão.....	41
II.8 Controle temporal.....	42
II.9 Controle estrutura	42
II.10 Análise estatística de dados	42
III RESULTADOS.....	43
3.1. Efeito da adenosina e da ativação individual dos receptores adenosinérgicos sobre a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota.	43
3.2. Reversão receptor-específica do efeito amnésico da adenosina sobre a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota.....	46
3.3 Participação da adenosina endógena na reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota	48
3.4 Relação do efeito amnésico causado pela adenosina no processo de reconsolidação da memória espacial de longa duração e inibição da degradação proteica.	50
3.5 Inibição da via mTOR pela rapamicina prejudica a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração relacionada à tarefa do Labirinto Aquático de Morris.	54
3.5.1 O efeito da rapamicina sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração relativa ao LAM é dose dependente.....	55
3.5.2 O efeito do antagonista adenosinérgico A ₃ MRS 3777 inibe o efeito amnésico da rapamicina na dose de 5 µg/µl	57
3.5.3 Controle da localização das cânulas-guia e local de infusão.....	59

3.5.4 Controle infusão.....	60
3.5.5 Controle reforço	63
3.5.6 Controle temporal	65
3.5.7 Controle estrutura	67
III DISCUSSÃO	70
IV CONCLUSÃO	76
VI REFERÊNCIAS	77
V ANEXOS	85
V.1 Artigo de revisão.....	85
V.2 Artigo com os dados da tese	85
V.3 Parecer do Comitê de Ética de Uso em Animais (CEUA).....	86

RESUMO

Atualmente não há estudos que descrevam o papel dos receptores adenosinérgicos na reconsolidação de memória espacial de longa duração como um todo. Neste trabalho, elucidamos o papel da adenosina infundida bilateralmente intra-CA1 na concentração de 10 nmol, imediatamente após a sessão de teste, com o objetivo de entender se a adenosina é capaz de causar amnésia anterógrada para reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota. O efeito da adenosina na reconsolidação remota de memória de longa duração recente foi mimetizado via agonista específico A_3 (HEMADO), indicando ela exerce tal efeito via receptores A_3 majoritariamente. Mostramos também que seu efeito amnésico depende da ocorrência de degradação proteica e que o efeito amnésico da inibição de síntese protéica local é dependente da ativação de receptores A_3 .

Palavras-chave: memória, reconsolidação, adenosina, receptores purinérgicos, LAM, water maze.

ABSTRACT

Currently, there are no studies describing the role of adenosinergic receptors in the reconsolidation of long-term spatial memory as whole. In this work, in continuation of another, we elucidate the role of adenosine infused bilaterally intra-CA1 at concentration of 10 nmol, immediately after the test session, with the aim of understanding whether adenosine is capable causing anterograde amnesia for remote memory reconsolidation recent and remote long-term space. The effect of adenosine in remote reconsolidation of recent long-term memory was mimicked via a specific A3 agonist (HEMADO), indicating once again that it possibly exerts its effects via A3 receptors primarily. We also elucidate that exerts its amnesic effect through protein degradation and probably in addition to a decrease in protein synthesis.

Keywords: memory, reconsolidation, adenosine, purinergic receptors, LAM, Water maze.

I INTRODUÇÃO

I.1 Memória

Entendemos por memória a nossa capacidade de codificar, armazenar e posteriormente evocar e utilizar, quando necessário, informações que uma vez fomos expostos, sendo essa dinâmica de formação da memória fundamental para nosso processo adaptativo, para nossas reações comportamentais e todo o nosso desenvolvimento (KANDEL *et al.*, 2014; MCGAUGH, 2000; SQUIRE, 1986). A memória tem grande importância na formação da nossa personalidade assim como da nossa interação social, tornando imprescindível o entendimento da maneira como as informações são armazenadas (ALBERINI; LEDOUX, 2013).

O primeiro dos processos envolvidos na memória é a aquisição, que é a entrada de qualquer informação/evento que seja de alguma forma memorizável nos sistemas mnemônicos relacionados a memória. Após a entrada desses eventos, os mesmos passam por um tipo de seleção, visto que o sistema de memória é um sistema com capacidade finita (LENT, 2010; ORLANDI *et al.*, 2020). Essa seleção é feita pelas características daquilo que está sendo aprendido, do quanto aquilo foi focalizado pela atenção, da importância sensorial que acompanhou a experiência e muitos outros fatores que determinam se esse conteúdo vai ser memorizado de alguma forma ou não. Seguidamente à entrada e seleção desses eventos, o conteúdo pode ser armazenado por diferentes períodos de tempo, que vão desde alguns segundos até anos (FAN *et al.*, 2022; IZQUIERDO, 2018; MCGAUGH, 2000).

As informações armazenadas por um curto período são classificadas como memória de curta duração, que podem ou não se tornarem uma memória de longa duração. O grande papel da memória de curta duração é manter essa memória disponível pelo tempo necessário até que ela se torne uma memória de longa duração (FAN *et al.*, 2022; MCGAUGH, 2000). O processo que permite o armazenamento de modo prolongado dessas informações é chamado de consolidação da memória, que é o momento em que há estabilização das redes neurais relacionadas a uma lembrança (HALES *et al.*, 2018; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; MCGAUGH, 2000; MORRIS, 2003; ORLANDI *et al.*, 2020).

Caso essa memória se torne uma memória de longa duração e fique disponível para evocação por um longo período de tempo, a cada evocação essa memória pode seguir alguns caminhos distintos, uma vez que ela se encontra novamente em um estado de instabilidade (ALBERINI, 2011; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; ORLANDI *et al.*, 2020) (**Figura 1**).

O armazenamento de uma memória está diretamente relacionado à quantidade de vezes que essa memória foi de certa forma solicitada, assim, aquelas informações que não tiveram uso durante algum período passam pelo processo de esquecimento que é fisiológico e necessário (NIKITIN *et al.*, 2019). Caso a informação apresentada no momento da evocação seja exatamente a mesma que estava presente durante o aprendizado, há apenas o reforço do traço mnemônico aprendido. Porém, se no momento da evocação houver muita diferença entre o estímulo que estava presente durante o aprendizado e o estímulo apresentado no momento da evocação, dispara-se um processo chamado de extinção (**Figura 1**), e uma vez extinta a informação prévia, o sistema reconhece a informação atual como nova e todos os processos de consolidação ocorrem novamente (BLAKE *et al.*, 2014; ORLANDI *et al.*, 2020).

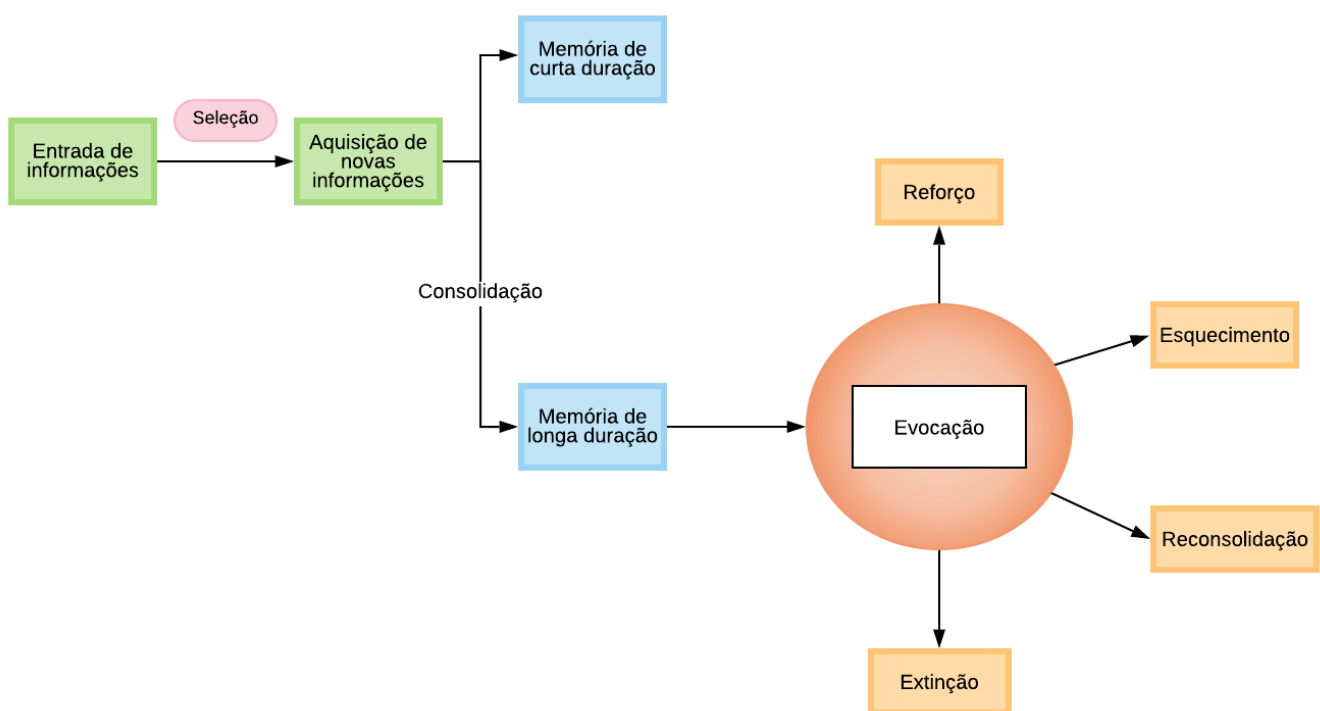


Figura 1: Esquema dos processos relacionados à memória. A etapa inicial para a formação de uma memória é a entrada dessas informações no respectivo sistema mnemônico, seguida pela seleção dessas informações, elegendo assim o que será de fato aprendido. Após a

aquisição ocorre o armazenamento da mesma por um determinado período de tempo, chamado de memória de curta duração, a qual pode tornar-se ou não uma memória de longa duração pelo processo denominado consolidação. Quando evocada, essa memória pode ser esquecida, extinta, reconsolidada ou reforçada, de acordo com o uso e com os estímulos presentes durante a evocação da mesma.

Não obstante, se a informação for parcialmente diferente do apresentado durante o aprendizado, dispara-se um processo distinto, chamado de reconsolidação da memória, que nada mais é do que a atualização, adição ou até mesmo a substituição de parte de uma informação antiga por parte da informação nova, processo que é possível devido a presença de algum ou de alguns estímulos no momento da evocação que previamente haviam condicionado o aprendizado. (ALBERINI, 2005; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). A reconsolidação é o processo responsável pela estabilização dessa memória novamente após sua evocação nesta situação. (FURINI *et al.*, 2020; HALES *et al.*, 2018; ORLANDI *et al.*, 2020)

Após descrever os parágrafos acima, percebemos que estudar memória é fascinante por diversos motivos. Atribuímos à memória a nossa capacidade de lembrarmos daqueles que amamos, de realizarmos a nossas atividades de vida diária, de aprendermos informações novas, excluirmos e atualizarmos aquelas que não nos representam mais de alguma forma. A memória nos dá a liberdade de sermos quem nós realmente somos e o que mundo exterior representa em nós.

1.1.1. Localização das memórias

Para que uma memória realmente se forme e se expresse em pleno funcionamento, ela requer a participação de diversas estruturas cerebrais. As duas principais estruturas responsáveis pela formação e evocação das memórias declarativas são intercomunicadas no lobo temporal medial, sendo elas o hipocampo e o córtex entorrinal. (MUEHLROTH; RASCH; WERKLEBERGNER, 2020).

A área CA1 do hipocampo protagoniza a formação de memórias declarativas, e o sítio final de armazenamento dessas memórias é majoritariamente o córtex cerebral (DUDAI, 2004; FAN *et al.*, 2022). É dito que, ao longo do tempo, com a consequente reativação dessas memórias, elas

passam por uma reorganização dependente do córtex, conseqüentemente independente do hipocampo (BROADBELT *et al.*, 2022; LOPEZ; VASCONCELOS; CASSEL, 2008).

O córtex entorrinal e o hipocampo se comunicam através de duas vias principais, sendo uma delas uma via direta e a outra uma via indireta. Pela via direta ocorre uma comunicação dos neurônios da camada III do córtex entorrinal diretamente com os neurônios de CA1. Já pela via indireta, também conhecida por via trissináptica, ocorre a comunicação dos neurônios da camada II do córtex entorrinal com as células granulares do giro denteado. Essas então se projetam nas vias musgosas, excitando as células piramidais de CA3 que finalmente emitem axônios pela via dos colaterais de Schaffer até as células piramidais proximais de CA1 (**Figura 2**). (IZQUIERDO, 2018; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; KANDEL *et al.*, 2014)

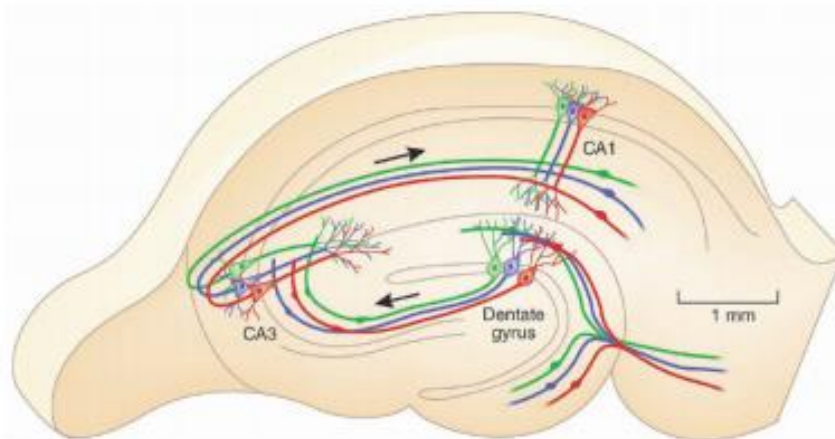


Figura 2: Estrutura interna do hipocampo e suas principais conexões. O córtex entorrinal se comunica com o hipocampo através de duas vias principais, uma direta e outra indireta. Na via direta a comunicação se faz dos neurônios da camada III do córtex entorrinal, diretamente com os neurônios de CA1. Já na via indireta, os neurônios da camada III do córtex entorrinal fazem sinapse com as células granulares do giro denteado, que por sua vez fazem conexão com as células piramidais de CA3. Estes axônios conectam o subículo e a CA1. Dentate gyrus: giro denteado. Adaptado de: (DE MICHELE, 2015)

1.1.2 Classificação das memórias

As memórias podem ser classificadas quanto a sua função, seu tempo de duração e de acordo com as características de seu conteúdo.

Quanto a sua função, a primeira classificação divide a memória em memória de trabalho (ou operacional) e memória de armazenamento. A memória

de trabalho é um tipo de processamento *online* de informações que permite que processemos a informação a cada instante, pois ela nos ajuda a entender o que estamos fazendo a cada momento, dando continuidade aos nossos atos (IZQUIERDO, 2018). Já a memória de armazenamento envolve todas as outras memórias, que são o foco do presente trabalho.

A memória de trabalho é processada pelo córtex pré-frontal anterolateral e órbito-frontal, tendo conexões com a amígdala basolateral e o hipocampo, e tem como principal diferença dos outros tipos de memória o fato de não deixar traços bioquímicos, pois são informações que são mantidas por um determinado período e logo em seguida são esquecidas. O grande papel da memória de trabalho é realmente filtrar se as informações são novas ou não e se serão úteis para aquele indivíduo (IZQUIERDO, 2018).

De acordo com a natureza do seu conteúdo, a memória pode ser dividida em explícita ou implícita. A memória explícita é aquela que pode ser declarada comportamentalmente por nós humanos e por outras espécies de alguma forma, seja por meio de ação ou reação a objetos ou até mesmo por dicas. Também é conhecida como memória declarativa, podendo ser dividida em episódica e semântica.

As memórias declarativas episódicas são conhecidas também como autobiográficas, porque estão relacionadas a vida do indivíduo, a sua vivência, geralmente relacionada com eventos datados, como data de aniversário, formatura, casamento etc. Já as memórias semânticas são memórias mais gerais, como por exemplo o conhecimento de disciplinas específicas, conexão de cheiros e lembranças e entre outros. (IZQUIERDO, 2018; LENT, 2010).

Já a memória implícita está relacionada a informações que não se podem declarar e requer mais tempo para se formar, pois são adquiridas de forma prática por tentativa e erro. Elas são subdivididas em memórias de representação perceptual, de procedimentos, memórias associativas e não associativas. Como exemplos temos memória cultural, memória de hábitos, coordenação motora e habilidades. (LENT, 2010).

Finalmente, quanto ao tempo de duração, as memórias podem ser classificadas em memória de curta duração e memória de longa duração. Essa

classificação está de acordo com o tempo em que essas memórias vão estar de certo modo disponíveis para serem lembradas. A memória de curta duração dura de alguns minutos até 6 horas ou o tempo necessário para que a memória de longa duração se consolide, e a memória de longa duração permanece por um período mais duradouro podendo chegar a anos, sendo chamada então de memória remota. (IZQUIERDO, 2018; LENT, 2010; LOPEZ; VASCONCELOS; CASSEL, 2008)

1.1.3 Memória espacial

A memória espacial é responsável pela capacidade de localização em um determinado local, de acordo com as dicas que esse ambiente apresenta, uma vez que é possível observar e memorizar as dicas presentes no ambiente, construindo um mapa mental desse ambiente, sendo que esse processo inclui a integração de várias vias mnemônicas e executivas que usamos diariamente para exibir um comportamento de navegação bem sucedido (JIMÉNEZ-RUBIO *et al.*, 2020).

A memória espacial possui especial destaque em pesquisa comportamental realizada em animais experimentais, uma vez que é o tipo de memória com maior extrapolabilidade de resultados de tarefas mnemônicas em animais para humanos, pois assim como os animais, os humanos utilizam mapas espaciais não apenas para localização, mas também como um importante substrato que integra o raciocínio em geral (HERWEG; KAHANA, 2018; LEÓN; TASCÓN; CIMADEVILLA, 2016; MONCADA; BALLARINI; VIOLA, 2015; SCHOENFELD *et al.*, 2017).

O cérebro utiliza dois sistemas de navegação, um deles que utiliza pistas referenciais externas ao organismo, chamada de navegação aloentríca, e outro usando o próprio corpo como referência de movimento e sinais internos, denominada navegação egocêntrica (VORHEES; WILLIAMS, 2015). A navegação aloentríca envolve o hipocampo, o córtex entorrinal e as estruturas adjacentes, sendo que vários experimentos comportamentais já demonstraram a importância da formação hipocampal para o aprendizado espacial, mostrando que lesões nessa área prejudicam gravemente a navegação, reconhecimento e a localização espacial (KOBAYASHI *et al.*, 2003; MORRIS, 1984).

No momento em que um rato está em um determinado local, algumas células hipocampais específicas disparam, células essas conhecidas como *place cells* ou apenas células de lugar. Assim, toda vez que esse animal passar novamente neste local, as mesmas células irão disparar, indicando que ele já esteve naquele lugar anteriormente. Dessa forma, com a passagem em diferentes locais e o conseqüente disparo de células hipocampais diferentes, o animal pode elaborar um mapa preciso do local em que está explorando (**Figura 3**) (KOBAYASHI *et al.*, 2003; O'KEEFE; DOSTROVSKY, 1971).

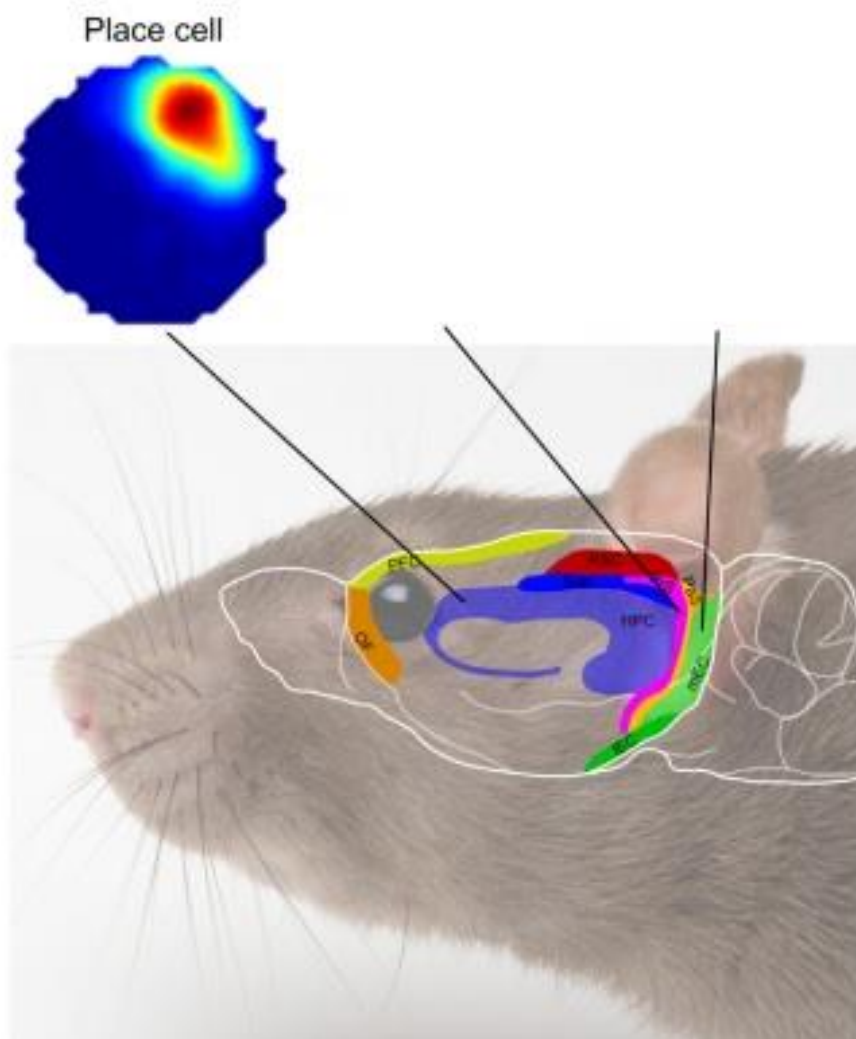


Figura 3: Representação das place cells ou células de lugar no cérebro de ratos com um mapa de calor de acordo com a taxa de disparo de uma célula local registrado no momento em que animal explorou um ambiente circular. As abreviações presentes na figura são: HPC hipocampo; Sub = subículo, RSC = córtex retrosplenial; PrS = pré -ubículo; PaS = parasubículo; mEC = córtex entorrinal medial; CEI = córtex entorrinal lateral; PFC = córtex pré-frontal; OFC = córtex orbitofrontal. Adaptado de (GRIEVES; JEFFERY, 2017)

Esta forma de memória é avaliada em animais por muitos métodos, mas predominantemente o labirinto aquático de Morris atualmente é o paradigma mais utilizado para se estudar a memória espacial. Descrito desde 1981, apresenta uma série de vantagens quando comparado a outras tarefas comportamentais também utilizadas em estudos de memória (D'HOOGE; DEYN, 2001; HALES *et al.*, 2018; MORRIS, 1981). A primeira de suas vantagens é que os roedores são nadadores naturais, dessa forma descartando procedimentos de pré-treinamento. Quando largados em um ambiente aquático, a estratégia usada é o fato de que estes animais são altamente motivados a escaparem de um ambiente aquático, tendo como principal objetivo a busca por algum escape, que nesta tarefa consiste em uma plataforma. Uma vez que o mesmo encontre essa plataforma, acaba escapando da água, assim o LAM trabalha com um reforço positivo para esses animais, ao contrário de outras tarefas comportamentais como o labirinto em Y, em T ou o labirinto de Barnes (BARNES *et al.*, 1990), que muitas vezes implicam em privação de água ou comida, levando a um reforço negativo sobre esse animal (LOCCHI *et al.*, 2007).

Outra de suas grandes vantagens é o fato de ser um labirinto de água. Os ratos são animais com o sentido do olfato extremamente sensível e apurado, assim, uma vez que trabalhamos com labirintos fora da água, o processo de limpeza entre um animal e outro deve ser muito rígido uma vez que o animal seguinte tende a descobrir o local correto apenas pelo rastro de cheiro do animal anterior. Quando o ambiente de treino e teste é feito dentro da água, isolamos o fator cognitivo (aprendizagem e memória), pois os animais não conseguirão guiar-se pelo cheiro do animal anterior e sim somente pelo seu próprio desempenho mnemônico (CHOI *et al.*, 2006).

Além disso, outra vantagem da tarefa do LAM são os parâmetros que são utilizados para indicar aprendizagem e memorização, fazendo com que os resultados coletados da tarefa sejam apresentados de forma bastante robusta, o que é de grande valia em se tratando de tarefas comportamentais que em geral possuem baixa reprodutibilidade (CHOI *et al.*, 2006).

1.2 Consolidação da memória

Uma vez que as memórias são adquiridas, elas não são armazenadas na sua forma definitiva e isso faz com que essas lembranças sejam susceptíveis a interferências (MCGAUGH, 2000). Após uma memória ter sido armazenada por um curto período, ela pode se tornar uma memória de longa duração por meio de uma série de processos metabólicos, que em conjunto correspondem à consolidação. Diferentemente da memória de curta duração, a memória de longa duração envolve alterações que ocorrem de forma permanente, que requerem o período de pelo menos 3 horas (IZQUIERDO *et al.*, 2006; MUEHLROTH; RASCH; WERKLE-BERGNER, 2020). Essas alterações ocorrem através da mobilização de segundos mensageiros e cascatas de transdução de sinal que convergem para a transcrição de novos RNA mensageiros e posterior tradução de novas proteínas, as quais serão utilizadas na reestruturação das sinapses envolvidas com os sinais dos neurotransmissores, dessa forma levando ao aumento ou diminuição de vesículas sinápticas juntamente com alterações nas espinhas dendríticas pós-sinápticas, que resultarão em um aumento ou diminuição da capacidade de geração de um potencial de ação pós-sináptico (ALBERINI; LEDOUX, 2013; ROESLER, 2017).

1.3 Reconsolidação da memória

Durante muito tempo achava-se que uma memória, uma vez estabilizada, estaria armazenada em seu estado final insensível a qualquer tipo de perturbação, ou seja, que a consolidação se tratava de um processo unitário, um processo que dependia de um nível de expressão gênica por algumas horas e que logo após a memória respectiva estaria estável, portanto consolidada (DAVIS; SQUIRE, 1984; MCGAUGH *et al.*, 2005).

No entanto, conforme novas observações experimentais sobre a estabilidade de uma memória já consolidada, verificou-se que, no momento de sua evocação, uma memória entrava em um estado lábil mais uma vez, e o processo que fazia com que essa memória retornasse ao seu estado estável novamente foi chamado de reconsolidação (KILEY; PARKS, 2022; LEE; NADER; SCHILLER, 2017; NADER KARIM; SCHAFE GLENN E.; LE DOUX JOSEPH E., 2000). Uma vez evocada, uma memória pode ter alguns possíveis destinos, sendo a reconsolidação um desses destinos.

A reconsolidação consiste na atualização da informação previamente consolidada de alguma forma, seja com uma adição ou uma substituição dos dados antigos (ALBERINI, 2011). Além da reconsolidação, essa informação pode cair em “desuso” e ser esquecida, ou pode ser disparado o processo de extinção (IZQUIERDO, 2018; LEE; NADER; SCHILLER, 2017; ORLANDI *et al.*, 2020). Quando falamos em consolidação da memória entendemos que esse é um processo que ocorre uma vez, ou seja, processa-se a informação no sistema (memória de trabalho), então a memória de curta duração a deixa disponível por um tempo suficiente até que a memória de longa duração possa ser formada. Entretanto, uma vez consolidada a informação, observamos que ao longo da vida desse indivíduo o processo que poderá ocorrer inúmeras vezes é o processo de evocação, que dependendo do contexto que disparou esta evocação, pode ser seguido pelo processo de reforço (um fortalecimento do que fora antes consolidado), ou de reconsolidação (uma nova consolidação com atualização do conteúdo prévio), ou de extinção (uma nova consolidação que substitui o conteúdo prévio por outro contextualmente conflitante). Em caso de não haver mais evocações, o traço mnemônico pode decair de intensidade com o tempo, caracterizando o esquecimento.

A grande vantagem funcional da reconsolidação é que ela nos dá a capacidade de atualização, de responder de forma flexível e adaptável aos ambientes de constante mudança (DUDAI, 2002; DUDAI; EISENBERG, 2004; LEE; NADER; SCHILLER, 2017). Estudos já mostraram que a reconsolidação traz a possibilidade tanto de atualização de conteúdo fortalecendo o mesmo, como também uma memória pode ser enfraquecida através da reconsolidação de acordo com a balanço excitatório / inibitório que essa informação causa nos sistemas relacionados à memória (ALBERINI; LEDOUX, 2013). Assim como a consolidação, trata-se de um processo que depende de alterações permanentes, porém com algumas diferenças moleculares e temporais. É um processo dependente de síntese proteica que ocorre numa janela de tempo de mais ou menos 3 horas (DUDAI; EISENBERG, 2004; KILEY; PARKS, 2022).

Algumas teorias sobre a reconsolidação tem sido proposta durante os vários anos desde quando começou a haver investigação sobre esse assunto. A primeira hipótese é que, uma vez consolidada a memória, quando ela é

reativada, apenas as partes “novas” daquele conteúdo é que passam pela reconsolidação, que são estabilizadas novamente.

A segunda hipótese é que quando essas memórias são reativadas, elas automaticamente precisam ser estabilizadas novamente sendo que algumas delas poderiam se perder durante o processo, permanente ou temporariamente, como se isso fosse um preço a ser pago pela atualização dessas memórias. E uma terceira hipótese, que é bastante aceita e muito semelhante a segunda, prediz que essas informações devem ser consolidadas novamente, porém propõe que toda a informação pode ser alterada caso se usasse algum inibidor de síntese proteica, por exemplo (DUDAI; EISENBERG, 2004; KILEY; PARKS, 2022; LEE; NADER; SCHILLER, 2017). Assim, compreendemos a necessidade de estudos para que se torne mais claro como realmente ocorre o processo de reconsolidação, vias de sinalização e neurotransmissores envolvidos neste processo.

1.4 Sistema adenosinérgico

Vários sistemas neurotransmissores participam dos processos relacionados à memória, em maior ou menor grau, sendo que um desses sistemas é o sistema adenosinérgico (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012; GARCIA-GIL *et al.*, 2021; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009).

A primeira evidência sobre o papel fisiológico da adenosina surgiu em 1927, quando foi determinado seu efeito no ritmo e na frequência cardíaca. Desde então vários trabalhos das mais diferentes áreas vêm sendo publicados descrevendo os mais variados efeitos fisiológicos da adenosina, e esclarecendo seu papel tanto na homeostase quanto em patologias (BOREA *et al.*, 2018; BURNSTOCK, 2007).

A quantidade de energia é um dos parâmetros fundamentais para definir o status do metabolismo primário das células, por isso é um dos primeiros parâmetros a ser reajustado por qualquer estímulo estressante em qualquer tipo de célula (CUNHA, 2005; WONG; ENGEL, 2023). A adenosina possui um grande papel no que se refere ao metabolismo energético, tendo uma função auxiliadora / protetora das células, principalmente em condições estressantes que requerem grande demanda de adenosina tri-fosfato (ATP), efeito esse explicado pela

mudança nas concentrações de adenosina quando se aumenta o gasto de ATP. Em condições fisiológicas, a concentração de adenosina permanece entre 20 e 300 nM, aumentando em condições fisiológicas extremas (BOREA *et al.*, 2018; CHEN, 2014-).

No sistema nervoso central (SNC), adenosina não atua como um neurotransmissor clássico, nem como um segundo mensageiro, mas atua como um modulador em condições fisiológicas, bem como participa da transmissão sináptica (CHEN, 2014-; GARCIA-GIL *et al.*, 2021; IJZERMAN *et al.*, 2022; SACHDEVA; GUPTA, 2013).

A principal fonte de formação de adenosina extracelular é a desfosforilação de seus precursores, ATP, ADP e AMP feita por uma cascata de ectoenzimas, as ecto-5-nucleotidases (NTDase), e a formação de adenosina intracelular se dá principalmente a partir da hidrólise de AMP e S-adenosilhomocisteína (SAH) através das enzimas endo-5-nucleotidase e SAH-hidrolase, respectivamente. Uma vez captada, a adenosina é transportada pelos transportadores de nucleosídeos (ENT) de acordo com a diferença de concentração do meio extracelular com o meio intracelular (**Figura 4**) (CUNHA, 2005; IJZERMAN *et al.*, 2022; LATINI; PEDATA, 2001; SACHDEVA; GUPTA, 2013).

Após captação intracelular, a adenosina sofre desaminação pela adenosina desaminase (ADA) levando a formação de inosina, ou fosforilação através da adenosina quinase (AK) dando origem ao AMP. Dessa forma a adenosina apresenta uma meia-vida fisiológica de 1 s. Quando analisada a constante de Michaelis-Mentem dessas enzimas (K_M ADA = 45 e AK = 2), vemos que a AK é o principal meio de transformação e eliminação da adenosina do meio fisiológico, sendo esses sistemas os principais responsáveis pela captação, inativação e remoção da adenosina (**Figura 4**) (BOREA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2021).

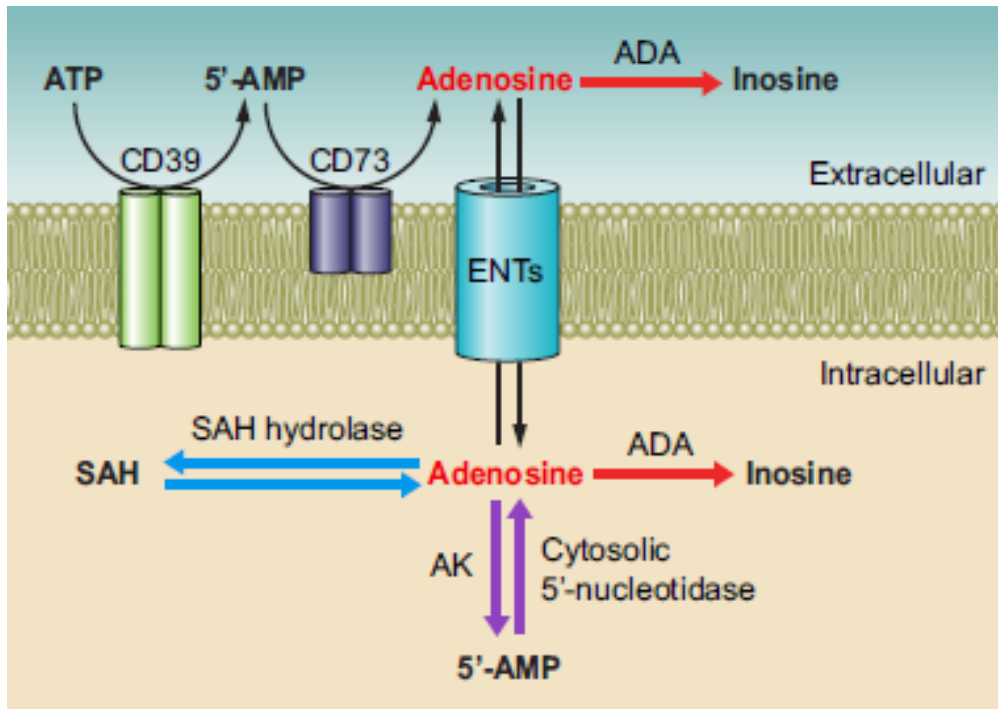


Figura 4: Formação e captação de adenosina. A formação extracelular de adenosina deriva da quebra dos seus precursores ATP, ADP e AMP por uma família de enzimas denominadas ectonucleotidases, na figura CD39 e CD73. Essa adenosina extracelular é convertida em inosina pela enzima adenosina desaminase. O transporte de adenosina do meio extracelular para o meio intracelular é feito de acordo com o gradiente de concentração por meio dos transportadores de nucleosídeos (ENTs). A formação intracelular de adenosina é via S-adenosil-homocisteína (SAH) através da enzima SAH-hidrolase e também a partir de 5'-AMP através de uma enzima endo-5-nucleotidase. Já o consumo dessa adenosina intracelular pode ser feito tanto pela adenosina quinase, que converte essa adenosina em 5'-AMP ou pela adenosina desaminase que a converte em inosina. Adaptado de: (BOREA *et al.*, 2018)

A adenosina exerce seus efeitos fisiológicos através da ligação a uma família de receptores denominados receptores adenosinérgicos, sendo eles: A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃, todos já clonados e farmacologicamente descritos. Todos eles dispõem de uma característica em comum: possuem um domínio central que atravessa a membrana plasmática sete vezes, no qual cada hélice tem de 20 a 27 aminoácidos e está ligada por três domínios intracelulares e três alças extracelulares (BOREA *et al.*, 2018; IJZERMAN *et al.*, 2022; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Esses receptores transmembrana são acoplados a uma proteína G, sendo A₁ e A₃ acoplados à uma proteína G inibitória e A_{2a} e A_{2b} à uma proteína G excitatória, dessa forma quando ativados os mesmos apresentam cascatas de sinalização distintas tendo como segundo mensageiros o AMPc (adenosina 3',5' monofosfato cíclico) ou a PLC (fosfolipase C)(Tabela 1)(CONSTANTINO *et al.*,

2021; MERIGHI *et al.*, 2021; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009; SINGH *et al.*, 2022; WONG; ENGEL, 2023).

Tabela 1: Classificação e mecanismo de ação dos receptores de adenosina

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Mecanismos de transdução	Afinidade com a adenosina
A₁	CCPA, R-PIA, CPA, IBMECA, NECA	PSB36, KW-3902, DPCPX, caffeine, theophylline	G _i → ↓ cAMP	1-10 nM
A_{2a}	CGS21680, UK-432,097, HE-NECA, NECA, R-PIA, PSB0777	SCH442416, ZM241385, SCH58261, DPCPX, caffeine, theophylline	G _s → ↑ cAMP	30 nM
A_{2b}	NECA, BAY60–6583, R-PIA, IB-MECA	PSB-603, ZM241385, MRS 1754, DPCPX, caffeine, theophylline	G _s /G _q → ↑ cAMP	1000 nM
A₃	CI_IB-MECA, IB-MECA, MRS5698, NECA, R-PIA, HEMADO, CGS21680	MRE3008F20, MRS 3777, MRS1523, DPCPX, ZM241385, caffeine, theophylline	G _i /G _q → ↓ cAMP	100 nM

Esses receptores estão amplamente distribuídos por todo o organismo, incluindo o SNC (**Figura 5**), explicando dessa forma os efeitos significativos causados nos mais diversos sistemas fisiológicos.

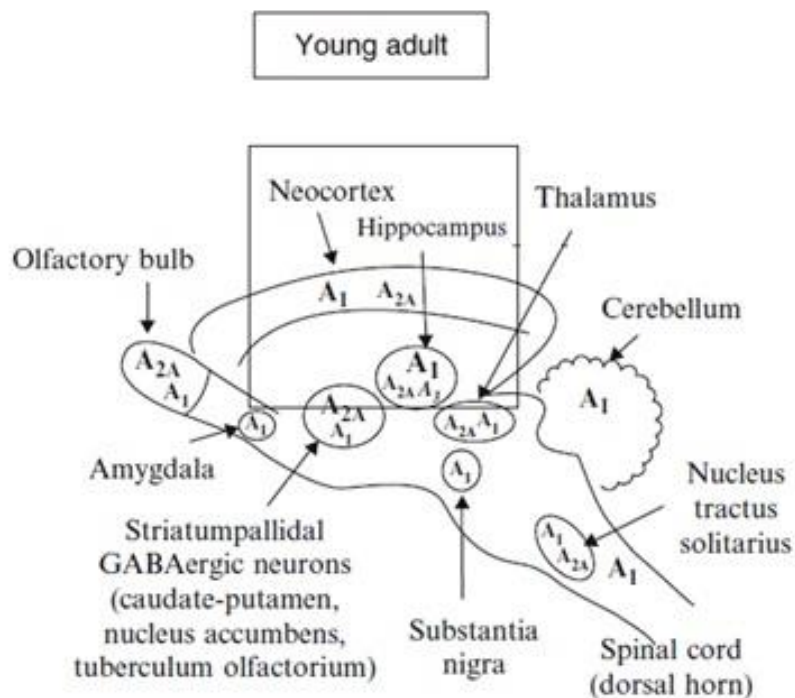


Figura 5: Distribuição dos receptores adenosinérgicos no Sistema Nervoso Central. **Olfactory bulb:** bulbo olfatório. **Amygdala:** amígdala **Striatumpallidal:** núcleo estriado. **Substantia nigra:** substância negra. **Nucleus tractus solitarius:** núcleo do trato solitário. **Cerebellum:** Cerebelo. **Thalamus:** Tálamo. **Hippocampus:** Hipocampo Adaptado de: (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009)

Durante a pesquisa de mestrado tivemos como principal objetivo estabelecer qual era o efeito da adenosina na reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota, e quais receptores eram responsáveis por tal efeito caso houvesse. Verificamos que a adenosina bloqueou a reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota e que ela exerce seu efeito majoritariamente via receptor A_3 , com algum efeito via receptor A_1 . Dessa forma, na presente pesquisa pudemos direcionar nossos estudos nesses receptores.

1.4.1 Receptor Adenosinérgico A_1

Trata-se do receptor mais abundante e altamente expresso no SNC, estando presente no neocórtex, cerebelo, hipocampo e corno dorsal da medula espinhal (Figura 5). A adenosina é o principal agonista dessa classe, mediando seus efeitos através da ligação ao receptor e consequente inibição da enzima

adenilato ciclase, podendo também levar à ativação da fosfolipase C, aumentando assim os níveis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e Ca²⁺ intracelular, que estimulam as proteínas cinases dependentes de cálcio (PKC) e outras proteínas de ligação ao cálcio. (BOREA *et al.*, 2018; HARVEY *et al.*, 2012; IJZERMAN *et al.*, 2022; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009; WONG; ENGEL, 2023)

Quando falamos em aplicação clínica, a ativação do receptor A₁ diminui a transmissão excitatória através da inibição do canal de cálcio do tipo N e da hiperpolarização neuronal pela regulação da corrente de K⁺. Isso causa uma redução na liberação de glutamato e inibição dos efeitos do receptor NMDA. Esse efeito é benéfico em algumas patologias envolvendo o SNC incluindo epilepsia, dor e isquemia. Nessa proposta, a adenosina é reconhecida como uma molécula anticonvulsivante endógena, capaz de reduzir a frequência de potenciais de ação induzidos por estimulação elétrica através do registro desses superexpressos (HARGUS *et al.*, 2012).

1.4.2 Receptor Adenosinérgico A₃

O receptor A₃ é expresso em uma grande variedade de células e tecidos e em níveis mais baixos no cérebro, estando presente em: células do tálamo, hipotálamo, hipocampo, córtex e gânglio da retina (Figura 5), bem como nos terminais dos nervos motores. Sendo também expressos em micróglia e astrócitos (BOREA *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2022).

Esses receptores também exercem um efeito inibitório por uma variedade de vias de sinalização intracelular acoplando-se preferencialmente às proteínas G_i, pelas quais eles reduzem os níveis de cAMP, podendo se ligar também as proteínas G_q (BOREA *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2022).

Na clínica, embora não sejam tão abundantes, esses receptores são influentes em várias doenças neuronais. Na isquemia cerebral, por exemplo, desempenham um papel protetor inicial em sinergia com os receptores A₁, inibindo a transmissão sináptica excitatória (BOREA *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2022; WONG; ENGEL, 2023).

I.5 Objetivos

II.5.1 Objetivo Geral

Analisar, especificamente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, o efeito da adenosina sobre a reconsolidação remota da memória espacial de longa duração recente e remota, assim como os mecanismos intracelulares de transdução de sinal dos receptores adenosinérgicos A₁ e A₃ que subjazem seus efeitos bloqueadores sobre a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota, adquirida na tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM).

II.5.2 Objetivos específicos

II.5.2.1. Reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota.

II.5.2.1.1. Investigar o efeito de adenosina, infundida na dose de 10 nmol bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após uma sessão de teste não reforçada, realizada 5 d após a sessão de treino em LAM, sobre a reconsolidação desta memória 24 h e 5 d após a primeira sessão de teste.

II.5.2.1.2. Investigar o efeito dos agonistas adenosinérgicos A₁ (CPA Tocris 1702) e A₃ (HEMADO Tocris 1579), infundidos na dose de 10 nmol bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após uma sessão de teste não reforçada, realizada 5 d após a sessão de treino em LAM, sobre a reconsolidação desta memória 24 h e 5 d após a primeira sessão de teste.

II.5.2.1.3. Investigar o efeito dos antagonistas adenosinérgicos A₁ (DPCPX Tocris 439) e A₃ (MRS 3777 Tocris 2403), infundidos na dose de 50 nmol bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após uma sessão de teste não reforçada, realizada 5 d após a sessão de treino em LAM, sobre a reconsolidação desta memória 24 h e 5 d após a primeira sessão de teste.

II.5.2.2. Investigação das vias intracelulares subjacentes aos efeitos dos receptores A1 e A3 sobre a reconsolidação recente e remota de memória espacial de longa duração recente e remota.

II.5.2.2.1. Investigar o efeito da administração de um inibidor do proteossomo (lactacistina), infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após uma sessão de teste não reforçada, realizada 24 h e 5 d após a sessão de treino em LAM, sobre a reconsolidação desta memória 24 h e 5 d após a primeira sessão de teste.

II.5.2.2.2. Investigar o efeito da administração de lactacistina + adenosina, infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após uma sessão de teste não reforçada, realizada 1 d e 5 d após a sessão de treino em LAM, sobre a reconsolidação desta memória 24 h e 5 d após a primeira sessão de teste.

II.5.2.2.3. Investigar o efeito de diferentes doses de um inibidor da síntese local de proteínas (rapamicina), infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a primeira sessão de teste não reforçada, realizada 24 h após a última sessão de treino sobre a reconsolidação dessa memória 24h e 5 d após a primeira sessão de teste.

II.5.2.2.4. Investigar o efeito da confusão de rapamicina 1µg/ml e adenosina 10 nmol, infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a primeira sessão de teste não reforçada, realizada 24 h após a última sessão de treino sobre a reconsolidação dessa memória 24h e 5 d após a primeira sessão de teste.

II.5.2.2.5. Investigar o efeito da infusão de rapamicina 5 µg/ml + adenosina 10 nmol, infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a primeira sessão de teste não reforçada, realizada 24 h após a última sessão de treino sobre a reconsolidação dessa memória 24h e 5 d após a primeira sessão de teste.

I.6 Hipótese

Anteriormente, dados produzidos por nosso grupo demonstraram que a adenosina, uma vez infundida diretamente na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, prejudicou de maneira dose-dependente e tempo-dependente a

reconsolidação recente da memória espacial de longa duração recente e remota relativa à tarefa do LAM, um efeito que foi parcialmente mimetizado pela ativação específica de receptores A_3 .

Estabelecemos também que a adenosina endógena pode participar fisiologicamente da modulação da estabilidade da memória espacial ao longo do tempo de retenção, visto que o bloqueio específico dos receptores A_3 imediatamente após a sessão de teste realizada 24 horas após a última sessão de treino aumentou a retenção dessa memória espacial de longa duração em relação ao grupo veículo, sugerindo que diferentes memórias podem ter sua persistência ao longo do tempo modulada pelos níveis endógenos de adenosina durante os momentos em que essas memórias são evocadas. Esse resultado ressalta o importante papel da regulação do metabolismo energético neuronal em processos mnemônicos, em que a concentração extracelular de adenosina é uma variável chave (BOREA *et al.*, 2018; CAMICI; GARCIA-GIL; TOZZI, 2018; GARCIA-GIL *et al.*, 2021).

Dessa forma, num primeiro momento, esclarecemos que a adenosina exerce seus efeitos sob a reconsolidação recente de memória de longa duração remota via receptor A_3 , possivelmente pela via de transdução de sinal relacionada a esse receptor, onde o mesmo é acoplado a uma proteína G inibitória (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998), resultando na diminuição na taxa de síntese de novas proteínas e um subsequente prejuízo na retenção da memória de longa duração. (IZQUIERDO *et al.*, 1998, 2006; ROESLER, 2017)

Mesmo realizando uma grande varredura dessa família de receptores, algumas respostas não puderam ser obtidas em nosso trabalho anterior.

Primeiramente, tivemos o efeito da adenosina mimetizado pelos seus agonistas apenas na reconsolidação recente de memória de longa duração remota, sendo que a própria adenosina apresentou efeito em ambas as memórias (recente e remota). Dessa forma não conseguimos responder completamente por quais receptores a adenosina estaria agindo, ou até mesmo se haveria uma possível ação conjunta desses receptores. Juntamente com essa conclusão, ficou ainda mais evidente a diferença de nível molecular dessas duas memórias, como já foi demonstrado anteriormente em outros trabalhos (DA SILVA WEBER CLÁUDIO , GABRIELA CARDOSO, JULIANA SARTORI BONINI, FERNANDO BENETTI, 2013).

À vista disso, temos como hipótese do nosso trabalho:

- Que o efeito da adenosina se dá majoritariamente via receptores A_3 quando testada a reconsolidação remota, ao invés da recente, de memória de longa duração remota, mesmo que essas memórias apresentem não somente diferenças comportamentais, mas também bioquímicas.
- Que a adenosina desencadeia seu efeito amnésico, por uma diminuição da síntese proteica ou um aumento da taxa de degradação proteica, ou até mesmo uma associação desses dois fatores.
- E por fim, que as proteínas que são essenciais para plasticidade pós LTP (ABRAHAM; WILLIAMS, 2008; ROESLER, 2017) terão a sua taxa de renovação alterada devido à ação da adenosina.

II METODOLOGIA

II.1 Amostra

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 225 e 350 gramas, com aproximadamente 90 dias de idade, provenientes dos biotérios das Universidades Estaduais de Maringá (UEM) e Ponta Grossa (UEPG).

De acordo com a literatura, o número de animais utilizados neste tipo de tarefa é de 6 a 18 animais por grupo (CALLAN; HANNIGAN; BOWEN, 2017; WANG *et al.*, 2017-), considerando-se o desvio padrão dos parâmetros medidos relacionados ao LAM, para que assim seja possível a detecção de diferença estatística. Para os testes comportamentais, os grupos não devem ser inferiores a 12 animais, pois mesmo que não haja grande variabilidade no comportamento em geral, será um tamanho de amostra adequado para que o desempenho dos animais seja detectado de forma fidedigna, assim como diferenças estatísticas biologicamente relevantes (VORHEES; WILLIAMS, 2015). No caso desse trabalho, assim como outras pesquisas que já realizamos, utilizamos o n de 6 a 16 animais, que seria o número mínimo de animais recomendado pelo trabalho de Vorhees e Williams, 2015, tal como outros trabalhos já publicados, que utilizaram esse mesmo número de animais. (ANDERSON *et al.*, 2019; SARLAK *et al.*, 2019)

Após a chegada dos animais dos respectivos biotérios, os mesmos foram separados em grupos de 5 animais, organizados e mantidos em caixas apropriadas, forradas com maravalha esterilizada (**Figura 6**).



Figura 6: Organização dos animais. Após a chegada, os ratos foram separados em caixas com etiquetas de acordo com o grupo, em quantidade de 5 animais por caixa, sendo essas forradas com maravalha esterilizada. Receberam água e comida a vontade em um ambiente climatizado entre 23 a 25 graus celsius. Fonte: Foto da própria autora.

Receberam água e comida *ad libitum*, foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 h e escuro a partir das 19:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de $23 \pm 2^\circ \text{C}$. As caixas foram trocadas a cada 2 dias, sendo adotado o máximo de precaução com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas do CEUA/UNICENTRO sob parecer de número 018/2019 (parecer vide anexos) e dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996)

Os animais foram divididos nos seguintes grupos, de acordo com a(s) droga(s) que receberam: NAIVE, salina, controle não espacial, adenosina, agonista A_3 , agonista A_1 , adenosina + Antagonista A_3 , adenosina + Antagonista A_1 , antagonista A_1 , antagonista A_3 , lactacistina, lactacistina + adenosina (protocolo de reconsolidação recente), lactacistina + adenosina remoto (protocolo de reconsolidação remoto), curva dose da rapamicina, rapamicina $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ + Antagonista A_3 , e por fim grupo rapamicina $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ + Antagonista A_3 .

1.2 Cirurgia estereotáxica

Para administração dos fármacos na região específica de estudo (CA1), os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia as quais possuem 0,2 mm de diâmetro e 9,0 mm de comprimento. Essas cânulas são posicionadas 1,0 mm acima da nossa região alvo, neste caso a camada piramidal da região CA1 do hipocampo dorsal. As coordenadas utilizadas para a cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas anômico de Paxinos e Watson (PAXINOS GEORGE, 1980), sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = \pm 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 2,0 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0° (**Figura 7**).



Figura 7: Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia para a administração dos fármacos diretamente na região de interesse, nesse caso a área CA1 do hipocampo dorsal, foi necessária a realização da cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia que seriam necessárias para os próximos passos do experimento. A primeira ação cirúrgica é a exposição do crânio do animal para que se obtenha a confirmação visual do local do bregma, que serve como direção para as coordenadas de implantação. Após, ocorre o posicionamento dos parafusos que servem como suporte e sustentação para o capacete de acrílico. Neste caso

utilizamos dois parafusos, um anterior ao bregma e um posterior ao lambda, para diminuir a probabilidade de queda destes capacetes, uma vez que os animais permaneceram com os mesmos durante aproximadamente 15 dias. Feito isso, as cânulas são implantadas e o capacete é construído com acrílico autopolimerizável. Fonte: Foto da própria autora.

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com 100 mg/kg de cetamina, mais 5 a 10 mg/kg de xilazina, intra-peritonal (NEVES *et al.*, 2013). As cânulas-guia descritas acima foram fixadas com acrílico autopolimerizante junto ao osso parietal do crânio dos ratos. As cânulas utilizadas para a infusão dos fármacos possuem 0,05 mm de diâmetro e 10,0 mm de comprimento, de modo que sua extremidade se dirige para 1,0 mm além das cânulas-guia, quando introduzidas no interior destas, permitindo a infusão do fármaco exatamente na região desejada, com o mínimo possível de danos mecânicos.

II.3 Tarefa comportamental do Labirinto Aquático de Morris

Para a realização da tarefa comportamental do labirinto aquático de Morris, utilizamos um tanque circular escuro de 180 centímetros de diâmetro e 55 centímetros de altura, cheio de água mantida entre 21 e 24 graus celsius. Esse tanque, foi virtualmente dividido em quatro quadrantes, sendo que em um desses quadrantes se encontrava uma plataforma de escape de 12 cm de diâmetro, submersa a 2 centímetros do nível da água.

Na versão espacial da tarefa, dicas na forma de luminárias e cartazes foram fixadas no ambiente de forma assimétrica, para que servissem de pistas para a formação do mapa espacial desses animais.

II.3.1 Treinamento

Nos dias de treino foram realizadas oito largadas pseudoaleatórias, duas em cada quadrante do labirinto, e a cada largada foi dado o tempo de 60 segundos para que o animal encontrasse a plataforma de escape que foi mantida no local durante todos os dias de treino. Caso ele não a encontrasse, foi gentilmente guiado até a mesma e ali permaneceu por 30 segundos. Após esse tempo, o animal foi retirado e feita nova largada, até totalizarem as oito largadas necessárias para o treino diário.

Uma vez realizado o total de largadas, o animal foi seco e devolvido à sua caixa moradia.

Esse treino foi realizado da mesma forma durante 5 dias consecutivos.

II.3.2 Teste – Reconsolidação recente de memória espacial de longa duração

Quando estamos trabalhando com a reconsolidação recente da memória espacial, um teste é feito no sexto dia, que se faz da seguinte maneira: a plataforma de escape é retirada do tanque e o animal é largado do quadrante mais distante do local onde estava a plataforma durante os dias de treino (quadrante oposto) e contabiliza-se o tempo em que ele leva para chegar ao local exato onde estava a plataforma nos dias de treinamento (tempo de latência), o tempo em que ele permanece procurando a plataforma (tempo de permanência) e também o número de vezes que ele cruza o local onde estava essa plataforma (número de cruzamentos ou crossings).

Outros dois testes são feitos, exatamente da mesma forma. O primeiro, 48 horas (memória de longa duração recente) após o último dia de treino e o segundo 5 dias após o último dia de treino (memória de longa duração remota).

II.3.2.1 Desenho experimental

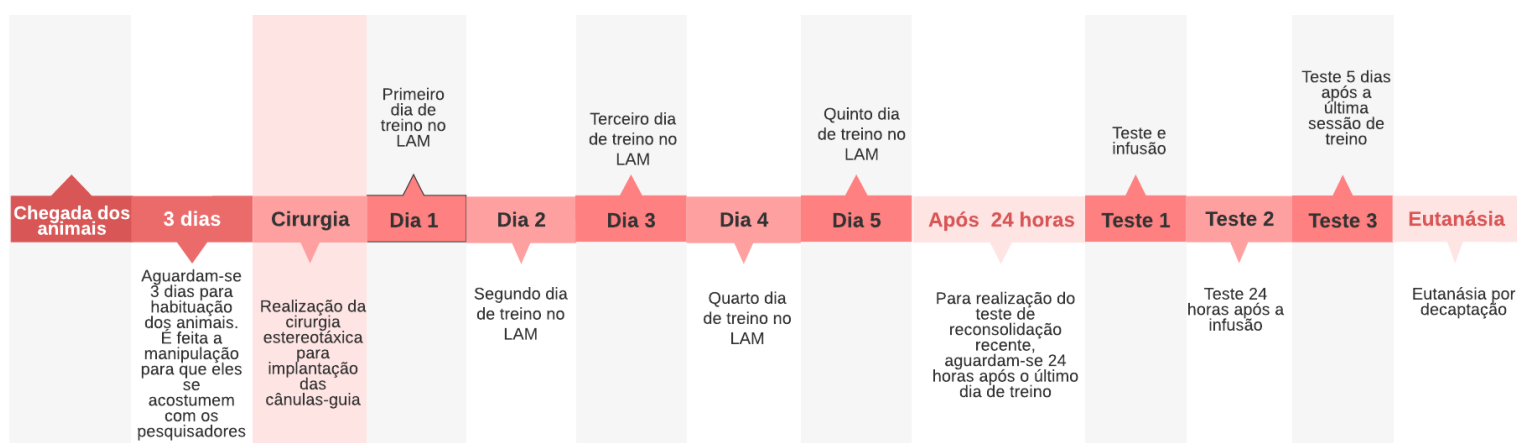


Figura 8: Desenho experimental para reconsolidação recente de memória espacial de longa duração

II.3.3 Teste - Reconsolidação remota de memória espacial de longa duração

Quando testamos a reconsolidação remota, esse teste é feito da mesma forma, porém aguardam-se 5 dias após o último dia de treino para que então se realize o primeiro teste. Os outros dois testes para memória de longa duração recente e remota procedem da mesma forma como descrito no item anterior.

II.3.3.1 Desenho experimental

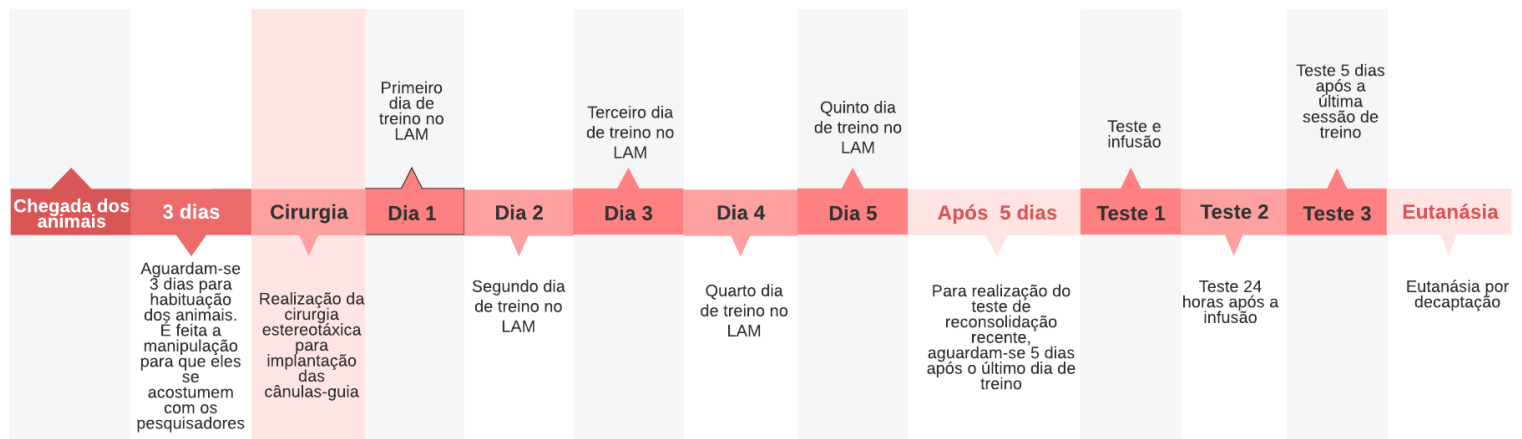


Figura 9: Desenho experimental para reconsolidação remota de memória espacial de longa duração

II.4 Tratamento farmacológico

Imediatamente após o teste de 24 horas no LAM, os animais receberam infusões bilaterais de 1,0 μ l de solução salina (grupo controle) ou de fármacos dissolvidos, através de suas cânulas guias diretamente em regiões cerebrais pré-definidas. Para tanto foi utilizada uma cânula de infusão (0,05 mm de diâmetro e 10,0 mm de comprimento), conectada a uma micro-seringa Hamilton por um tubo de polietileno (**Figura 10**).

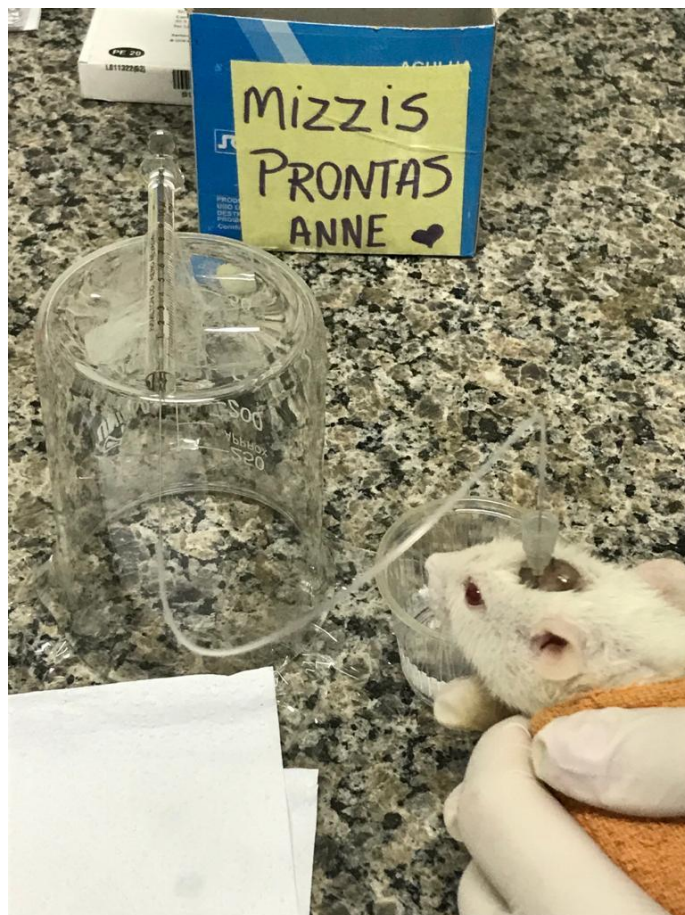


Figura 10: Aparato de infusão. O aparato é composto por uma seringa Hamilton, um tubo de polietileno e uma cânula de infusão. Após a realização do teste, a seringa Hamilton foi carregada, o animal imobilizado e então feita a infusão lentamente. Fonte: Foto da própria autora.

O aparato é carregado antes da infusão com o material a ser infundido no grupo, posteriormente é feita a imobilização do animal de acordo com o Manual de cuidados e procedimentos com animais (NEVES *et al.*, 2013, cap. 6), uma vez que não é utilizado nenhum tipo de sedação para o procedimento. Então cuidadosamente é feita a introdução da cânula de infusão na luz da cânula-guia e inicia-se a infusão lentamente, durante 30 segundos em um lado e depois no outro. Ao término de cada infusão, a cânula é deixada no local por 30 segundos adicionais para evitar refluxo (**Figura 11**).



Figura 11: Infusão. Após a infusão lenta de salina no caso do grupo controle ou das drogas de interesse de acordo com o grupo do animal, a cânula é deixada na luz da cânula guia por um tempo de 30 segundos, para evitar refluxo da droga. Fonte: Foto da própria autora.

II.4.1 Fármacos utilizados

Nesse estudo, foram utilizadas 7 drogas diferentes nas infusões intra-CA1 do hipocampo dos animais, todos obtidas da Tocris Bioscience. As concentrações utilizadas em cada infusão estão descritas na sessão resultados. **(Tabela 2).**

Tabela 2: Descrição das drogas que foram utilizadas assim como os receptores alvo de cada uma, que foram administrados intra-CA1 ao longo do experimento.

Nome	Receptor alvo	Solubilidade
Adenosina	Não se aplica	DMSO
HEMADO	Agonista A ₃	Etanol ou DMSO
DPCPX	Agonista A ₁	Etanol ou DMSO

MRS 3777	Antagonista A ₃	DMSO
DPCPX	Antagonista A ₁	Etanol ou DMSO
Lactacistina	Inibidor do proteossomo	H ₂ O
Rapamicina	Inibidor da síntese de proteínas local	DMSO

II.5 Controle histológico da localização das cânulas-guia e local de infusão

A verificação anatômica do posicionamento das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada post-mortem (morte por decaptação). Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam 1,0 µl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas como descrito acima. Quinze minutos depois disto serão sacrificados (guilhotina após anestesia com 100 mg/kg de cetamina mais 5 a 10 mg/kg de xilazina, intra-peritonial (NEVES *et al.*, 2013, cap. 6) e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 a 7 dias. Após isto procedeu-se com a análise histológica. Somente animais onde a localização da mancha de azul de metileno encontrou-se dentro de um raio de 2 mm do local desejado foram considerados na análise estatística dos dados.

II.6 Controle Reforço

Para assegurar que os efeitos observados se devem de fato a reativação não-reforçada do traço mnemônico, na primeira sessão de teste, que precede as infusões, houve a presença da plataforma (reforço). Após o rato ter encontrado a plataforma, ele permaneceu nela por 30 segundos

II.7 Controle Infusão

Para assegurar que os efeitos observados se devem à infusão dos fármacos apenas quando ocorrem imediatamente após a sessão de reativação não-

reforçada, e não à infusão dos fármacos per se, não houve a primeira sessão de teste no dia respectivo, mas apenas a infusão dos fármacos.

II.8 Controle temporal

Para assegurar que os efeitos observados após a infusão dos fármacos imediatamente após a primeira sessão de reativação são tempo específicos, a infusão dos fármacos foi realizada 3 horas (em vez de imediatamente) após a primeira sessão de reativação sem reforço.

II.9 Controle estrutura

Para assegurar que os efeitos observados após a infusão dos fármacos imediatamente após a primeira sessão de reativação sem reforço são estrutura específicos, a infusão dos fármacos foi feita 1 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, atingindo assim outra estrutura, o córtex occipital médio-lateral.

II.10 Análise estatística de dados

Os dados foram verificados quanto ao seu perfil de distribuição normal através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados comportamentais são apresentados como média \pm erro padrão da media (SEM). ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi usada para determinar os efeitos dos dias de treinamento, dos tratamentos e da interação desses efeitos no aprendizado durante os 5 dias no LAM. Quando um efeito principal foi observado, seja entre dias ou entre os tratamentos, as comparações foram feitas através de ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Dunnett quando conveniente. Ainda, a percentagem média de tempo gasto por cada grupo experimental no quadrante alvo na tarefa do LAM foi comparada à média teórica de 25% através do teste t simples, para determinar se houve retenção de memória de longo prazo em cada grupo.

III RESULTADOS

3.1. Efeito da adenosina e da ativação individual dos receptores adenosinérgicos sobre a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota.

No experimento realizado durante a pesquisa de mestrado, observamos que na reconsolidação recente de memória espacial de longa duração, a adenosina na dose de 10 nmol/lado diminuiu o percentual de tempo de nado gasto no quadrante-alvo em sessões de teste sem reforço realizadas 24 horas e 5 dias após a primeira sessão de teste sem reforço, esta por sua vez realizada 24 horas após a última sessão de treino. Dessa forma, no presente experimento visamos investigar se ela exerceria os mesmos efeitos quando essa reconsolidação fosse remota ao invés de recente.

Para analisar o efeito da administração intra-hipocampal da adenosina na reconsolidação remota de uma memória espacial, ratos Wistar foram treinados no LAM, como já descrito, e então receberam infusões bilaterais intra-CA1 de veículo (salina) ou adenosina imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 5 dias após a última sessão de treino e o que observamos é que os animais que receberam adenosina tiveram o desempenho prejudicado no segundo teste realizado 24 horas após a infusão (**Figura 12**) quando comparados ao grupo que recebeu somente salina. Porém no terceiro teste, realizado 5 dias após a primeira sessão de teste, não houve diferença significativa entre os animais que receberam salina e os que receberam adenosina, resultado esse diferente do encontrado quando a reconsolidação foi recente (**Figura 12**).

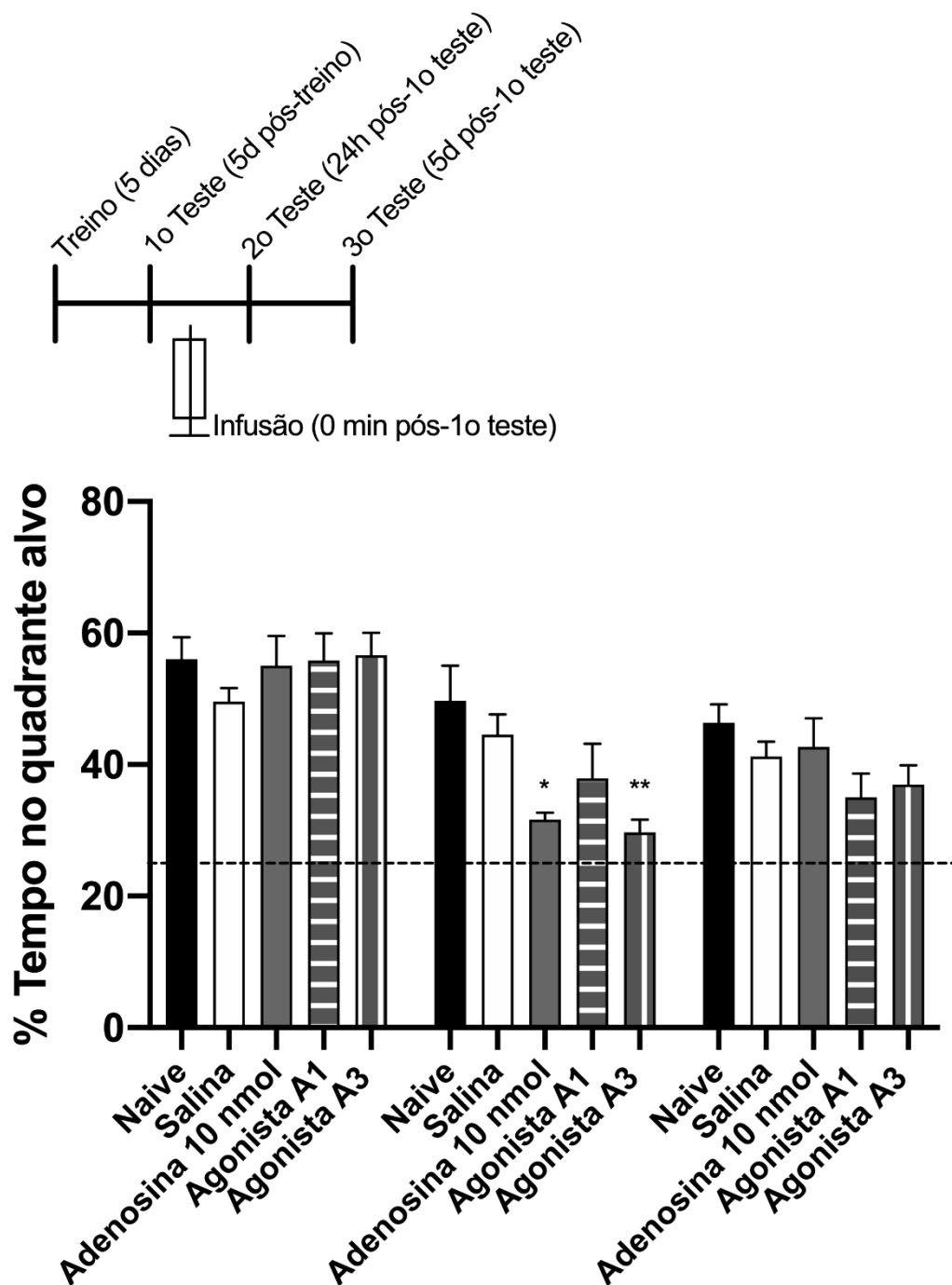


Figura 12: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina e do agonista adenosinérgico A3 imediatamente pós-teste sem reforço afetou a reconsolidação remota de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas após. O mesmo efeito não foi produzido quando essa memória remota foi de longa duração remota, testada 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 μ l) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de CPA 10 nmol/lado (Agonista A₁, barra hachurada horizontal) ou HEMADO 10 nmol/lado (Agonista A₃, barra

*hachurada vertical) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. O grupo Adenosina e Agonista A₃, no teste 24 horas pós-teste são os grupos que apresentaram desempenho prejudicado em relação ao percentual de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Salina, em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: $F(4, 34) = 0,8639$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 34) = 5,478$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 34) = 1,641$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n = 6 - 11$ por grupo).*

Em nosso primeiro trabalho (reconsolidação recente), investigamos a ativação específica dos receptores adenosinérgicos para constatar se causariam o mesmo efeito que adenosina e para determinar por qual ou quais receptores a adenosina exercia seus efeitos. Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre grupos na segunda sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de reativação sem reforço, que por sua vez foi realizada 24 horas após a última sessão de treino, quanto a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo. Mas, na terceira sessão de teste realizada 5 dias após a sessão de reativação sem reforço, verificamos que o grupo que recebeu a infusão do agonista A₃ (HEMADO) desempenhou uma porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo significativamente menor do que o grupo veículo. A partir desse resultado, juntamente com a reversão do efeito amnésico da adenosina pelos antagonistas adenosinérgico A₁ (DPCPX) e A₃ (MRS 3777) concluímos então que a adenosina exercia seus efeitos sobre a reconsolidação recente de memória de longa duração recente via receptores A₁ e A₃ e sobre a memória de longa duração remota via receptores A₃.

Assim, dando continuidade ao experimento anterior, neste experimento utilizamos a mesma dose de adenosina e investigamos se ativação individual dos receptores A₁ e A₃ resultaria nos mesmos efeitos encontrados quando essa reconsolidação foi recente. Para tanto, realizamos a infusão intra-CA1 imediatamente após sessão de teste sem reforço, agora realizada 5 dias após a última sessão de treino, de adenosina 10 nmol/lado, de agonista adenosinérgico A₁ (CPA) na concentração de 10 nmol/lado e agonista adenosinérgico A₃ (HEMADO) na concentração de 10 nmol/lado.

Neste experimento foram observadas diferenças significativas entre o grupo que recebeu agonista A₃ (HEMADO) em relação ao grupo controle, onde na segunda sessão de teste realizada 24 após a infusão houve um prejuízo no

desempenho quanto a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo (**Figura 12**). Porém, na terceira sessão de teste, realizada 5 dias após a sessão de reativação sem reforço, verificamos não houve diferenças significativas entre grupos.

Dessa forma, quanto ao principal parâmetro mensurador de evocação de memória para a tarefa do LAM (D'HOOGE; DEYN, 2001; MORRIS, 1984), a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo, o único agonista que reproduziu o efeito amnésico da adenosina sobre a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração foi o agonista específico para o receptor A₃, conforme verificado no segundo teste realizado 24 horas após a primeira sessão de reativação sem reforço.

3.2. Reversão receptor-específica do efeito amnésico da adenosina sobre a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota.

Em nosso próximo objetivo investigamos se a administração dos antagonistas adenosinérgicos A₁ e A₃ era capaz de reverter o efeito amnésico causado pela adenosina. Para isto, realizamos a co-infusão bilateral intra-CA1 de adenosina (10 nmol/lado) mais um dos antagonistas dos receptores A₁ e A₃ (50 nmol/lado, dose utilizada para assegurar a inibição frente a adenosina) (ALMEIDA *et al.*, 2003) imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 5 dias após a última sessão de treino. (**Figura 13**).

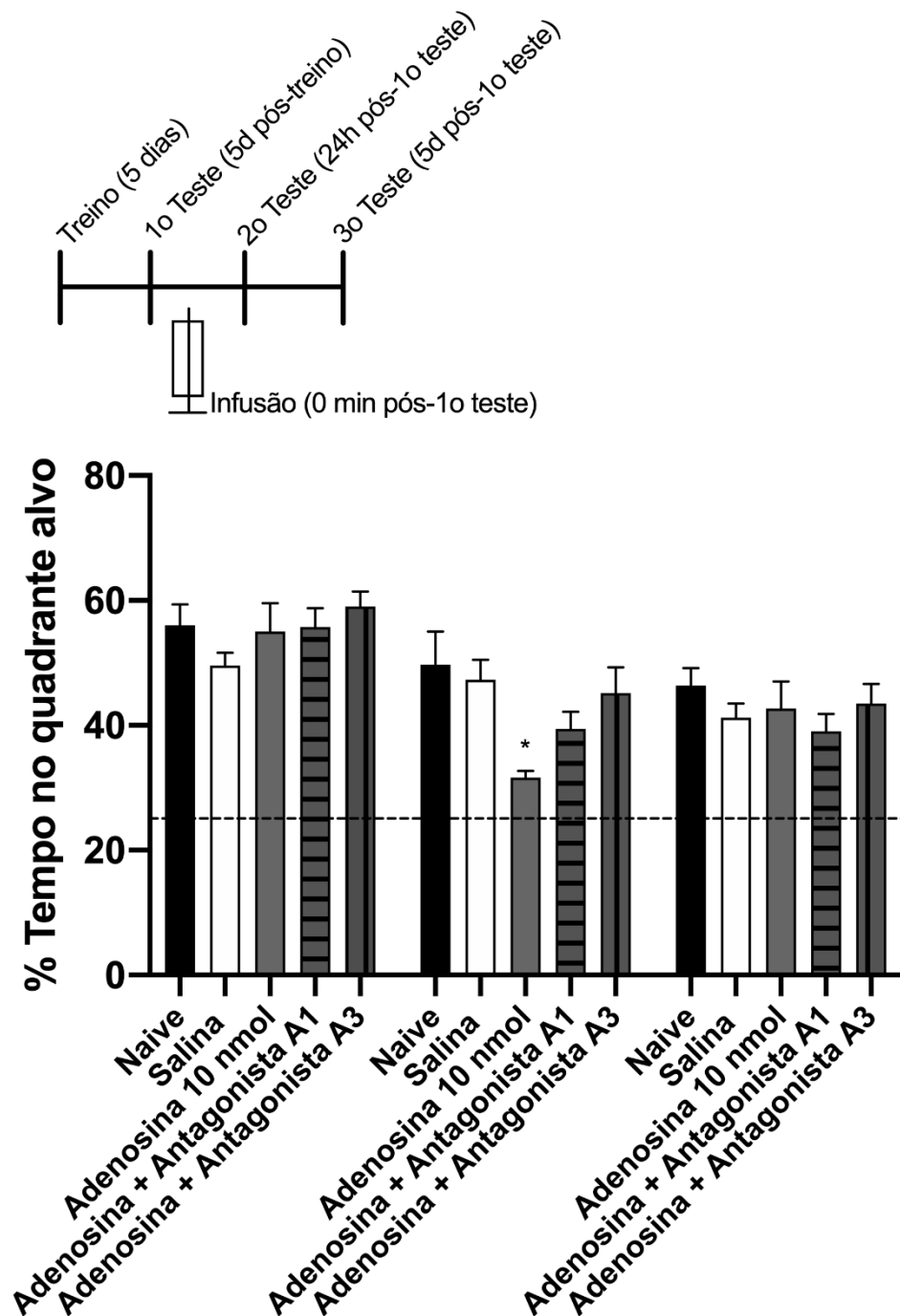


Figura 13: O efeito amnésico induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é parcialmente revertido por co-infusão com antagonista A1 e com antagonista A3. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 μ l) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Adenosina 10 nmol + DPCPX 50 nmol/lado (Antagonista A₁, barra hachurada horizontal) ou Adenosina 10 nmol + MRS3777 50 nmol/lado (Antagonista A₃, barra hachurada vertical) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da

memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$ vs. Salina, em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: $F(4, 42) = 1,164$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 42) = 3,122$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 42) = 0,6615$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n = 10-18$ por grupo).

O antagonista A₁ (DPCPX) e o antagonista A₃ (MRS 3777) foram capazes de reverter o efeito amnésico da adenosina conforme verificado no segundo teste 24 horas pós-teste, em que os animais que receberam adenosina co-infundida com esses antagonistas tiveram um bom desempenho no que diz respeito ao tempo de nado gasto no quadrante-alvo quando comparados ao grupo salina **(Figura 13)**.

No terceiro teste realizado 5 dias após a primeira sessão de teste, os resultados encontrados evidenciam desempenho dos ratos neste parâmetro não distinguível do desempenho do grupo veículo **(Figura 13)**.

3.3 Participação da adenosina endógena na reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota

Para constatar se os receptores adenosinérgicos A₁ e A₃ participam constitutivamente do processo de reconsolidação remota de memória de longa duração, realizamos a infusão bilateral intra-CA1 dos antagonistas dos receptores A₁ (DPCPX) e A₃ (MRS 3777), na dose de 50 nmol/lado, imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 5 dias após a última sessão de treino.

Não foram observadas diferenças significativas entre grupos na segunda sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de reativação sem reforço quanto a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo e na terceira sessão de teste realizada 5 dias após a sessão de reativação sem reforço **(Figura 14)**.

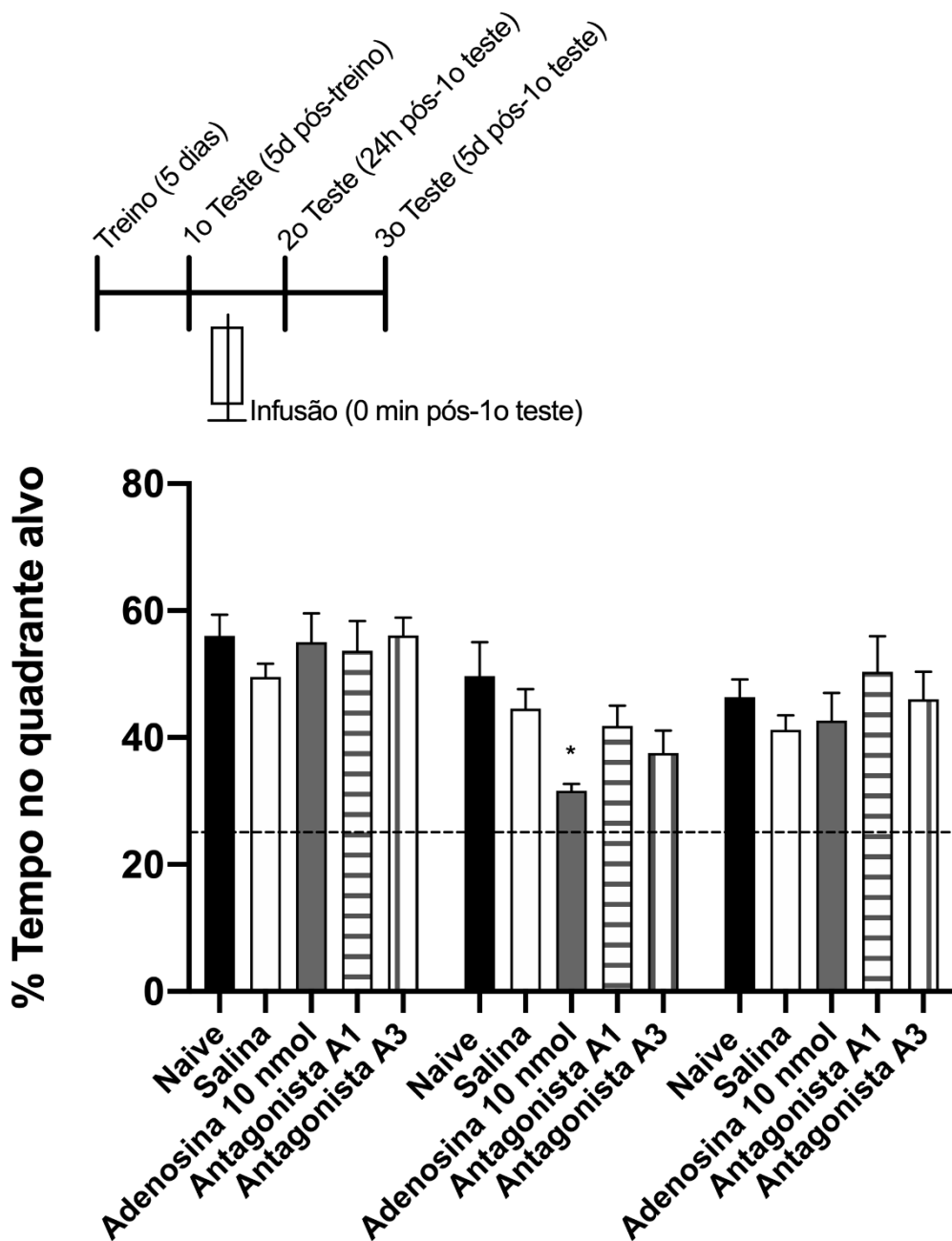


Figura 14: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de antagonistas A1e A3 imediatamente pós-teste sem reforço não afeta a reconsolidação remota de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Adenosina DPCPX 50 nmol/lado (Antagonista A₁, barra hachurada horizontal) ou MRS 3777 50 nmol/lado (Antagonista A₃, barra hachurada vertical) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo* $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnett após

ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: $F(4, 37) = 0,6432$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 37) = 3,201$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 37) = 0,6534$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n= 10- 12$ por grupo).

3.4 Relação do efeito amnésico causado pela adenosina no processo de reconsolidação da memória espacial de longa duração e inibição da degradação proteica.

Nosso próximo passo visou investigar as vias responsáveis pelo efeito amnésico causado pela adenosina e se esse efeito é causado por um aumento da síntese proteica local, diminuição da degradação proteica ou ambos, primeiramente pela administração da lactacistina que é um inibidor da proteassomo, uma protease responsável pela degradação de proteínas. Num primeiro momento buscamos entender o papel da degradação proteica na reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota, uma vez que neste caso, a adenosina se mostrou amnésica para ambas as memórias (recente e remota). Para tanto, realizamos a infusão bilateral intra-CA1 de lactacistina (200 pmol/lado) e a co-infusão de lactacistina (200 pmol/lado) + adenosina (10 nmol/lado) imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino.

Na segunda sessão de teste, o grupo que recebeu apenas lactacistina não apresentou prejuízo com relação ao percentual de tempo gasto no quadrante alvo quando comparados ao grupo salina, assim como o grupo que recebeu a co-infusão de lactacistina + adenosina. Dessa forma podemos observar que a lactacistina foi capaz de reverter o efeito amnésico causado pela administração da adenosina (**Figura 15**).

Na terceira sessão de teste sem reforço, os resultados se repetiram (**Figura 15**).

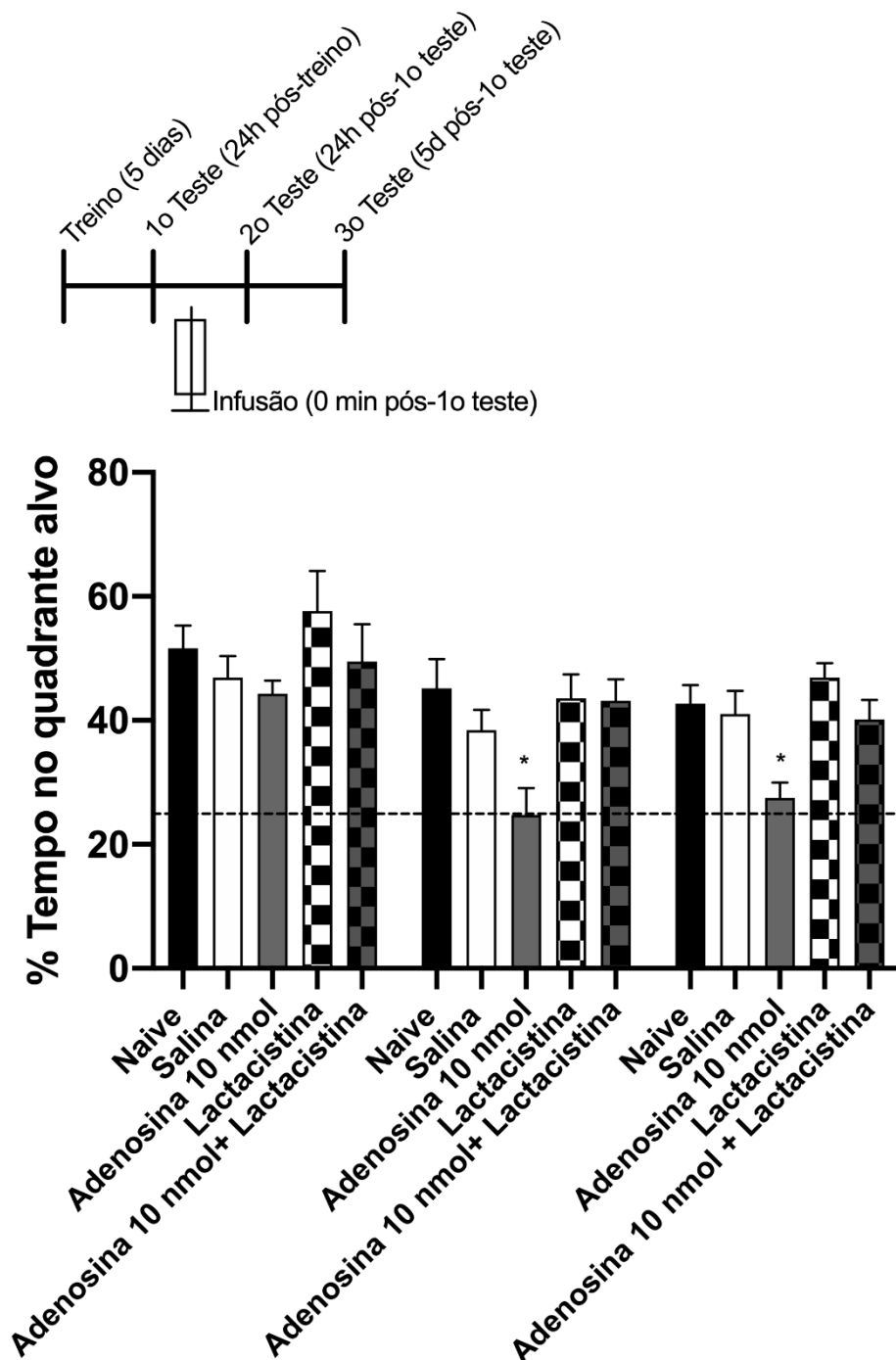


Figura 15: O efeito amnésico da reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é inibido por co-infusão com lactacistina. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 horas depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 μ l) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Lactacistina (Lactacistina, barra quadriculada de fundo branco) ou Adenosina 10 nmol/lado + Lactacistina (Adenosina + Lactacistina, quadriculada de fundo cinza) imediatamente após este

*teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 24 h pós-treino: $F(4, 46) = 1,300$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 46) = 4,900$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 46) = 5,836$. Os outros grupos diferiram significativamente do porcentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n = 7$ a 13 por grupo).*

No caso da reconsolidação remota de memória de longa duração, realizamos as mesmas infusões descritas anteriormente, porém com algumas modificações no protocolo, onde a primeira sessão de teste de reativação sem reforço ocorreu 5 dias após a última sessão de treino, o segundo teste foi realizado 24 horas após a última sessão de teste e o terceiro após 5 dias da última sessão de teste. Esses dois últimos da mesma forma como foi feito no protocolo anterior.

Observamos que os resultados acabaram se repetindo, onde tanto o grupo que recebeu apenas lactacistina como o grupo que recebeu a co-infusão de adenosina + lactacistina não tiveram prejuízo com relação ao desempenho na tarefa quando comparados ao grupo controle, tanto na segunda quanto na terceira sessão de teste sem reforço (**Figura 16**).

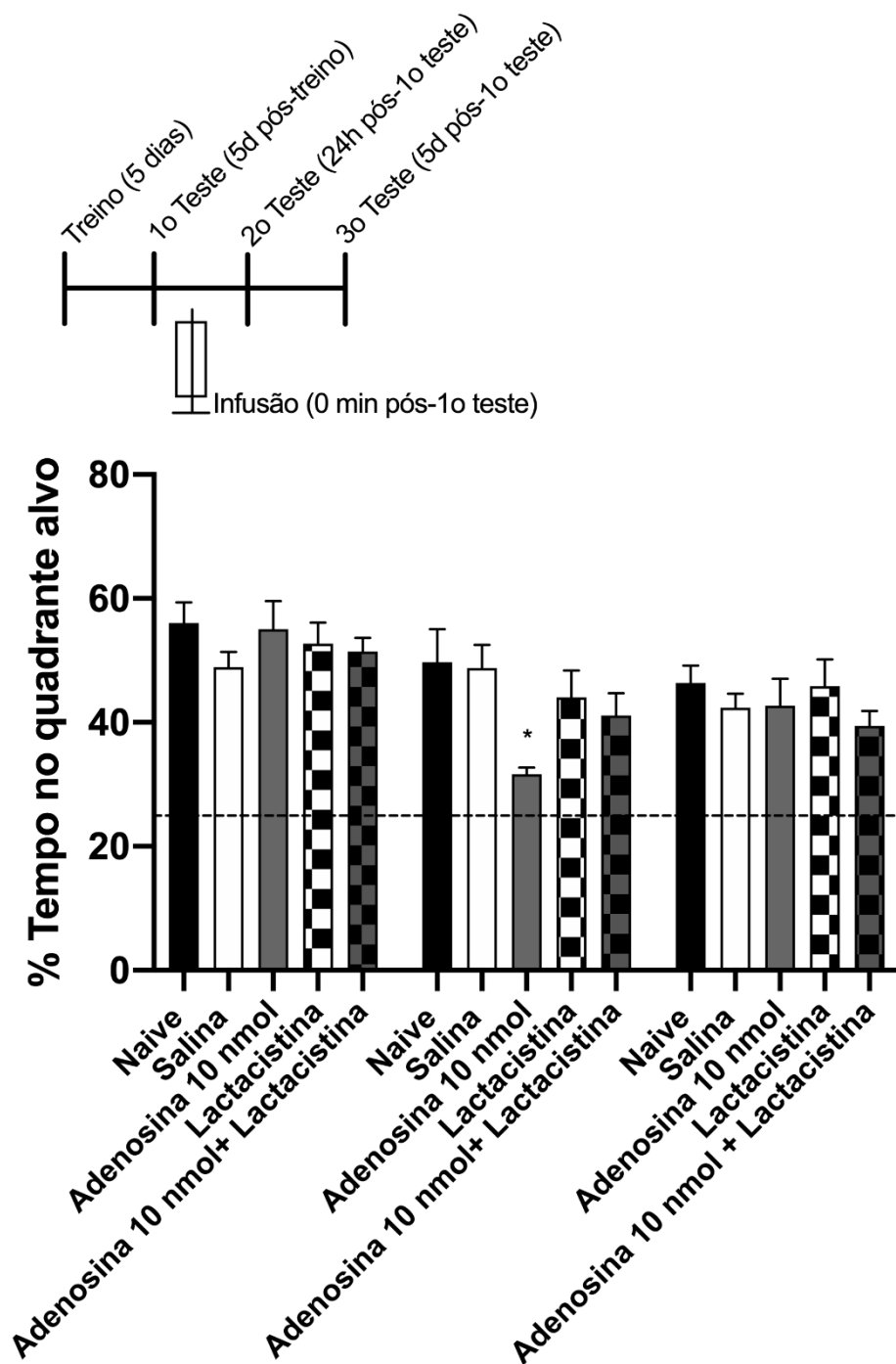


Figura 16: O efeito amnésico na reconsolidação remota de memória de longa duração recente e remota induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é inibido por co-infusão com lactacistina. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 5 dias depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 μ l) de veículo (Salina, barra branca), de adenosina 10 nmol/lado (Adenosina, barra cinza), de Lactacistina (Lactacistina, barra quadriculada de fundo branco) ou Adenosina 10 nmol/lado + Lactacistina (Adenosina + Lactacistina, quadriculada de fundo cinza) imediatamente após este

teste de evocação sem reforço 5 dias pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$ vs. em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 5 d pós-treino: $F(4, 38) = 0,6728$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(4, 38) = 2,494$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(4, 38) = 0,7719$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n = 6$ a 14 por grupo).

3.5 Inibição da via mTOR pela rapamicina prejudica a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração relacionada à tarefa do Labirinto Aquático de Morris.

A grande diferença entre memórias de curta duração e memórias de longa duração é que as memórias de longa duração requerem transcrição de RNAm e tradução de proteínas utilizando assim, várias vias de sinalização para que esses processos sejam possíveis (DA SILVA, 2008; ALBERINI, 2005; IZQUIERDO *et al.*, 1998; MCGAUGH, 2000; MCGAUGH *et al.*, 2005). Quando ocorre a reativação de uma memória, a mesma entra em um estado de instabilidade e para que persista passa pelo processo de reconsolidação, também dependente de síntese proteica (NADER KARIM; SCHAFE GLENN E.; LE DOUX JOSEPH E., 2000).

Uma das vias envolvidas na plasticidade sináptica, aprendizado e formação de memórias (SWIECH *et al.*, 2008), é a via da mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) que regula o nível de tradução de novas proteínas pela fosforilação de alvos intracelulares sendo eles a proteína ribossomal S6 quinase, responsável pela biogênese ribossômica e a proteína de ligação do fator de iniciação 4E (4E-BP) que possui um importante papel na regulação da tradução de proteínas em eucariotos (HAY; SONENBERG, 2004).

A rapamicina age inibindo a mTOR, conseqüentemente enfraquecendo a sua interação com a proteína regulatória da mTOR (Raptor), suprimindo a fosforilação dos principais alvos citados acima e dessa forma prejudicando a retenção de memórias (WANG; HARRIS; LAWRENCE, 2008).

Com o intuito de prosseguirmos com a investigação das vias intracelulares relacionadas aos efeitos da adenosina e dos receptores adenosinérgicos, verificamos a relação da inibição da síntese proteica com os efeitos causados pelo bloqueio de receptores adenosinérgicos, mais especificamente pelo

antagonista adenosinérgico A_3 (MRS 3777), verificado na reconsolidação recente apenas. Mas para que isso fosse possível, primeiramente realizamos a curva dose de rapamicina para encontrar a maior dose em que não houvesse efeito, para que então administrássemos juntamente com o antagonista.

3.5.1 O efeito da rapamicina sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração relativa ao LAM é dose dependente.

Para determinarmos a maior dose em que há efeito sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota, realizamos a infusão bilateral intra-CA1 de rapamicina nas concentrações de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de acordo com a literatura (FARIAS *et al.*, 2019). As infusões foram realizadas imediatamente após a uma sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino.

Observamos que ao longo dos dias de treino os animais aprenderam a tarefa e consolidaram uma memória para mesma, o que pôde ser verificado na primeira sessão de teste dos animais, onde todos os grupos apresentaram um ótimo desempenho em relação ao percentual de tempo gasto no quadrante alvo quando considerada a média teórica de 25% (**Figura 17**).

Permanência

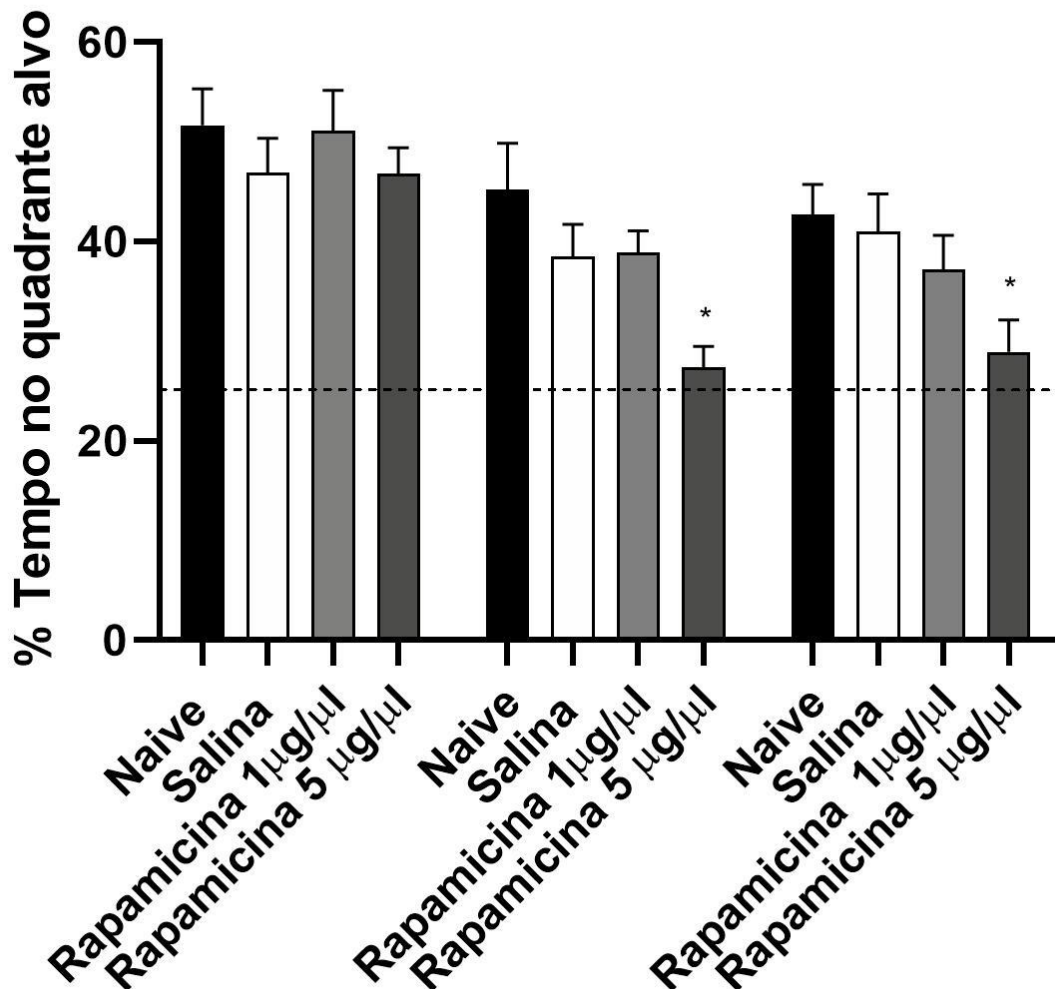


Figura 17: O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de rapamicina sobre a reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota é dose-dependente. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. 24 horas depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (Salina, barra branca), de rapamicina 1 µg/µl/lado (Rapamicina 1 µg/µl, barra cinza claro), de rapamicina 5 µg/µl/lado (Rapamicina 5 µg/µl, barra cinza escuro) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 24 horas pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como uma porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Os outros grupos diferiram significativamente do porcentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n = 9$ a 16 por grupo).

Na segunda e terceira sessão de teste, vemos que os animais que receberam rapamicina na dose de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ apresentaram prejuízo no seu desempenho quando comparados ao grupo que recebeu somente salina (**Figura 17**). Dessa forma pudemos concluir que a maior dose em que não há efeito amnésico da rapamicina, é a dose de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, sendo essa nossa dose escolhida para o próximo passo do experimento (**Figura 17**).

3.5.2 O efeito do antagonista adenosinérgico A_3 MRS 3777 inibe o efeito amnésico da rapamicina na dose de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Em nossa pesquisa durante o projeto de mestrado, obtivemos que o grupo de animais que recebeu a administração do antagonista A_3 (MRS 3777), na terceira sessão de teste, realizada 5 dias após a sessão de reativação sem reforço, esta realizada 24 horas após a última sessão de treino, demonstrou um desempenho significativamente melhor do que o grupo veículo, indicando que a adenosina endógena pode participar via receptores A_3 como um modulador cuja ação contribui para uma diminuição da persistência da memória espacial de longa duração remota. Dessa forma, nosso intuito era investigar se esse efeito pró-mnésico causado pela administração do MRS 3777 se repetiria na presença de um inibidor local de síntese proteica, para que pudéssemos aos poucos ir desvendando por qual via se dá esse efeito.

Para isso, realizamos a infusão bilateral imediatamente pós teste, intra-CA1 de rapamicina na dose de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ juntamente com o antagonista A_3 MRS 3777.

Mais uma vez obtivemos que os animais consolidaram a memória para essa tarefa, efeito comprovado pelo comportamento dos mesmos no primeiro dia de teste (**Figura 18**). E quando analisamos o segundo e o terceiro teste vemos que não houve diferenças significativas entre os grupos em relação ao tempo de permanência no quadrante alvo, onde todos apresentaram um bom desempenho no que diz respeito ao percentual de tempo de nado.

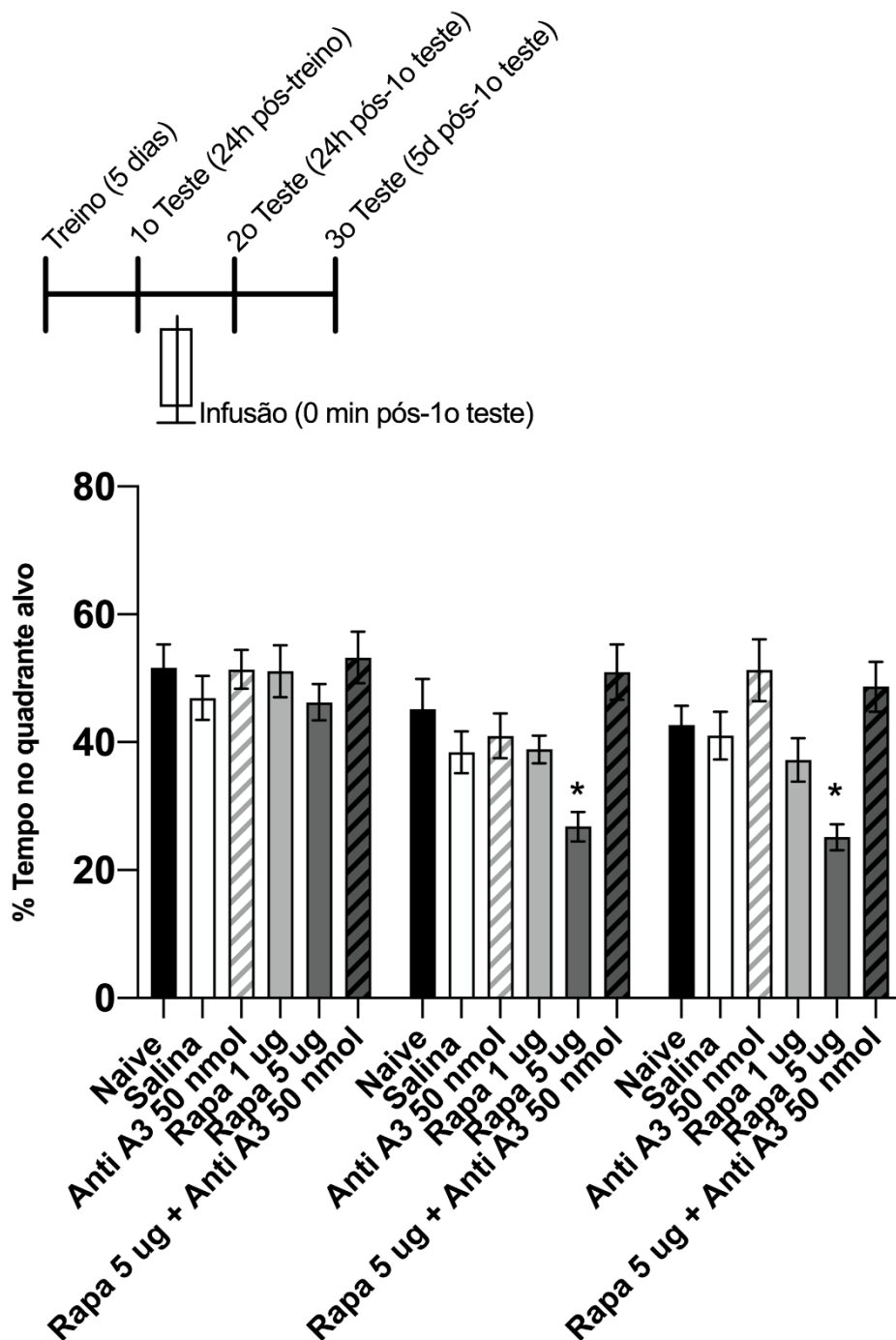


Figura 18: O efeito amnésico sobre a reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota causado pela infusão intra-CA1 de rapamicina é dose-dependente, e reversível pela coadministração com o antagonista A₃ MRS 3777. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 horas depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um grupo de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape. Os animais do grupo Naive não receberam infusão (Naive, barra preta). Os demais ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 μ l) de veículo (Salina, barra branca), de antagonista A₃ 50nmol/lado (Anti A₃ 50 nmol, barra cinza), de rapamicina 1 μ g/ μ l (Rapamicina 1 μ g/ μ l, barra quadriculada de fundo branco) ou rapamicina 1 μ g/ μ l + antagonista A₃ 50 nmol/lado (Rapamicina 1 μ g/ μ l + Antagonista A₃ 50 nmol, quadriculada de fundo cinza) imediatamente após este teste de evocação sem

reforço 24 horas pós-treino. A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo. * $p < 0,05$ vs. Salina em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. Primeiro teste 24 h pós-treino: $F(5, 66) = 0,6263$; Segundo teste 24 h pós-primeiro teste: $F(5, 66) = 5,171$; Terceiro teste 5d pós-primeiro teste: $F(5, 66) = 5,951$. Todos os grupos diferiram significativamente do percentual teórico de 25% em teste t de Student (linha tracejada) ($n = 8$ a 15 por grupo)

Com isso podemos concluir que a coadministração da rapamicina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ com o antagonista A_3 MRS 3777 não prejudicou a retenção desses animais, tanto para memória de longa duração recente (segundo teste) quanto para memória de longa duração remota (terceiro teste) e mais que isso, que quando administrado juntamente com a rapamicina 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, o antagonista A_3 MRS 3777 foi capaz de inibir o efeito amnésico causado pela rapamicina.

3.5.3 Controle da localização das cânulas-guia e local de infusão

Como descrito acima, após as tarefas comportamentais, os animais receberam 1,0 μl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas como descrito acima para garantir que as infusões foram realizadas dentro de um raio de 2 mm do local desejado e após quinze minutos, passaram pela eutanásia (Figura 19).

Além disso, para certificar que os efeitos encontrados foram estrutura específicos também houve a infusão dos fármacos foi feita 1 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, atingindo assim outra estrutura, o córtex occipital médio-lateral.

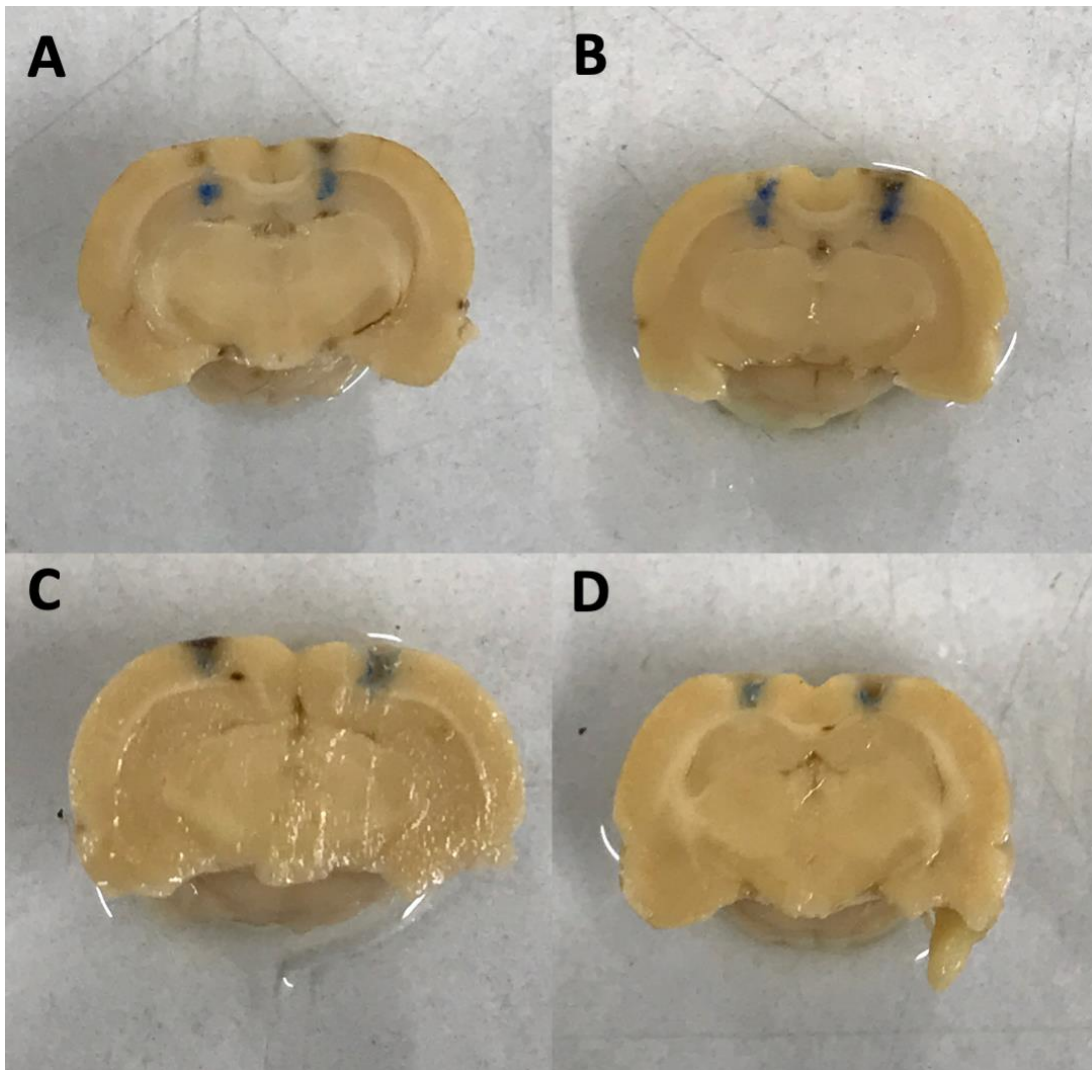


Figura 19: A administração dos fármacos foi realizada no hipocampo dos animais. Um corte transversal foi realizando onde se pode observar na figura 19.A e 19.B a infusão realizada diretamente no hipocampo dos animais. Já nos animais controles 19.C e 19.D vemos a mancha azul na região acima, no córtex occipital.

3.5.4 Controle infusão

Para realização do controle infusão, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No dia em que seria realizado o primeiro teste 24 horas após a última sessão de treino, os animais não passaram por esse teste e mesmo assim receberam a infusão intra-CA1 bilateral de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 48 horas e 6 dias após a última sessão de treino foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina 24 horas pós-treino, sem ter sido precedida de uma sessão de reativação sem reforço, não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 48 horas e 6 dias pós-treino (**Figura 20**). Este resultado exclui a possibilidade de o efeito da adenosina verificado anteriormente tenha sido independente de sua infusão intra-CA1 ter sido imediatamente precedida da sessão de reativação sem reforço, ou devido a alguma ação tardia desencadeada pela adenosina per se que seria verificável 24 horas após sua infusão.

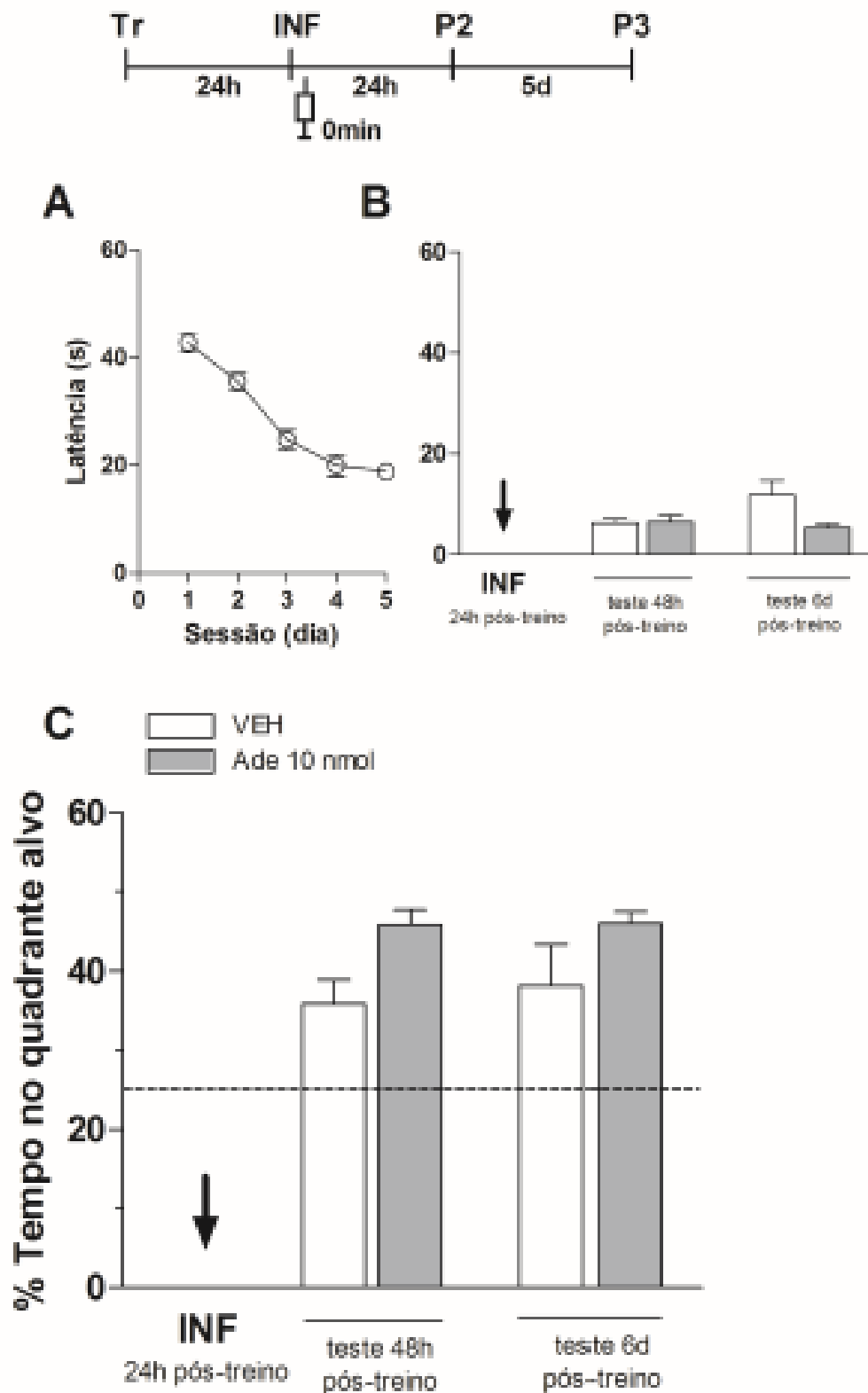


Figura 20: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 24 horas após a última sessão de treino não prejudica a evocação de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 48 horas e 6 dias após a última sessão de treino. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram 68 treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais. Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 μ l) na

região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 24 horas pós-treino (INF). (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um teste de 60 s realizado 48 h pós-treino, e em um segundo teste de 60 s realizado 6 d pós-treino. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. (n = 10 – 11 por grupo).

3.5.5 Controle reforço

Para realização do controle reforço, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No primeiro teste realizado 24 horas após a última sessão de treino, os animais foram submetidos a um teste de 60 segundos na presença da plataforma de escape, de forma que esse teste foi como mais uma sessão de treino com reforço. Os animais receberam imediatamente após essa sessão de teste com reforço a infusão intra-CA1 bilateral de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 24 horas e 5 dias após essa sessão de teste (também denominada reativação) foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina imediatamente pós-teste com reforço não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 24 horas e 5 dias após o primeiro teste (**Figura 21**). Este resultado condiciona o efeito da adenosina verificado anteriormente à ausência do reforço (plataforma de escape) durante a sessão de reativação, necessária para que haja o disparo do processo de labilização que possibilita o processo de reconsolidação que ocorre a seguir. Assim este resultado nos permite afirmar que o efeito da adenosina verificado nesta dissertação foi de fato sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota.

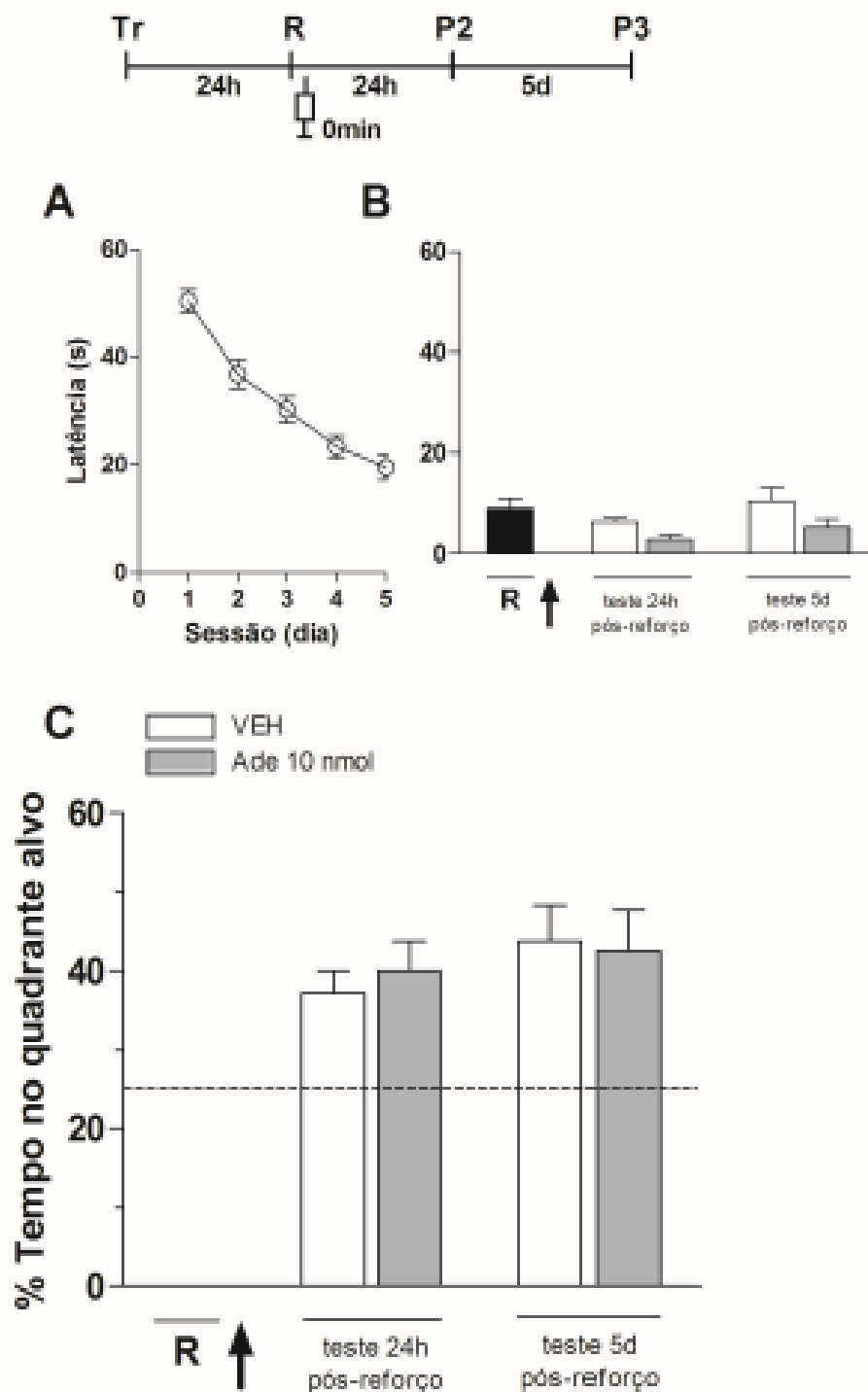


Figura 21: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste com reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram 70 treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s com a presença da plataforma de escape (R, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 μ l) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um

segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste, ambos com a plataforma de escape ausente. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo quando a plataforma de escape esteve ausente (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student.. (n = 6 por grupo).

3.5.6 Controle temporal

Para realização do controle temporal, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No primeiro teste realizado 24 horas após a última sessão de treino, os animais foram submetidos a um teste de 60 segundos na ausência da plataforma de escape. Os animais receberam 3 horas após essa sessão de teste sem reforço a infusão intra-CA1 bilateral de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 24 horas e 5 dias após essa sessão de teste foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina 3 horas pós-teste sem reforço não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 24 horas e 5 dias após o primeiro teste (**Figura 22**). Este resultado mostra que o efeito da adenosina verificado anteriormente sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota é tempo dependente.

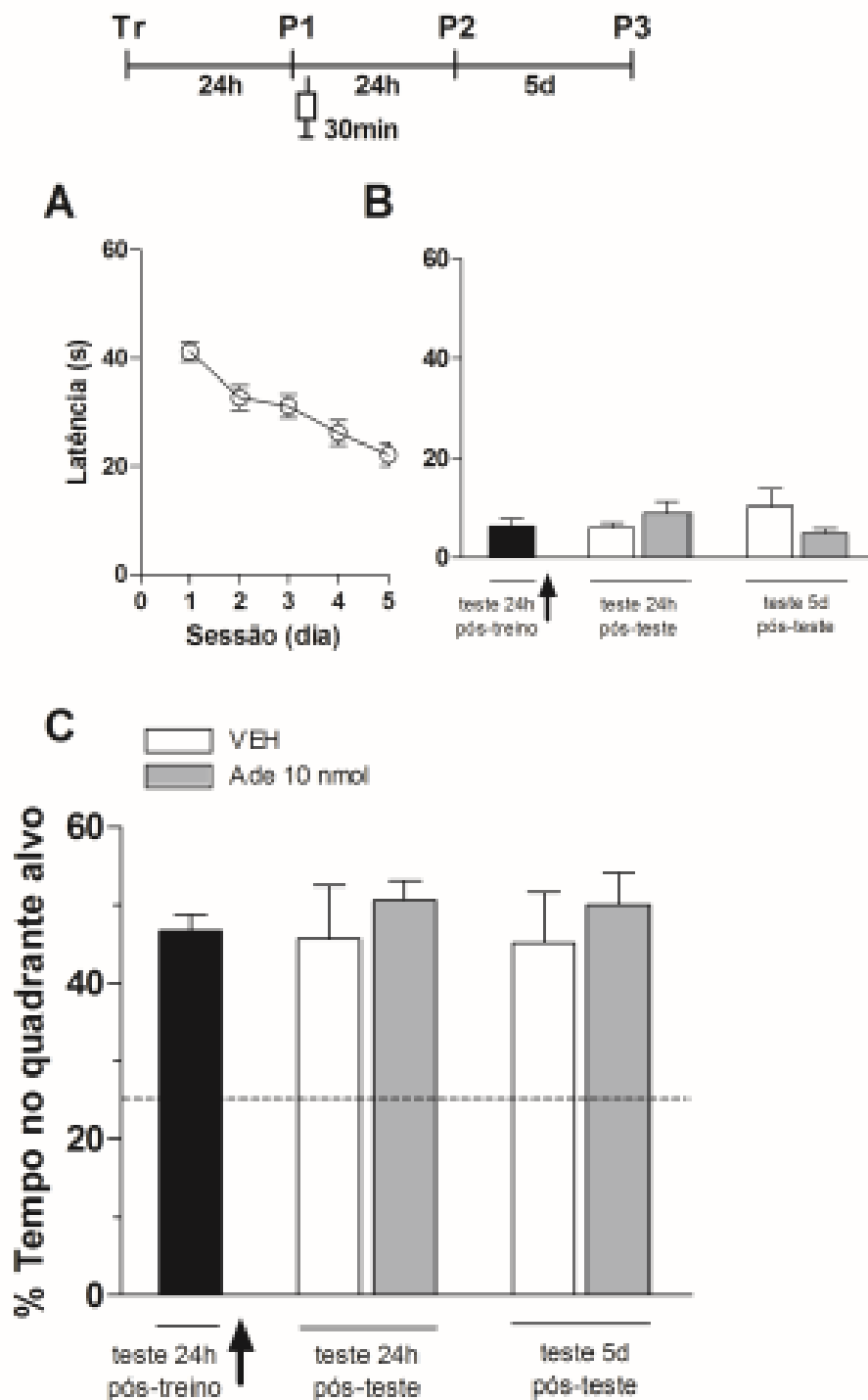


Figura 22: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 3 horas pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados 72 durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 μ l) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 3 h após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60

s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. ($n = 6 - 8$ por grupo).

3.5.7 Controle estrutura

Para realização do controle estrutura, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No primeiro teste realizado 24 horas após a última sessão de treino, os animais foram submetidos a um teste de 60 segundos na ausência da plataforma de escape. Os animais receberam imediatamente após essa sessão de teste sem reforço a infusão bilateral intra-córtex occipital médio-lateral, situado exatamente 1 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 24 horas e 5 dias após essa sessão de teste foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço em uma região 1 mm acima da região CA1 dorsal não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 24 horas e 5 dias após o primeiro teste (**Figura 23**). Este resultado mostra que o efeito da adenosina verificado anteriormente sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota é CA1 dorsal dependente.

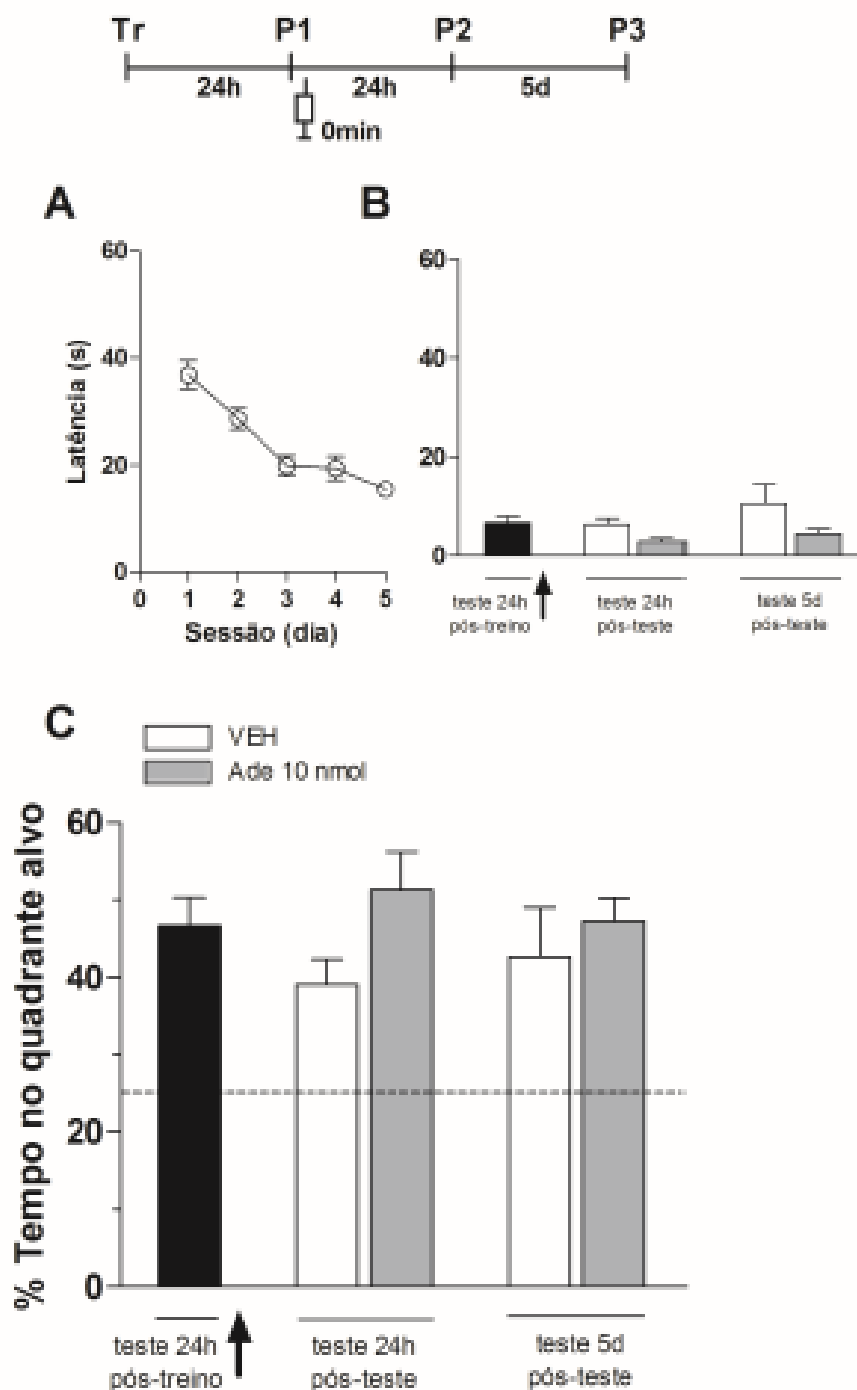


Figura 23: Infusão bilateral intracórtex occipital médio-lateral de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando 1 mm acima da 74 região CA1 do hipocampo dorsal, ou seja, a região cortical occipital médio-lateral, foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 μ l) na região cortical occipital médio-lateral de ratos imediatamente após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60

s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. ($n = 6 - 7$ por grupo).

III DISCUSSÃO

Após o ano 2000, de acordo com as constatações em relação a reconsolidação da memória feitas por Nader e colaboradores (NADER KARIM; SCHAFE GLENN E.; LE DOUX JOSEPH E., 2000), muitos estudos se concentraram na identificação de bloqueadores de reconsolidação como uma alternativa, uma mudança de paradigmas no que diz respeito a tratamento de transtornos mentais (PIGEON *et al.*, 2022; SCHROYENS *et al.*, 2021). Ou seja, a busca foi direcionada a agentes amnésicos que seriam adequados para uso em humanos, como inibidores da síntese de proteínas (como a rapamicina), antagonistas dos receptores β -adrenérgicos e antagonistas do receptor NMDA. Logo, intervenções baseadas em reconsolidação que haviam sido desenvolvidas em roedores começaram a ser traduzidas para humanos, tendo como ponto sensível a dificuldade em replicar os efeitos amnésicos que apareciam (PIGEON *et al.*, 2022).

Na etapa inicial desse trabalho, dando continuidade ao experimento anterior (mestrado), utilizamos a adenosina (10 nmol/lado), agonista adenosinérgico A_1 (CPA - 10 nmol/lado) e agonista adenosinérgico A_3 (HEMADO - 10 nmol/lado), onde foram observadas diferenças significativas entre o grupo que recebeu agonista A_3 imediatamente após o primeiro teste (sessão de reativação sem reforço, 5 dias pós-treino) em relação ao grupo controle, pois na segunda sessão de teste realizada 24 horas pós-primeiro teste, houve um prejuízo na porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo. Porém, na terceira sessão de teste, realizada 5 dias pós-primeiro teste, verificamos que não houve diferenças significativas entre grupos.

Dessa forma, quanto ao principal parâmetro mensurador de evocação de memória para a tarefa do LAM (D'HOOGHE; DEYN, 2001; MORRIS, 1984), a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo, o único agonista que reproduziu o efeito amnésico da adenosina na reconsolidação remota de memória espacial de longa duração, foi o agonista específico para o receptor A_3 . Ou seja, a administração tanto de adenosina, quanto de agonista A_3 , causou amnésia anterógrada na reconsolidação remota de memória de longa duração recente, mas não remota, relativa ao LAM, diferentemente do que havíamos

encontrado para reconsolidação recente, onde os animais tiveram prejuízos em ambos os testes, o que pode estar relacionado ao fato de memórias recentes serem mais sensíveis à interrupção frente a memórias mais antigas (PARKS *et al.*, 2022; ROESLER, 2017; SILVA; GRÄFF, 2023), ou que a amnésica causada pode ter sido transitória e ou mesmo que ainda não tenha sido consolidada. Existe uma hipótese que gradualmente, com o passar do tempo, a memória se torna menos dependente do hipocampo, assim como as informações de contexto a serem levantadas pelos animais ficam menos precisas (ALBERINI; LEDOUX, 2013; HALES *et al.*, 2018; OCAMPO; SQUIRE; CLARK, 2017; TAYLER *et al.*, 2013).

O antagonista A₁ utilizado foi o DPCPX por ter alta seletividade em ratos e camundongos, e moderada em humanos (IJZERMAN *et al.*, 2022), assim como antagonista A₃ MRS 3777. Ambos reverteram o efeito amnésico da adenosina conforme verificado no segundo teste 24 horas pós-primeiro teste, onde os animais que receberam adenosina co-infundida com cada um desses antagonistas tiveram um bom desempenho no que diz respeito ao tempo de nado gasto no quadrante-alvo quando comparados ao grupo salina, o que corrobora com a primeira investigação que fizemos em nosso primeiro trabalho, onde esses dois antagonistas reverteram o efeito amnésico da adenosina, tanto para reconsolidação recente de memória de longa duração recente quanto remota. Porém, no terceiro teste após sessão de reativação, não tivemos desempenho diferente do grupo veículo, uma vez que a própria adenosina não teve efeito amnésico na sessão de teste, mostrando mais uma vez que ela não exerce os mesmos efeitos quando a memória é de longa duração remota.

Com relação ao papel da adenosina endógena, realizamos a infusão dos antagonistas dos receptores A₁ (DPCPX) e A₃ (MRS 3777), na dose de 50 nmol/lado, sem a presença da adenosina. Observamos que não houve diferença significativa nas duas sessões de teste realizadas após a sessão de reativação, corroborando com o que já havíamos encontrado em nosso primeiro trabalho e alguns estudos que já haviam constatado isso (KOPF *et al.*, 1999; MIORANZZA *et al.*, 2011).

Entre os nossos objetivos iniciais, estava a investigação das vias intracelulares responsáveis por esse efeito amnésico causado pela adenosina. Para esclarecer se esse efeito depende de degradação proteica realizamos a

infusão bilateral de lactacistina (200 pmol/lado) e a co-infusão de lactacistina (200 pmol/lado) + adenosina (10 nmol/lado) tanto para reconsolidação recente quanto remota, de memória de longa duração recente e remota, onde observamos que a lactacistina foi capaz de reverter o efeito amnésico causado pela administração da adenosina em todas as sessões de teste realizadas.

Já está estabelecido na literatura que a desestabilização da memória requer maquinaria de degradação de proteínas (DA SILVA *et al.*, 2008; FERRARA; KWAPIS; TRASK, 2023; MILTON; DAS; MERLO, 2023; PARKS *et al.*, 2022; ROESLER, 2017) Os receptores que foram identificados como necessários para a reconsolidação da memória, incluindo receptores NMDA e canais de cálcio controlados por voltagem do tipo L, afetam mudanças intracelulares na concentração de cálcio com dinâmica apropriada para envolver ambas as proteínas fosfatases e o sistema proteassoma (KILEY; PARKS, 2022), o que explica o motivo de termos utilizado a lactacistina como inibidor do proteossoma. Dessa forma, um dos nossos questionamentos havia sido resolvido, respondendo que a adenosina exerce seu efeito, pelo menos em parte, via degradação proteica, pois uma vez que inibimos a degradação proteica local, o efeito amnésico causado pela adenosina foi inibido.

Restava então, entendermos se a amnésia estava relacionada a inibição da síntese de novas proteínas, levando em consideração que a principal diferença entre memórias de curta duração e memórias de longa duração é que as memórias de longa duração requerem transcrição de RNAm e tradução de proteínas (CLÁUDIO DA SILVA; SARTORI BONINI, 2022; DA SILVA *et al.*, 2008; IZQUIERDO *et al.*, 1998; MCGAUGH *et al.*, 2005).

Realizamos uma curva dose-efeito da rapamicina, em que infundimos rapamicina intra-CA1 na dose de 1µg/µl e 5µg/µl imediatamente após a sessão de reativação, devido a janela de tempo da reconsolidação (NADER, 2015; NIKITIN *et al.*, 2019), juntamente com o antagonista A₃ MRS 3777, que é o receptor pelo qual a adenosina exerce seus efeitos conforme todos os experimentos realizados por nós até o momento.

Observamos que nas sessões de teste que quando administrado imediatamente após o primeiro teste juntamente com a rapamicina 5 µg/µl, o antagonista A₃ MRS 3777 foi capaz de inibir o efeito amnésico causado pela

rapamicina já descrito em outros estudos (DASH; ORSI; MOORE, 2006) e verificado neste experimento.

Uma questão chave dos estudos pré-clínicos já publicados é determinar se a desestabilização da memória realmente ocorreu após uma suposta sessão de reativação de memória ou durante o procedimento nas intervenções de reconsolidação (MILTON; DAS; MERLO, 2023). Dessa forma, o limiar de erro que provoque ajustes nos mecanismos de predição, tem sido reconhecido como o processo fundamental que possibilita a aquisição de memórias (SCHULTZ; DICKINSON, 2000), pois o erro de predição guia o processo de aquisição de uma nova informação (memória, habilidade) (DUDAI, 2009), ou seja, quando não ocorre nenhuma “surpresa” ou evento inesperado, não há “estímulo de instabilidade”, o limiar de erro não é atingido e conseqüentemente não há necessidade de ajustes dos mecanismos relacionados àquela memória. Portanto, assim como na aquisição de memórias, na reconsolidação, a inclusão de um evento inesperado entre a respostas esperada e a que foi observada, define o erro de predição nessa memória, o que corrobora com a ideia de que as memórias são atualizadas pelo processo de reconsolidação (EXTON-MCGUINNESS; LEE; REICHEL, 2015).

No entanto, é preciso diferenciar se esse evento inesperado impõe ao sistema uma surpresa ou uma novidade, pois cada uma delas resulta em conseqüências distintas para a memória, uma vez que o sistema consegue distinguir informações novas e antigas, determinando se há a necessidade de codificação da informação ou uma atualização de uma memória já existente. Autores trazem como novidade, algo que não foi previamente experimentado, ou seja, um evento novo que não está armazenado na memória e quando apresentado irá promover a formação de um novo traço de memória. Já a surpresa é definida como uma incompatibilidade entre uma expectativa baseada em experiências prévias, e a atual exposição que implica em ajuste de acordo com o resultado atual (BARTO; MIROLLI; BALDASSARRE, 2013). A quantidade de surpresa para induzir o fortalecimento de uma memória durante a reconsolidação deve ser adequadamente ajustada, uma vez que pouca quantidade de surpresa pode resultar em pequena atualização dos mecanismos de predição e pouca mudança comportamental e em contrapartida, uma grande quantidade de surpresa pode ocasionar um efeito de enfraquecimento da

memória original ou mesmo conduzir a extinção da memória original e consequentemente um aprendizado inteiramente novo (AGUSTINA LÓPEZ *et al.*, 2016).

Diante disso, conseguimos observar em nossos experimentos que a forma como a memória foi reativada, foi suficiente para ser entendida como uma “quantidade ideal” de surpresa, pois seguimos o mesmo modelo de reativação na pesquisa do mestrado e durante o projeto de doutorado, mostrando uma consistência desses resultados. Em nosso caso, a surpresa foi a ausência da plataforma de escape, que estava presente durante as sessões de treino, corroborando com estudos que afirmam que a memórias associativas devem apresentar em suas sessões de reativação algum nível de “surpresa” e induzir a um erro de predição, sendo capazes de desestabilizar a memória original conduzindo ao processo de reconsolidação (AGUSTINA LÓPEZ *et al.*, 2016; KRAWCZYK *et al.*, 2017).

A literatura relacionada com a reconsolidação na pesquisa pré-clínica traz como desafio a interpretação de falhas aparentes para observar possíveis efeitos de interferência de reconsolidação de memória. A argumentação é que qualquer estudo que mostre um efeito amnésico após uma técnica de interrupção mnemônica – farmacológica ou comportamental – no momento de reativação da memória potencialmente suporta a teoria da reconsolidação, mas qualquer falta de efeito pode ser atribuída a uma falha em disparar a desestabilização da memória, podendo trazer falseabilidade (KILEY; PARKS, 2022). Nesse sentido, conseguimos demonstrar ainda mais robustez em nossos resultados, pois como a nossa investigação permaneceu em torno do efeito amnésico causado pela adenosina, esse viés nos experimentos comportamentais envolvendo a reconsolidação da memória não esteve presente em nossos estudos.

Os resultados apresentados nessa tese de doutorado são enriquecedores do ponto de vista fisiológico, além de suportar uma grande possibilidade de extrapolabilidade desses resultados para a pesquisa clínica, primeiramente pela utilização de uma tarefa robusta de avaliação de memória espacial, o LAM, e também pelo fato de que a navegação aloccêntrica (utilizada pelos animais em nossos experimentos) que envolve o hipocampo, o córtex entorrinal e estruturas adjacentes, também é requisitada em humanos (VORHEES; WILLIAMS, 2015).

Este trabalho também contribui na identificação dos receptores purinérgicos como alvos terapêuticos, onde abordagens terapêuticas poderiam se beneficiar da manipulação da reconsolidação, como o transtorno de estresse pós traumático (TEPT), por exemplo(ALBERINI, 2011).

Em suma, conseguimos esclarecer que a adenosina modula a reconsolidação remota de memória de longa duração recente e remota via receptores A_3 . Não temos propriedade para afirmar exatamente por qual via intracelular ela é capaz de modular a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente e remota, porém ficou claro que seu efeito é dependente de degradação proteica. Somado a esse resultado, observamos que um antagonista do receptor A_3 foi capaz de inibir o efeito amnésico, causado por um inibidor de síntese de proteínas, demonstrando um possível papel da adenosina na regulação do *turnover* protéico. Assim, por sua afinidade com receptores A_3 , quando ativado converge a um efeito amnésico via cascata de transdução de sinal devido a inibição de síntese proteica e/ou ativação da degradação protéica.

Elencando os próximos passos dessa pesquisa, estes seriam o entendimento de quais componentes enzimáticos de quais cascatas intracelulares de transdução de sinal e identificar quais proteínas, dentre as que sabidamente são essenciais para a plasticidade neuronal subjacente a LTP (ABRAHAM; WILLIAMS, 2008), podem estar envolvidas no momento da reativação sem reforço da memória espacial, objetivo que foi encaminhado porém não foi concluído em tempo para essa tese devido à uma pandemia.

Além disso, são objetivos futuros a varredura do restante da família de receptores purinérgicos, os P2, pois estudos já vêm sendo feitos e publicados investigando os receptores P2X e P2Y como alvos terapêuticos, como segue no artigo submetido em anexo.

IV CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- 1) O efeito amnésico da adenosina sobre a reconsolidação remota de memória de longa duração, testada 5 dias após a última sessão de treino, é causado somente sobre a memória espacial de longa duração recente;
- 2) A adenosina modula a reconsolidação remota de memória espacial de longa duração recente via receptores A_3 ;
- 3) A adenosina endógena não possui um efeito crítico na reconsolidação remota de memória espacial de longa duração, fato confirmado pela administração dos antagonistas dos receptores adenosinérgicos imediatamente após a sessão do primeiro teste;
- 4) A amnésia anterógrada causada pela adenosina infundida imediatamente pós-teste é dependente de degradação proteica.
- 5) A amnésia anterógrada causada pela inibição pós-teste de síntese protéica é dependente da ativação de receptores A_3 .

VI REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, Wickliffe C.; WILLIAMS, Joanna M. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 260–268, 2008.
- AGUSTINA LÓPEZ, M. *et al.* Different dimensions of the prediction error as a decisive factor for the triggering of the reconsolidation process. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 136, p. 210–219, 2016.
- ALBERINI, Cristina M. Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 51–56, 2005.
- ALBERINI, Cristina M. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. MARCH, p. 1–10, 2011.
- ALBERINI, Cristina M.; LEDOUX, Joseph E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. R746–R750, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.046>.
- ALMEIDA, T. *et al.* Purinergic P2 receptors trigger adenosine release leading to adenosine A2A receptor activation and facilitation of long-term potentiation in rat hippocampal slices. **Neuroscience**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 111–121, 2003.
- ANDERSON, E.M *et al.* Prenatal toluene exposure impairs performance in the Morris Water Maze in adolescent rats. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 677, n. 1–3, p. 216–221, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nnt.2015.06.002>.
- BARNES, C. A. *et al.* Acetyl-1-carnitine 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 499–506, 1990.
- BARTO, Andrew; MIROLLI, Marco; BALDASSARRE, Gianluca. Novelty or Surprise?. **Frontiers in Psychology**, [s. l.], v. 4, n. DEC, p. 907, 2013.
- BLAKE, M. G. *et al.* Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms. **Journal of Physiology Paris**, [s. l.], v. 108, n. 4–6, p. 286–291, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.005>.
- BOREA, Pier Andrea *et al.* Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 1591–1625, 2018.
- BROADBELT, Tabitha *et al.* Impairment in novelty-promoted memory via behavioral tagging and capture before apparent memory loss in a knock-in model of Alzheimer's disease. **Scientific Reports 2022 12:1**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–15, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-26113-1>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007.

BURNSTOCK, Geoffrey; VERKHRATSKY, Alexei. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Purinergic Signalling and the Nervous System**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 119–244, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-28863-0_5.

CALLAN, S. P.; HANNIGAN, J. H.; BOWEN, S. E. Prenatal toluene exposure impairs performance in the Morris Water Maze in adolescent rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 342, p. 180–187, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.050>.

CAMICI, Marcella; GARCIA-GIL, Mercedes; TOZZI, Maria Grazia. The inside story of adenosine. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 1–14, 2018.

CHEN, Jiang Fan. **Adenosine receptor control of cognition in normal and disease**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2014-. ISSN 00747742.v. 119 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801022-8.00012-X>.

CHOI, Se Hoon *et al.* A simple modification of the water maze test to enhance daily detection of spatial memory in rats and mice. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 156, n. 1–2, p. 182–193, 2006.

CLÁUDIO DA SILVA, Weber; SARTORI BONINI, Juliana. Inhibition of late mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory in male rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 195, p. 107687, 2022.

CONSTANTINO, Leandra C. *et al.* Functional interplay between adenosine A2A receptor and NMDA preconditioning in fear memory and glutamate uptake in the mice hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 180, p. 107422, 2021.

CUNHA, Rodrigo A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1receptor activation to A2Areceptor blockade. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 111–134, 2005.

D'HOOGE, Rudi; DEYN, Peter P. De. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, [s. l.], v. 36, p. 60–90, 2001.

DA SILVA, Weber C. *et al.* Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 29–39, 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hipo.20362>. Acesso em: 16 abr. 2023.

DA SILVA WEBER CLÁUDIO , GABRIELA CARDOSO, JULIANA SARTORI BONINI, FERNANDO BENETTI, Ivan Izquierdo. Memory reconsolidation and its maintenance depend on L-voltage-dependent calcium channels and CaMKII functions regulating protein turnover in the hippocampus. **PNAS**, [s. l.], v. 110, p. 6566–6570, 2013.

DASH, Pramod K.; ORSI, Sara A.; MOORE, Anthony N. Spatial Memory Formation and Memory-Enhancing Effect of Glucose Involves Activation of the Tuberos Sclerosis Complex–Mammalian Target of Rapamycin Pathway. **The**

Journal of Neuroscience, [s. l.], v. 26, n. 31, p. 8048, 2006. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6673778/](#). Acesso em: 13 abr. 2023.

DAVIS, Hasker P.; SQUIRE, Larry R. Protein synthesis and memory: A review. **Psychological Bulletin**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 518–559, 1984.

DE MICHELE, Pasquale. **Analysis, tuning and implementation of neuronal models simulating Hippocampus dynamics**. 2015. 116 f. - Università Degli Studi Di Napoli Federico II, [s. l.], 2015.

DUDAI, Yadin. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 12, p. 211–216, 2002.

DUDAI, Yadin. Predicting not to predict too much: how the cellular machinery of memory anticipates the uncertain future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 364, n. 1521, p. 1255–1262, 2009. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0320>. Acesso em: 13 abr. 2023.

DUDAI, Yadin. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram?. **Annual Review of Psychology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 51–86, 2004.

DUDAI, Yadin; EISENBERG, Mark. Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. **Neuron**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 93–100, 2004.

EXTON-MCGUINNESS, Marc T.J.; LEE, Jonathan L.C.; REICHEL, Amy C. Updating memories—The role of prediction errors in memory reconsolidation. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 278, p. 375–384, 2015.

FAN, Xiaocen *et al.* Noradrenergic signaling mediate early tagging and storage of . **Chinese Academy of Medical Sciences**, [s. l.], n. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35342-x>. Acesso em: 27 mar. 2023.

FARIAS, Clarissa Penha *et al.* Extinction learning with social support depends on protein synthesis in prefrontal cortex but not hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 5, p. 1765–1769, 2019.

FERRARA, Nicole C.; KWAPIS, Janine L.; TRASK, Sydney. Memory retrieval, reconsolidation, and extinction: Exploring the boundary conditions of post-conditioning cue exposure. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 1146665, 2023. Disponível em: [/pmc/articles/PMC10017482/](#). Acesso em: 10 abr. 2023.

FURINI, Cristiane R.G. *et al.* Molecular Mechanisms in Hippocampus Involved on Object Recognition Memory Consolidation and Reconsolidation. **Neuroscience**, [s. l.], v. 435, p. 112–123, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.047>.

GARCIA-GIL, Mercedes *et al.* Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. [s. l.], v. 12, n. May, p. 1–22, 2021.

GRIEVES, Roddy M.; JEFFERY, Kate J. The representation of space in the brain. **Behavioural Processes**, [s. l.], v. 135, n. December, p. 113–131, 2017.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2016.12.012>.

HALES, Jena B. *et al.* Recent and remote retrograde memory deficit in rats with medial entorhinal cortex lesions. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 155, n. March, p. 157–163, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.07.013>.

HARGUS, Nicholas J. *et al.* Enhanced actions of adenosine in medial entorhinal cortex layer II stellate neurons in temporal lobe epilepsy are mediated via A 1-receptor activation. **Epilepsia**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 168–176, 2012.

HARVEY, Alan L. *et al.* A novel dihydropyrazolo(3,4d)(1,2,4)triazolo(1,5a)pyrimidin-4-one (AJ23) is an antagonist at adenosine A1 receptors and enhances consolidation of step-down avoidance. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 234, n. 2, p. 184–191, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.06.023>.

HAY, Nissim; SONENBERG, Nahum. Upstream and downstream of mTOR. **Genes and Development**, [s. l.], v. 18, n. 16, p. 1926–1945, 2004.

HERWEG, Nora A.; KAHANA, Michael J. Spatial Representations in the Human Brain. **Frontiers in Human Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. July, p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2018.00297/full>.

IJZERMAN, Adriaan P. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CXII: Adenosine Receptors: A Further Update. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 340–372, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC8973513/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

IZQUIERDO, Iván *et al.* Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 496–505, 2006.

IZQUIERDO, I. *et al.* Mechanisms for memory types differ [8]. **Nature**, [s. l.], v. 393, n. 6686, p. 635–636, 1998.

IZQUIERDO, Ivan. **Memória**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane R.G.; MYSKIW, Jociane C. Fear memory. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.

JIMÉNEZ-RUBIO, Graciela *et al.* Age-dependent effects of testosterone on spatial memory in male rats. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 122, n. 101, p. 104748, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104748>.

KANDEL, Eric R. *et al.* **Princípios de Neurociências**. 5. ed. [S. l.]: AMGH editora, 2014.

KILEY, Christopher; PARKS, Colleen M. Mechanisms of Memory Updating: State Dependency vs. Reconsolidation. **Journal of Cognition**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–13, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC8740636/>. Acesso em: 10 abr. 2023.

KOBAYASHI, T. *et al.* Contribution of hippocampal place cell activity to learning and formation of goal-directed navigation in rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 117, n. 4, p. 1025–1035, 2003.

KOPF, Silvia R. *et al.* Adenosine and memory storage: Effect of A1 and $\alpha 2$ receptor antagonists. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 146, n. 2, p. 214–219, 1999.

LATINI, Serena; PEDATA, Felicita. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 463–484, 2001.

LEE, Jonathan L.C.; NADER, Karim; SCHILLER, Daniela. An update on memory reconsolidation updating. **Trends in cognitive sciences**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 531, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5605913/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35605913/). Acesso em: 27 mar. 2023.

LENT, Roberto. Roberto lent. [s. l.], p. 848, 2010.

LEÓN, Irene; TASCÓN, Laura; CIMADEVILLA, José Manuel. Age and gender-related differences in a spatial memory task in humans. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 306, p. 8–12, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.008>.

LOCCHI, Federica *et al.* Water T-maze, an improved method to assess spatial working memory in rats: Pharmacological validation. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 422, n. 3, p. 213–216, 2007.

LOPEZ, Joëlle; VASCONCELOS, Anne Pereira de; CASSEL, Jean Christophe. Differential sensitivity of recent vs. remote memory traces to extinction in a water-maze task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 460–466, 2008.

MCGAUGH, James L. Memory - A century of consolidation. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MCGAUGH, James L. *et al.* Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Science**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1527–1543, 2005. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a021808>.

MERIGHI, Stefania *et al.* A2A Adenosine Receptor Antagonists in Neurodegenerative Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 24, p. 4138–4151, 2021.

MILTON, Amy L.; DAS, Ravi K.; MERLO, Emiliano. The challenge of memory destabilisation: From prediction error to prior expectations and biomarkers. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 194, p. 100–104, 2023.

MIORANZZA, Sabrina *et al.* Blockade of adenosine A1 receptors prevents methylphenidate-induced impairment of object recognition task in adult mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 169–176, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.10.022>.

MONCADA, Diego; BALLARINI, Fabricio; VIOLA, Haydée. Behavioral Tagging: A Translation of the Synaptic Tagging and Capture Hypothesis. [s. l.], 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/650780>. Acesso em: 27 mar. 2023.

MORRIS, Richard. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 11, p. 47–60, 1984.

MORRIS, Richard G.M. Long-term potentiation and memory. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 358, n. 1432, p. 643–647, 2003.

MORRIS, Richard G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 239–260, 1981.

MUEHLROTH, Beate E.; RASCH, Björn; WERKLE-BERGNER, Markus. Episodic memory consolidation during sleep in healthy aging. **Sleep Medicine Reviews**, [s. l.], v. 52, 2020.

NADER, Karim. Reconsolidation and the dynamic nature of memory. **Novel Mechanisms of Memory**, [s. l.], p. 1–20, 2015.

NADER KARIM; SCHAFE GLENN E.; LE DOUX JOSEPH E. The labile nature of consolidation theory. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. December, p. 722–726, 2000.

NEVES, P M Silvana *et al.* **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. 1. ed. São Paulo: [s. n.], 2013.

NIKITIN, Vladimir P. *et al.* Proteins or RNA synthesis inhibitors suppressed induction of amnesia developing under impairment of memory reconsolidation by serotonin receptors antagonist. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 131, n. August, p. 104520, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104520>.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. Short Communications The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 171–175, 1971. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915>.

OCAMPO, Amber C; SQUIRE, Larry R; CLARK, Robert E. Insufficient Sleep Is a Public Health Problem Sleep-Related Unhealthy Behaviors. **Centers for Disease Control and Prevention**, [s. l.], p. 563–569, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Features/dsSleep/index.html>.

ORLANDI, Iván Rabinovich *et al.* Behavioral tagging underlies memory reconsolidation. **PNAS**, [s. l.], v. 117, n. 30, p. 18029–18036, 2020.

PARKS, Colleen M. *et al.* The time window of reconsolidation: A replication. **Psychonomic Bulletin & Review**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 2008, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9012516/](https://pmc/articles/PMC9012516/). Acesso em: 11 abr. 2023.

PAXINOS GEORGE, Charles R.R. Watson and Piers C. Emson. Histological procedures Reference planes. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 3, 1980.

PIGEON, Sereena *et al.* Impairing memory reconsolidation with propranolol in healthy and clinical samples: a meta-analysis. **Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. E109, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8979654/](https://pmc/articles/PMC8979654/). Acesso em: 10 abr. 2023.

RALEVIC, Vera; BURNSTOCK, Geoffrey. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 50, p. 415–475, 1998.

ROESLER, Rafael. Molecular mechanisms controlling protein synthesis in memory reconsolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 142, p. 30–40, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2017.04.015>.

SACHDEVA, Sakshi; GUPTA, Monika. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 245–253, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.011>.

SARLAK, Zahra *et al.* The effects of aerobic training before and after the induction of Alzheimer's disease on ABCA1 and APOE mRNA expression and the level of soluble A β 1-42 in the hippocampus of male Wistar rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 399–406, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31168344><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6535205>.

SCHOENFELD, Robby *et al.* Variations of the Morris water maze task to comparatively assess human and rodent place navigation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 139, p. 117–127, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.022>.

SCHROYENS, Natalie *et al.* Reactivation-Dependent Amnesia for Contextual Fear Memories: Evidence for Publication Bias. **eNeuro**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7877470/>. Acesso em: 10 abr. 2023.

SCHULTZ, Wolfram; DICKINSON, Anthony. Neuronal Coding of Prediction Errors. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 473–500, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.473>.

SEBASTIÃO, A. M; RIBEIRO, JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *In*: HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY. [S. l.: s. n.], 2009. p. 471–534.

SILVA, Weber Cláudia Francisco Nunes da. Histamina aumenta a consolidação de memórias aversivas através de um mecanismo dependente da ativação de receptores H₂. [s. l.], p. 78, 2005. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/6817>.

SILVA, Weber C. Da *et al.* Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory. **Hippocampus**, [s. l.], v. 18, p. 29–39, 2008.

SILVA, Bianca A.; GRÄFF, Johannes. Face your fears: attenuating remote fear memories by reconsolidation-updating. **Trends in Cognitive Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 404–416, 2023.

SINGH, Anand Kumar *et al.* Targeting the A₃ adenosine receptor to prevent and reverse chemotherapy-induced neurotoxicities in mice. **Acta Neuropathologica Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01315-w>.

SQUIRE, Larry R. Mechanisms of memory. **Science**, [s. l.], v. 232, n. 1983, p.

1612–1619, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3086978/>.

SWIECH, Lukasz *et al.* Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1784, n. 1, p. 116–132, 2008.

TAYLER, Kaycie K. *et al.* Reactivation of neural ensembles during the retrieval of recent and remote memory. **Current Biology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 99–106, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.019>.

VORHEES, Charles V.; WILLIAMS, Michael T. Reprint of “Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies”. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 52, n. 2014, p. 93–108, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2015.06.002>.

WANG, Wenzhu *et al.* **Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test.** [S. l.]: Elsevier Ireland Ltd, 2017-. ISSN 18727972.v. 636 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.026>.

WANG, Lifu; HARRIS, Thurl E.; LAWRENCE, John C. Regulation of proline-rich akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 23, p. 15619–15627, 2008.

WONG, Zheng Wei; ENGEL, Tobias. More than a drug target: Purinergic signalling as a source for diagnostic tools in epilepsy. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 222, p. 109303, 2023.

YANG, Danqing *et al.* Cholinergic and Adenosinergic Modulation of Synaptic Release. **Neuroscience**, [s. l.], v. 456, p. 114–130, 2021.

V ANEXOS

V.1 Artigo de revisão

Einstein (São Paulo)



Purinergic Signaling: a review with emphasis on P2 receptors as therapeutic targets.

Journal:	<i>Einstein (São Paulo)</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fiebrantz, Anne Karine; UFRGS, physiology da Silva, Weber Cláudio; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pharmacy
Keyword:	purinergic receptors, ATP, adenosine, memory, purinergic signaling

V.2 Artigo com os dados da tese

10/04/23, 14:27

Email – Anne Karine – Outlook

Please verify your contribution to On the participation of adenosinergic receptors in the reconsolidation of spatial long-term memory in male rats

NLM (ELS) <em@editorialmanager.com>

Sex, 07/04/2023 03:44

Para: Anne Karine Bosetto Fiebrantz <anne.karine@hotmail.com>

This is an automated message.

Journal: Neurobiology of Learning and Memory

Title: On the participation of adenosinergic receptors in the reconsolidation of spatial long-term memory in male rats

Corresponding Author: Dr. Weber Cláudio Da Silva

Co-Authors: Anne Karine Bosetto Fiebrantz; Luana Felski Leite; Eduarda Dal Pisol Schwab; Juliana Sartori Bonini

Manuscript Number: NLM-23-76

Dear Anne Karine Bosetto Fiebrantz,

The corresponding author Dr. Weber Cláudio Da Silva has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Neurobiology of Learning and Memory.

Submission Title: On the participation of adenosinergic receptors in the reconsolidation of spatial long-term memory in male rats

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: [Yes, I am affiliated.](#)

V.3 Parecer do Comitê de Ética de Uso em Animais (CEUA)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 047/2019 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 02 de Agosto de 2019.

Senhor Pesquisador,


1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: “Estudo do papel dos receptores adenosinérgicos na taxa de renovação proteica subjacente a reconsolidação de memória de longa duração recente e remota.” protocolo número 018/2019, com início em 01/06/2019 e término em 31/05/2020, utilizando-se de 186 Ratos Wistar, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, na reunião do dia 02 de agosto de 2019.
2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:

Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.

Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.

Qualquer alteração na pesquisa que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Prof. Weber Claudio Francisco Nunes da Silva
Atenciosamente,


Ivo Ilvan Kerppers
Presidente da Ceua/Unicentro
Port. nº 411- GR/Unicentro-2019

Ao Senhor
Prof. Weber Claudio Francisco Nunes da Silva
UNICENTRO-CEDETEG