

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ENVOLVIMENTO DA SÍNTESE PROTEICA NO HIPOCAMPO
DORSAL NA TOLERÂNCIA AO EFEITO ANSIOLÍTICO DO
MIDAZOLAM OBSERVADA NA TERCEIRA EXPOSIÇÃO AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO EM RATOS**

VAGNER FAGNANI LINARTEVICH

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra
Biblioteca Universitária da UFSC

Linartevichi, Vagner Fagnani

Envolvimento da síntese proteica no hipocampo dorsal na tolerância ao efeito ansiolítico do midazolam observada na terceira exposição ao labirinto em cruz elevado em ratos [dissertação] / Vagner Fagnani Linartevichi ; orientador, Leandro José Bertoglio - Florianópolis, SC, 2013.

110 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade. 3. Anisomicina. 4. Hipocampo. 5. Reconsolidação da memória. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

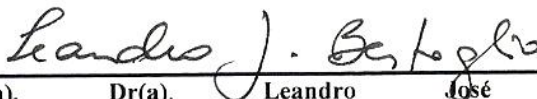
“Envolvimento da síntese proteica no hipocampo dorsal na tolerância ao efeito ansiolítico do midazolam observada na terceira exposição ao labirinto em cruz elevado em ratos”

por

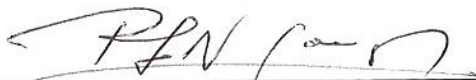
Vagner Fagnani Linartevichi

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 03/PPGFMC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Leandro José Bertoglio
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Ricardo Luiz Nunes de Souza (FCF/UNESP)



Prof(a). Dr(a). Geison Izidio (BEG/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 07 de fevereiro de 2013.

Este trabalho é dedicado aos meus
queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Leandro José Bertoglio, pela orientação, atenção, paciência e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Aos professores: Cilene Lino-de-Oliveira, Geison Izidio e Ricardo Nunes de Souza, pela contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação.

Aos colegas do laboratório, Ana, Cristina, Lucas e Rafael pela colaboração.

Às queridas amigas Flora, Renata, Marília e Amanda pelo apoio, dedicação e carinho durante o desenvolvimento deste mestrado e é claro por serem minha família em Florianópolis.

Aos demais colegas do departamento, em especial aos da turma de mestrado de 2011, pela amizade e auxílio em todas as horas.

Aos meus amados pais, Felício e Sônia, e a minha querida irmã Valquíria, pelo apoio incondicional, carinho e cuidado em todas as horas.

À todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro.

E acima de tudo, a Deus, pelas oportunidades e vitórias conquistadas.

“É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia”
(Clarice Lispector)

RESUMO

Em roedores, a experiência prévia ao labirinto em cruz elevado (LCE) compromete, em uma re-exposição, o efeito ansiolítico de uma série de drogas, incluindo o midazolam (MDZ). A evocação de uma memória adquirida durante a primeira exposição tem sido descrita como a principal responsável pela ocorrência desse fenômeno. O hipocampo é composto pelas regiões dorsal (HD) e ventral (HV) e está correlacionado com o processamento cognitivo e emocional. O papel do HD em consolidar a memória relacionada à tolerância comportamental ao MDZ já foi demonstrado. Estudos prévios sugerem a participação do hipocampo na reconsolidação de vários tipos de memórias, um processo dependente de síntese proteica que ocorre após a reativação da memória. No entanto o papel do hipocampo na reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ ainda não foi investigado. O objetivo do presente estudo foi analisar a contribuição relativa do HD e HV para reconsolidar a memória relacionada à tolerância ao MDZ. Ratos Wistar machos foram expostos três vezes ao LCE, receberam infusão bilateral de anisomicina (ANI; 80µg) no hipocampo, um inibidor de síntese proteica, após a segunda exposição e MDZ (0,5 mg/kg) via intraperitoneal 30 min antes da terceira exposição. A administração de ANI no HD imediatamente, porém não 6 h, após a reativação, prejudicou a memória de um e sete dias de idade. Esse efeito foi duradouro por pelo menos sete dias, porém não ocorreu na ausência da reativação da memória. Nenhuma diferença estatística foi encontrada para uma memória de vinte e um dias de idade, na memória de curta duração pós-reativação ou quando a administração de ANI se deu no HV. Desse modo, o efeito da ANI foi restrito a uma janela temporal inferior a 6 h, dependente da reativação e da idade da memória, e possivelmente dependente do HD. Em conjunto esses resultados sugerem que a ANI prejudicou a reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ. Adicionalmente, acredita-se que ao passo que esta memória se torne remota a responsabilidade de processamento é transferida do HD para outras estruturas cerebrais. Assim, o presente estudo sugere a possibilidade da utilização do LCE como ferramenta para estudo da etapa de reconsolidação da memória.

Palavras-chave: Anisomicina; Ansiedade; Hipocampo; Memória; Reconsolidação.

ABSTRACT

In rodents, prior elevated plus-maze (EPM) experience compromises the anxiolytic effects of several drugs, including midazolam (MDZ), in a subsequent exposure. The retrieval of the memory acquired during the first trial seems to be the most comprehensive explanation for this phenomenon. The hippocampus comprises the dorsal (DH) and ventral regions (VH) and is implicated with cognitive and emotional processing. Activity in DH was shown to be required for consolidating the memory related to behavioral MDZ tolerance. It has also been reported the involvement of the hippocampus in memory reconsolidation in several behavioral paradigms, a process relying on protein synthesis that occurs after the memory reactivation. However, the hippocampus's role in the memory reconsolidation of the MDZ tolerance remains unknown. The aim of this study was to evaluate the relative contribution of DH and VH to reconsolidate the memory related to MDZ tolerance. Male Wistar rats were exposed three times to EPM, received bilateral anisomycin (ANI; 80 μ g) infusions, a protein synthesis inhibitor, after the trial 2 and MDZ intraperitoneally (0.5 mg/kg) 30 min prior trial 3. We reported that ANI was able to disrupt one and seven days-old memory when administered in DH immediately, but not 6 h, after retrieval. This effect persist for at least one-week, but only if the memory is reactivated. No statistical difference was found for twenty-one days-old memory, short term memory post-reactivation and when ANI was administered in VH. Importantly, this ANI effect is dependent on memory reactivation, restricted to time window of less than 6 h, dependent on memory age, and is possibly DH dependent. Together these results suggest that ANI impaired the memory reconsolidation of the memory related to MDZ tolerance. It is also believed that over time the processing of this memory is transferred from the DH to other brain structures. The present study thus points out EPM as a tool for memory reconsolidation research.

Keywords: Anisomycin; Anxiety; Hippocampus; Memory; Reconsolidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência temporal dos principais eventos celulares e moleculares envolvidos no processamento da consolidação e reconsolidação da memória de longa duração.....	33
Figura 2. Diagrama hipocampal de rato	38
Figura 3. Protocolo utilizado para a avaliação da curva dose-resposta do midazolam (MDZ) em ratos expostos ao LCE.....	47
Figura 4. Protocolo utilizado para a avaliação da influência da experiência prévia ao LCE sobre os efeitos do MDZ.....	48
Figura 5. Esquema do protocolo utilizado no experimento 3: Efeitos da anisomicina intra-HD sobre a tolerância ao MDZ expressa durante a terceira exposição ao LCE.....	49
Figura 6. Esquema do protocolo utilizado no experimento 4: Efeitos da anisomicina intra-HV sobre a tolerância ao MDZ expressa durante a terceira exposição ao LCE.....	49
Figura 7. Esquema do protocolo utilizado no experimento 5: Avaliação da inibição da síntese proteica em animais sem a reativação da memória	50
Figura 8. Esquema do protocolo utilizado no experimento 6: Efeitos da anisomicina intra-HD 6 h após a segunda exposição ao LCE sobre a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição	51
Figura 9. Esquema do protocolo utilizado no experimento 7A: Análise do efeito de curto prazo da inibição da síntese proteica no HD após a reativação.	51
Figura 10. Esquema do protocolo utilizado no experimento 7B: Análise do efeito de longo prazo da inibição da síntese proteica no HD após a reativação.	52

Figura 11. Esquema do protocolo utilizado no experimento 8A: Avaliação da inibição da síntese proteica em uma memória de 7 dias	53
Figura 12. Esquema do protocolo utilizado no experimento 8A: Avaliação da inibição da síntese proteica em uma memória de 21 dias	53
Figura 13. Diagramas de cortes coronais do cérebro de ratos mostrando os sítios de injeção no HD e HV	55
Figura 14. Curva dose-resposta do midazolam em ratos testados no labirinto em cruz elevado	58
Figura 15. Influência da experiência prévia ao labirinto em cruz elevado sobre a resposta comportamental do midazolam.	59
Figura 16. Anisomicina intra-HD imediatamente após a segunda exposição ao LCE previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição.	61
Figura 17. Anisomicina intra-HV não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE.....	63
Figura 18. A prevenção da tolerância ao midazolam produzida pela anisomicina no HD depende da reativação da memória.	65
Figura 19. Infusão tardia de anisomicina no HD não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição.....	67
Figura 20. ANI não prejudica a memória de curta duração pós-reativação, indicada pela tolerância ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE.	69
Figura 21. Anisomicina produz um prejuízo duradouro na reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ	71
Figura 22. Anisomicina previne a tolerância ao MDZ em uma memória de 7 dias.	73

Figura 23. Anisomicina não previne a tolerância ao MDZ em uma memória de 21 dias.74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes comportamentais em roedores nos quais a reconsolidação da memória tem sido reportada	35
Tabela 2. Perfil comportamental durante a quarta exposição ao LCE	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EA	-	Porcentagem de entradas nos braços abertos
%TA	-	Porcentagem de tempo nos braços abertos
AMPA	-	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ANI	-	Anisomicina
ANOVA	-	Análise de variância
BDZ	-	Benzodiazepínico
°C	-	Graus Celsius
CA	-	Corno de Amón, região hipocampal
CB1	-	Receptor canabinoide do tipo 1
cm	-	Centímetros
CN	-	Contexto neutro
d	-	Dias
D1	-	Receptor dopaminérgico do tipo 1
DVD	-	do inglês, <i>digital versatile disk</i>
EF	-	Entradas nos braços fechados
EPM	-	Erro padrão da média
ERK	-	do inglês, <i>extracellular signal regulated kinase</i>
EUA	-	Estados Unidos da América
g	-	Grama
h	-	Horas
HCl	-	Ácido clorídrico
HD	-	Hipocampo dorsal
HI	-	Hipocampo intermediário
HV	-	Hipocampo ventral
i.p.	-	Intraperitoneal
ISP	-	Inibidor de síntese proteica
kg	-	Quilograma
LCE	-	Labirinto em cruz elevado
MAPK	-	do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCD	-	Memória de curta duração
MDF	-	do inglês, <i>medium density fiberboard</i>
MDZ	-	Midazolam
MEK	-	MAPK ERK quinase
mg	-	Miligrama
min	-	Minutos
MK 801	-	[5R,10S]-[+]-5-metil-10,11- dihidro-5H- dibenzo[<i>a,d</i>]ciclohepteno-5,10-imina
mL	-	Mililitro
MLD	-	Memória de longa duração

Mm	-	Milímetro
Mtor	-	Proteína alvo de ripamicina em mamíferos
N	-	Normal
N	-	Tamanho amostral
n ^o	-	Número
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NMDA	-	N-metil-d-aspartato
OTT	-	do inglês, <i>one trial tolerance</i>
P	-	Nível descritivo
PAR	-	Posturas de avaliação de risco
PBS	-	do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
pH	-	Potencial de hidrogeniônico
PKA	-	Proteína quinase A
PKC	-	Proteína quinase C
RNAm	-	Ácido ribonucleico mensageiro
S	-	Segundos
TPE	-	Tolerância à primeira exposição
µg	-	Micrograma
µl	-	Microlitro
µm	-	Micrômetro
VEI	-	Veículo
v/v	-	Volume por volume
W	-	Watts
Zif 268	-	do inglês, <i>zinc finger transcript factor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Labirinto em cruz elevado.....	27
1.2 Neurobiologia da memória.....	31
1.2.1 Reconsolidação da memória	32
1.3 Hipocampo	36
1.3.1 Processos cognitivos e o hipocampo.....	39
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3. METODOLOGIA	43
3.1 Considerações éticas	43
3.2 Animais	43
3.3 Drogas	43
3.4 Cirurgia estereotáxica e microinjeção hipocampal	44
3.5 Teste comportamental	45
3.5.1 Labirinto em cruz elevado.....	45
3.6 Análise comportamental.....	46
3.7 Protocolo experimental	47
3.7.1 Experimento 1: Curva dose-resposta do midazolam (MDZ) em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE).....	47
3.7.2 Experimento 2: Influência da experiência prévia ao LCE sobre os efeitos comportamentais do MDZ.....	47

3.7.3 Experimento 3: Efeitos da anisomicina intra-HD sobre a tolerância ao MDZ expressa durante a terceira exposição ao LCE.....	48
3.7.4 Experimento 4: Efeitos da anisomicina intra-HV sobre a tolerância ao MDZ expressa durante a terceira exposição ao LCE.....	49
3.7.5 Experimento 5: Avaliação da inibição da síntese proteica em animais sem a reativação da memória	50
3.7.6 Experimento 6: Efeitos da anisomicina intra-HD 6 h após a segunda exposição ao LCE sobre a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição	50
3.7.7 Experimento 7: Análise do efeito de curto e longo prazo da inibição da síntese proteica no HD após a reativação	51
3.7.8 Experimento 8: Avaliação dos efeitos da ANI no HD em uma memória de 7 e 21 dias	52
3.8 Análise histológica dos sítios de injeção	54
3.9 Análise estatística	56
4 RESULTADOS	57
4.1 Experimento 1: Efeitos do midazolam em ratos testados no LCE	57
4.2 Experimento 2: Ratos são tolerantes ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE.....	57
4.3 Experimento 3: Anisomicina intra-HD imediatamente após a segunda exposição ao LCE previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição	60
4.4 Experimento 4: Anisomicina intra-HV imediatamente após a segunda exposição ao LCE não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição.....	62

4.5 Experimento 5: A prevenção da tolerância ao MDZ produzida pela ANI no HD depende da reativação da memória	64
4.6 Experimento 6: Infusão tardia de ANI no HD não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE	66
4.7 Experimento 7: A prevenção da tolerância ao MDZ produzida pela ANI intra-HD é dependente do intervalo de tempo entre a infusão central e a re-exposição ao LCE	68
4.8 Experimento 8: A participação do HD na reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ varia de acordo com a idade da memória.....	72
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO A.....	106
ANEXO B.....	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos mais populares entre os testes para o estudo da ansiedade experimental (HALLER; ALICKI, 2012). Embora primariamente seja utilizado como um teste comportamental pré-clínico útil à triagem de drogas com potencial efeito ansiolítico (CALABRESE, 2008), é notável a utilidade do LCE como ferramenta para a investigação das bases biológicas da emoção, nas quais, é possível analisar o efeito comportamental de manipulações genéticas e/ou farmacológicas (ADAMEC et al., 1998; FILE et al., 1998; LAMPREA et al., 2000; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; RASMUSSEN et al., 2001; BANNERMAN et al., 2004). Adicionalmente, permite o estudo sobre as áreas cerebrais relacionadas a medo e ansiedade em ratos e camundongos (TREIT; MENARD, 1997; FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998; ANDRADE et al., 1999; LACROIX et al., 2000; ADAMEC; BLUNDELL; COLLINS, 2001; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; JARDIM; GUIMARAES, 2001; ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2003). O uso frequente do LCE está diretamente ligado às vantagens que esse teste oferece, tais como: preço, rapidez, sensibilidade à drogas ansiolíticas e ansiogênicas. Além disso, não há a necessidade de treino, privação de água/comida, ou utilização de choque elétrico (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

O LCE foi desenvolvido em 1984 por Handley e Mithani baseado nos trabalhos iniciais de Montgomery (1955), os quais descreviam as relações entre o medo induzido pela novidade e o comportamento exploratório de roedores (ROY et al., 2009). No ano seguinte (1985), o teste foi validado para ratos (PELLOW et al., 1985) e dois anos depois para camundongos (LISTER, 1987; LISTER, 1990), por meio do uso de abordagens fisiológicas, farmacológicas e comportamentais.

Fisicamente, o LCE consiste de quatro braços elevados do solo, dispostos perpendicularmente entre si, dos quais dois não possuem paredes laterais (são abertos) enquanto os dois fechados possuem. Uma plataforma central, na qual o animal é alocado no início da exposição, dá acesso a qualquer um dos braços (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

A presença de dois ambientes com níveis contrastantes de aversividade gera no animal um conflito esquiva-aproximação, no qual a aproximação é derivada do comportamento exploratório em situação de novidade enquanto a esquiva é resultado do componente aversivo

(braços abertos) (ROY et al., 2009). Ratos ou camundongos expostos ao LCE exploram quantitativamente mais os fechados quando comparados com os abertos. Assim é possível medir parâmetros que revelam a aversão natural de roedores a espaços abertos.

As drogas ansiolíticas alteram o equilíbrio da situação de conflito e como resultado comportamental os animais exploram mais os braços abertos quando comparado com o grupo controle. Nesse sentido, é possível observar a sensibilidade do LCE principalmente à drogas que atuam nos sistemas benzodiazepínico/GABAérgico (CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001). O tratamento com midazolam (MDZ), um benzodiazepínico, por exemplo, aumenta a porcentagem de tempo (%TA) e entradas (%EA) nos braços abertos, reduz os comportamentos de avaliação de risco (PAR), sem alterar a atividade exploratória geral (representada pelo número de entradas nos braços fechados (EF)) (RODGERS et al., 1995). Por outro lado, drogas ansiogênicas reduzem %TA e %EA e/ou aumentam comportamentos relacionados à avaliação de risco (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Outras classes de fármacos, quando administrada em roedores, também produzem um aumento da exploração dos braços abertos do LCE tais como bloqueadores dos receptores α e β adrenérgicos, etanol, barbitúricos, drogas serotoninérgicas (HANDLEY; MITHANI, 1984; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a; PINHEIRO *et al.*, 2007; STERN et al., 2008; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2011), entre outras.

Estudos realizados com o LCE mostram que a experiência prévia no teste altera as respostas comportamentais e farmacológicas em exposições subsequentes (FILE, 1990; LISTER, 1990). Além disso, a experiência prévia ao LCE reduz, ou mesmo abole, o efeito ansiolítico dos BDZs (efeito também visto para outras drogas tais como: barbitúricos, etanol, MK 801) a partir da segunda exposição ao aparato (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Esse fenômeno foi caracterizado em 1990 por File e denominado “tolerância à primeira exposição” (TPE, do inglês “*one trial tolerance – OTT*”). Cabe ressaltar que a TPE parece ocorrer independente do estado farmacológico durante a primeira exposição, do intervalo entre as exposições e da característica material do LCE (FILE, 1990; RODGERS; SHEPHERD, 1993).

Adicionalmente, foi observado que durante o primeiro minuto da exposição ao LCE os ratos realizam altos níveis de avaliação de risco, com o objetivo de obter informações do ambiente (RODGERS et al., 1995), após isso, no entanto, demonstram alta preferência pelos braços fechados.

No intuito de justificar a ocorrência da TPE, várias hipóteses têm sido propostas, dentre as quais se destacam: uma sensibilização do medo (RODGERS; SHEPHERD, 1993), alteração no sítio de ligação de BDZ (FILE et al., 1992; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002b), habituação locomotora (DAWSON et al., 1994), além de uma mudança qualitativa da natureza da resposta aversiva entre as exposições de uma resposta incondicionada para uma esQUIVA aprendida (HOLMES; RODGERS, 1998).

Em 1990, File, Mabbutt e Hitchcott sugeriram que o fator decisivo para o desenvolvimento da TPE seria a experiência nos braços abertos, Holmes e Rodgers (1999) destacam a experiência nos braços fechados. Já Bertoglio e Carobrez (2000), apontam que o fator chave para o processo de esQUIVA aprendida seria a existência dos dois ambientes com níveis contrastantes de aversão. De fato, a presença do conflito esQUIVA/aproximação durante a primeira exposição é que permite o efeito ansiolítico dos BDZs (por exemplo), porém a experiência prévia indica ao animal a presença de um local potencialmente aversivo (braço aberto) levando o mesmo a se esQUIVAR deste ambiente (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007).

Cabe ressaltar que, em algumas situações, os animais (ratos/camundongos) continuam a expressar um perfil comportamental de exploração dos braços abertos durante a segunda exposição. Dentre elas: alteração na duração da primeira ou da segunda exposição para 10 min (FILE et al., 1993) ou a redução da primeira exposição para 1 min (DAL-COL et al., 2003); introdução de um novo conflito motivacional (PEREIRA et al., 1999; ANDREATINI; VITAL; SANTOS, 2003); a administração, antes da primeira exposição, de uma dose considerada amnésica de clordiazepóxido (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990), escopolamina (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004) ou propranolol (STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008), interpretados como prejuízo na aquisição da memória; inativação temporária do córtex pré-frontal com cobalto (STERN et al., 2010) antes da segunda exposição, ou ainda, inativação temporária com lidocaína da região dorsomedial do hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral ou porção dorsal do hipocampo, antes da segunda exposição (FILE; GONZALEZ; CALLANT, 1999; BERTOGLIO et al., 2005; BERTOGLIO, JOCA; GUIMARAES, 2006), sendo esses interpretados como prejuízo no processo evocação da memória adquirida durante a primeira exposição.

Corroborando a ideia da participação mnemônica no desenvolvimento da TPE, a administração sistêmica de pentilenotetrazol

ou anfetamina pós-teste aumenta a retenção da memória e facilita o desenvolvimento da TPE (VARGAS, DA CUNHA, ANDREATINI, 2006). O mesmo perfil foi encontrado com a administração após a primeira exposição de D-cicloserina, um agonista parcial do sítio de glicina (RODGERS et al., 2011), no qual os autores sugerem uma facilitação do processo de consolidação. A inativação temporária com lidocaína da amígdala basolateral (FILE, GONZALES; CALLANT, 1998) ou inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal (GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011) após o teste também impedem o desenvolvimento da TPE, sugerindo que o prejuízo na consolidação dessa memória seria fundamental para o estabelecimento deste estado. Em conjunto esses dados sugerem que a aprendizagem e a memória desempenham um papel importante no desenvolvimento da TPE, não excluindo as demais hipóteses, mas, complementando-as.

Em particular, a participação da síntese proteica na porção dorsal do hipocampo após a primeira exposição chama a atenção para o papel dessa região na consolidação da memória relacionada com a tolerância comportamental ao efeito de ansiolíticos durante a segunda exposição. Mesmo sabendo o papel dessa região na reconsolidação de diversos tipos de memória de cunho espacial/emocional (FRANKLAND et al., 2006; MORRIS et al., 2006; ROSSATO et al., 2006), a função do hipocampo dorsal nos processos relacionados à reconsolidação da memória que estaria envolvida com a tolerância à drogas ansiolíticas no LCE ainda não foi investigada.

1.2 Neurobiologia da memória

Embora na maioria das vezes utilizados como sinônimos, os termos aprendizado e memória descrevem conceitos que, apesar de estarem intimamente relacionados, não são equivalentes. De fato, se pode dizer que aprendizado seria uma alteração relativamente permanente no comportamento que ocorre como consequência da prática ou da experiência. Assim, fica claro que o aprendizado envolve a aquisição de novas informações bem como o estabelecimento de relações associativas ou não, entre informações pré-existentes (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000), enquanto que a memória seria o produto do aprendizado (IZQUIERDO et al., 1999).

Partindo dessa definição, é claro que nem todas as memórias são iguais, podendo ser classificadas de acordo com o tempo que perduram. Por esse ponto de vista, existem dois tipos de memórias: as memórias de curta duração (MCD) e as memórias de longa duração (MLD) (IZQUIERDO, 2011). As MCD são aquelas que permitem manter ativa uma pequena quantidade de informação e de fácil acesso, perdurando minutos ou horas (MCGAUGH, 2000), fisiologicamente se manteriam até que as MLD fossem estabilizadas. Já as MLD são aquelas que contêm diversas informações altamente conectadas as quais se encontram armazenadas de maneira mais ou menos permanente, podendo ser classificadas em implícitas ou explícitas (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000).

As memórias implícitas (ou memórias procedurais) são aquelas relacionadas à aquisição de habilidades mediante a repetição de uma atividade que segue o mesmo padrão. A capacidade assim adquirida não depende da consciência. Nessa classificação incluem as habilidades intelectuais, motoras e sensitivas. Já as memórias explícitas (ou declarativas) são aquelas relacionadas a fatos levados ao nosso conhecimento através dos sentidos, como associação de dados, criação de ideias e dedução. Esse tipo de memória se processa ao nível consciente através de proposições verbais, sonoras, visuais, etc. As memórias explícitas podem ser adquiridas por meio da vivência (memória episódica) ou por meio da transmissão do saber de forma escrita, visual e sonora (memória semântica) (IZQUIERDO, 2011; PURVES et al., 2004).

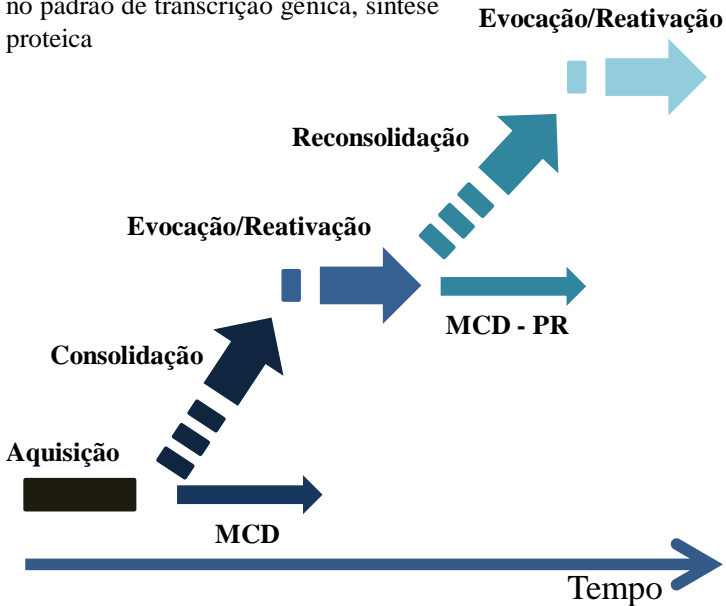
Independente da natureza da MLD sugere-se uma via comum de processamento; após o aprendizado (aquisição) o novo traço mnemônico é progressivamente estabilizado em um processo denominado consolidação e que do ponto de vista bioquímico envolve a ativação de uma série de cascatas de sinalização intracelular e a síntese proteica em várias regiões do encéfalo, um processo ordenado e sequencial (NADEL; HARDT, 2011). Esses eventos modulam a funcionalidade neuronal, promovem o estabelecimento de novas conexões sinápticas, fortalecem algumas conexões já existentes e convertem um traço lábil em uma MLD estável (MCGAUGH, 2000).

1.2.1 Reconsolidação da memória

Embora desde 1968, Misanin e colaboradores apontam evidências de que, após serem evocadas, as MLD se tornavam susceptíveis a um tratamento amnésico, choque elétrico por exemplo (MISANIN; MILLER; LEWIS, 1968), por muitos anos acreditou-se que uma memória consolidada seria imutável. Apesar de inicialmente descartadas, as ideias de Misanin tem sido retomadas em função de evidências convergentes que demonstram que, após a evocação, as MLD se tornam lábeis e, para persistir, necessitam de reestabilização, um processo que envolve síntese proteica e é denominado de reconsolidação (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000; SARA, 2000; NADER, 2003; EISENBERG; DUDAI, 2004). Um esquema geral do processamento da memória pode ser visualizado na figura 1.

Aquisição: potenciais de ação, sincronismo neuronal, integração de sinais entre áreas sensoriais, associativas e motoras

Consolidação: ativação de receptores NMDA, transdução de sinal, mudança no padrão de transcrição gênica, síntese proteica



Evocação: localização, decodificação e expressão do traço mnemônico armazenado, degradação proteica.

Reconsolidação: reestabilização do traço mnemônico, expressão de *Zif268*, síntese de proteínas

Figura 1. Sequência temporal dos principais eventos celulares e moleculares envolvidos no processamento da consolidação e reconsolidação da memória de longa duração. MCD – memória de curta duração; MCD-PR – memória de curta duração pós-reativação (Adaptado de Frankland e Bontempi, 2005; Tronson e Taylor, 2007; Lee et al., 2008; Nadel et al., 2012).

No ano de 200, Nader e colaboradores demonstraram que a infusão intra-amígdala de um inibidor de síntese proteica após a evocação de uma resposta de medo condicionada ao som, é capaz de induzir amnésia permanente. Aliado ao fato de que esse efeito não foi observado sem a reativação da memória, ou quando a droga foi administrada 6 h após a reativação, revelam que uma memória já consolidada, ao ser reativada entra em um período lábil e que, para persistir, requer um processo dependente de síntese proteica que ocorre em uma janela limitada de tempo após a reativação. Após essa publicação, diversos grupos de pesquisa foram capazes de reproduzir esses resultados em diferentes paradigmas comportamentais e com o uso de diferentes agentes amnésicos (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; EISENBERG et al., 2003; LEE et al., 2004; INDA et al., 2005). Alguns exemplos estão sumarizados na tabela 1.

Considerando a complexidade do processo mnemônico, não é de se esperar que uma única estrutura cerebral controle todas as fases do processamento das memórias. De fato, existe um sistema múltiplo de estruturas envolvidas de maneira distinta conferindo alta interação entre estruturas límbicas e ação modulatória hormonal, que resultam no processamento mais intenso, detalhado e duradouro (PACKARD; CAHILL, 2001; IZQUIERDO, 2011). Nesse contexto, embora não se possa negar o papel central do complexo amigdalóide no processamento mnemônico, é evidente a sua relação bi-direcional com outras estruturas encefálicas tais como: córtex pré-frontal, córtex sensorial, córtex entorrinal, o estriado e o sistema hipocampal (LABAR; CABEZA, 2006).

Tabela 1. Testes comportamentais em roedores nos quais a reconsolidação da memória tem sido reportada.

Paradigma Comportamental	Agente Farmacológico	Referência
Aprendizado espacial	Antagonista NMDA	1
	Antagonista β -adrenérgico	2
	Inibidor da PKC	3
	Inibidor da síntese de RNAm	4
	ISP	5, 6, 7, 8
Aprendizado motivado	Inibidor de proteossoma	9
	Antagonista NMDA	10
	Antagonista β -adrenérgico	11
Aversão condicionada ao paladar	ISP	12
	Agonismo/antagonismo CB1	13
	Inibidor de MEK	14
Discriminação olfativa	ISP	15
	Antagonista NMDA	16
Habilidade motora	ISP	17
	ISP	18
Reconhecimento de objetos	Antagonista NMDA	19, 20
	Antagonista D1	21
	Antagonista β -adrenérgico	22
	Inibidor de MEK	23
	ISP	24
	Inibidor de mTOR	25

Legenda: CB1 – receptor canabinoide do tipo 1; D1 – receptor dopaminérgico do tipo 1; ISP – inibidor da síntese proteica; MEK – MAPK ERK quinase ; mTOR – proteína alvo de rapamicina em mamíferos; NMDA – receptor n-metil-d-aspartato, receptor glutamatérgico; PKC – proteína quinase C; RNAm – ácido ribonucleico mensageiro.

Referência: 1- KIM; MOKI; KIDA, 2011; 2- PRZYBYSLAWSKI; ROULLET; SARA, 1999; 3- BONINI et al., 2007; 4- DA SILVA et al., 2008; 5- ARTINIAN et al., 2007; 6- MORRIS et al., 2006; 7- ROSSATO et al., 2006; 8-SUZUKI et al., 2004; 9- ARTINIAN et al., 2008; 10- LEE; EVERITT, 2008; 11- MILTON; LEE; EVERITT, 2008; 12- WANG et al., 2005; 13- KOBILO; HAZVI; DUDAI, 2007; 14- LANGUILLE et al., 2009; 15- GRUEST; RICHER; HARS, 2004; 16- TORRAS-GARCIA et al., 2005; 17- GOTTHARD; KNOPPEL, 2010; 18- PENG; LI, 2009; 19- AKIRAV; MAROUN 2006; 20-WINTERS; TUCCI; DACOSTA-FURTADO, 2009; 21- MAROUN; AKIRAV, 2009; 22- MAROUN; AKIRAV, 2008; 23- MAROUN; AKIRAV, 2008; 24- ROSSATO et al., 2007; 25-WINTERS et al, 2011

1.3 Hipocampo

A formação hipocampal é composta do hipocampo propriamente dito, giro denteado, complexo subicular e córtex entorrinal (AMARAL; WITTER, 1989). No início do século XX a citoarquitetura básica do hipocampo foi estabelecida por Santiago Ramon y Cajal e Raphael Lorente de Nó. Nesse sentido foi cunhada nomenclatura e divisão do hipocampo em regiões CA1, CA2, CA3 (abreviação de “Corno de Amon”) (LORENTE DE NÓ; 1934 *apud* O’KEEFE; NADEL, 1978; RAMON Y CAJAL; 1911 *apud* ANDERSEN et al., 2007).

Com relação às conexões, a formação hipocampal mantém um padrão altamente organizado denominado “via trissináptica”, estabelecida como a circuitaria clássica da comunicação hipocampal. As aferências neocorticais alcançam a formação hipocampal através do córtex entorrinal. As células das camadas superficiais dessa estrutura dão origem a axônios que se projetam para várias estruturas, incluindo o giro denteado. O córtex entorrinal é considerado o primeiro passo da circuitaria intrínseca do hipocampo. As fibras musgosas são axônios oriundos do giro denteado, que se conectam com as células piramidais da região CA3 do hipocampo. As células piramidais da CA3 são a principal fonte de aferência para a região CA1 do hipocampo, conexão denominada de via colateral de Schaffer. Outras conexões também fazem parte desse processo incluindo: uma via perforante originada no córtex entorrinal que se projeta para o giro denteado e para a região CA3, outra via que se projeta para a região CA1 e o subículo. Adicionalmente, existe interconexão entre a região CA1 e as camadas mais profundas do córtex entorrinal (para revisão, ver O’KEEFE; NADEL, 1978; NEVES; COOKE; BLISS, 2008).

Evidências têm demonstrado o papel do hipocampo na modulação de memórias espaciais e não espaciais (CZERNIAWSKI; YOON; OTTO, 2009). Embora existam relatos de que as sub-regiões do hipocampo trabalhem em conjunto para a formação do traço mnemônico, a literatura sugere diferença funcional e anatômica ao longo do eixo dorsoventral (MOSER; MOSER, 1998; RICHMOND et al., 1999; BANNERMAN et al., 2004).

Anatomicamente, o hipocampo pode ser dividido em dorsal (HD) e ventral (HV), no qual o primeiro compreende dois terços (posicionado rostralmente) de todo o hipocampo enquanto o segundo compreende o

terço restante (posicionado no sentido caudal) (Fig. 2) (AMARAL; WITTER, 1989). Cabe ressaltar que, embora anatomicamente descrita na década de 70 (O'KEEFE; NADEL, 1978), estudos mais recentes confirmam a funcionalidade de uma região intermediária, o hipocampo intermediário (HI) (RUEDIGER et al., 2012). As porções hipocampais demonstram diferenças ao longo do eixo dorso-ventral com relação à organização neuronal, conexões aferentes e eferentes, funcionalidade, expressão gênica e aspectos moleculares (THOMPSON et al., 2008; FANSELOW; DONG, 2010; RUEDIGER et al., 2012).

O HD, por exemplo recebe via córtex entorrinal medial, informações oriundas dos córtices visual, auditório e dos córtices sensoriais primário e secundário (MOSER; MOSER, 1998). Ele apresenta também conexões com os córtices retrosplenial e cíngulo anterior, estruturas envolvidas basicamente com funções cognitivas como navegação espacial (CENQUIZCA; SWANSON, 2007). Além disso, através de vias indiretas, o HD faz conexão com o córtex pré-frontal, HV e amígdala (FANSELOW; DONG, 2010), o que justificaria sua função nos processos relacionados às memórias emocionais. Já o HV apresenta conexão com o bulbo olfatório, córtex piriforme, amígdala, hipotálamo, córtices infra-límbico e pré-límbico (conectividade bidirecional para os dois últimos) (PITKANEN, 2000; FANSELOW; DONG, 2010). Sabe-se ainda que, as células das regiões CA1 ou CA3 podem se comunicar entre si ao longo do eixo dorso-ventral. Sugere-se ainda que a comunicação entre células da região CA3 ao longo desse eixo é altamente organizada e exista comunicação tanto entre células mais proximais quanto distais. Adicionalmente, a ampla distribuição de fibras colinérgicas nas regiões dorsal e ventral suportaria a conexão entre as mesmas (embora haja também fibras noradrenérgicas, serotoninérgicas, dopaminérgicas e fibras de passagem) (SETHY et al., 1973 *apud* O'KEEFE; NADEL, 1978). Além disso, existe comunicação entre HD e HV de modo indireto, no qual ambos enviam projeções bidirecionais para outras estruturas tais como, subículo, córtex entorrinal e septo lateral (ANDERSEN et al., 2007).

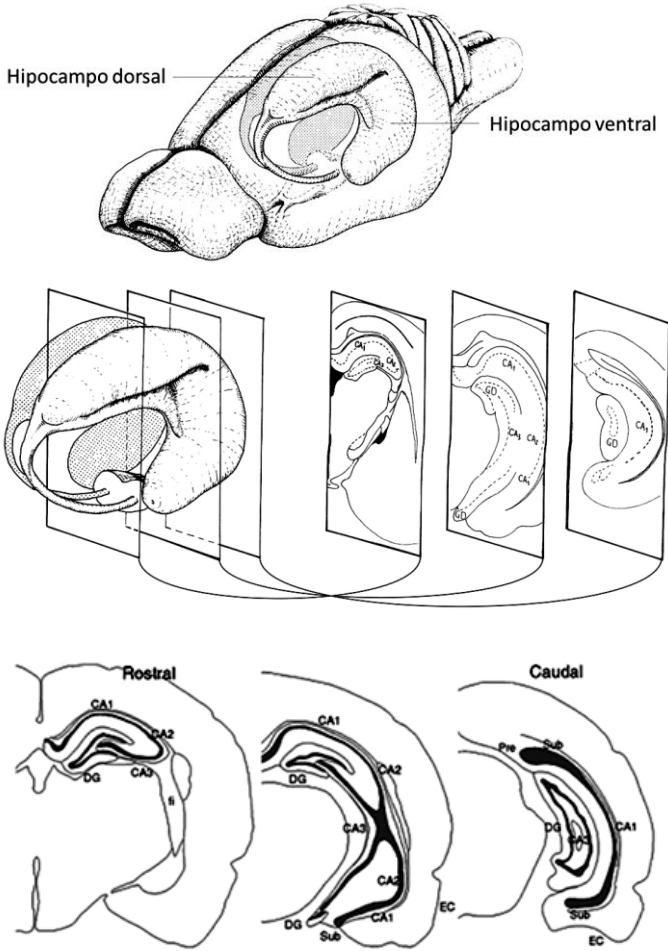


Figura 2. Diagrama hipocampal de rato. (A) Distinção anatômica das sub-regiões hipocâmpais e (B) seções coronais ao longo do eixo rostrocaudal do hipocampo (Adaptado de CHEUNG; CARDINAL, 2005).

1.3.1 Processos cognitivos e o hipocampo

Consistente com as diferenças neuroanatômicas, estudos de neuropsicofarmacologia e eletrofisiologia indicam uma diferença funcional entre o HD e o HV (CZERNIAWSKI; YOON; OTTO, 2009). Assim, demonstram a participação do HD, mas não do HV, em paradigmas de aprendizado e memória. Por exemplo, lesões no HD têm sido correlacionadas a prejuízos em testes relacionados a memórias espaciais, com o dano proporcional à magnitude da lesão (MOSER; MOSER; ANDERSON, 1993). Em contraste, o HV parece desempenhar um papel em uma variedade de testes relacionados à ansiedade (ROGERS; HUNSAKER; KESNER, 2006; YOON; OTTO, 2007).

Embora as funções espaciais e emocionais pareçam ser dissociadas no hipocampo, essas diferenças não são claras quando se trata de memórias emocionais (CZERNIAWSKI; YOON; OTTO, 2009). Mesmo sendo evidente a participação do HD na aquisição e expressão do medo condicionado (BURMAN; STARR; GEWIRTZ, 2006), lesões no HV também impedem ambos os processos (YOON; OTTO, 2007).

Utilizando o condicionamento de medo contextual, Bast e colaboradores (2001) observaram uma diminuição da expressão de congelamento após o condicionamento quando inativado o HV com tetrodotoxina e muscimol, indicando a participação dessa estrutura na formação da memória. Nesse sentido, Mishima e colaboradores (2000) relataram prejuízo cognitivo utilizando o labirinto radial de oito braços após a administração de escopolamina no HV de ratos. Carballo-Márquez e colaboradores (2009) demonstraram que o antagonismo muscarínico no HV prejudicou a consolidação inicial de uma memória não espacial. Também foi observada a participação dos receptores histaminérgicos do HV na modulação da consolidação de uma memória de esquila ativa em ratos (ALVAREZ, BANZAN, 2008). Por meio de lesão com ácido ibotênico foi relatado o papel do HV e não do HD no aprendizado de uma memória de trabalho relacionada a odor (KESNER; HUNSAKER; ZIEGLER, 2011).

Rudy e Matus-Amat (2005) relatam que tanto a inativação do HV com muscimol antes do condicionamento quanto injeção de anisomicina (ANI) (tanto antes quanto depois do condicionamento contextual) são capazes de prejudicar a formação de uma memória contextual. Esse último relato chama a atenção para a participação de síntese proteica no HV relacionada a processos cognitivos.

No entanto, vale ressaltar que em relação a aspectos de cunho espacial, o HD tem sido extensamente correlacionado, existindo relatos da participação dessa estrutura em eventos como: aquisição e evocação de memórias (NADEL; HARDT, 2011), consolidação (IZQUIERDO; MEDINA, 1997) e reconsolidação (ROSSATO et al., 2007). Sendo vista a participação do HD nos processos mnemônicos em diversos paradigmas comportamentais como o labirinto aquático (MOSEER et al., 1995), medo contextual (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001), protocolo teste e reteste no labirinto em cruz elevado (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARAES, 2006; GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011) entre outros.

A obtenção de prejuízo de desempenho após o uso de inibidores de síntese proteica (ISP) intra-HD após a reativação da memória tem demonstrado o importante papel desse processo bioquímico na estabilização da memória reativada em diversos paradigmas comportamentais. Os ISP, como por exemplo a ANI são capazes de se ligar à subunidade maior do ribossomo de eucariotos e impedir a formação da ligação peptídica, através da inibição da enzima peptidil transferase (ALBERINI, 2008). Assim, a ANI tem sido uma ferramenta útil no estudo da neurobiologia da memória (RUDY et al., 2006), inclusive sobre a reconsolidação, conforme demonstrado no condicionamento de medo contextual (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; FRANKLAND et al., 2006), condicionamento traço de medo (RUNYAN; DASH, 2005), labirinto aquático (MORRIS et al., 2006; ROSSATO et al., 2006) e reconhecimento de objetos (ROSSATO et al., 2007).

O prejuízo de uma memória pode ser de grande valia quando se trata de memórias relacionadas a processos patológicos tais como: a dependência à drogas e o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (YEHUDA; JOELS; MORRIS, 2010). A TEPT é caracterizada incapacidade de extinção de uma memória traumática seguida de respostas fisiológicas inadequadas, é uma doença crônica e debilitante (PARSONS; RESSLER, 2013). Nos últimos anos diversos grupos de pesquisa tem se dedicado a estudar a terapias e/ou tratamentos para a TEPT (PRATCHETT et al., 2011). O prejuízo na reconsolidação dessa memória parece ser uma alternativa (YEHUDA, 2002). Recentemente Suris e colaboradores (2013) observaram que a administração de *Sirolimus*, um inibidor de síntese proteica, diminuiu os sintomas relacionados ao TEPT em ex-combatentes de guerra, sugerindo um prejuízo na reconsolidação dessa memória.

A impossibilidade de injetar uma droga em uma região específica do cérebro humano, ou ainda, a toxicidade de alguns agentes, constituem fatores que não permitem uma ligação direta entre os resultados obtidos em roedores e a prática clínica. No entanto a pesquisa pré-clínica oferece um esclarecimento sobre os mecanismos moleculares de um dado processo resultando em um direcionamento para estudos clínicos (YEHUDA, 2011).

Considerando o exposto acima, novos protocolos para o estudo da etapa da reconsolidação poderiam oferecer informações adicionais sobre a neurobiologia da memória em roedores. Desse modo, seria interessante investigar o papel da síntese proteica no hipocampo sobre o comportamento de tolerância ao MDZ durante a terceira exposição de ratos ao LCE, uma vez que, como já demonstrado, a síntese proteica no HD é importante para a consolidação desse fenômeno. De fato, Gazarini e colaboradores (2011) demonstraram que a infusão intra-HD de ANI imediatamente após a primeira exposição ao LCE preveniu a tolerância ao MDZ durante a segunda exposição. No entanto, os efeitos sobre a reconsolidação dessa memória ainda não foram abordados.

Assumimos na presente dissertação a hipótese de que a memória aversiva formada durante a primeira exposição ao labirinto em cruz elevado ao ser reativada durante a segunda exposição se torne susceptível ao prejuízo da sua etapa de reconsolidação por meio da anisomicina. O resultado esperado seria a prevenção da tolerância ao midazolam durante a terceira exposição.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a contribuição do hipocampo dorsal para reconsolidar a memória aversiva que torna animais pré-expostos ao labirinto em cruz elevado tolerantes ao efeito ansiolítico do midazolam.

2.2 Objetivos específicos

- Confirmar a tolerância ao midazolam em animais com duas experiências prévias ao labirinto em cruz elevado.

- Avaliar a participação relativa das regiões dorsal e ventral do hipocampo na reconsolidação da memória envolvida na tolerância ao midazolam durante a terceira exposição ao labirinto em cruz elevado por meio da inibição da síntese proteica com anisomicina.

- Analisar os efeitos da administração de anisomicina intra-hipocampo dorsal: na ausência da reativação da memória e 6 h após a reativação.

- Examinar os efeitos da administração de anisomicina intra-hipocampo dorsal sobre a tolerância ao midazolam quando o intervalo entre a segunda e terceira exposição foi de 3 h ou 7 dias.

- Investigar os efeitos da administração de anisomicina no hipocampo dorsal sobre a reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao midazolam quando o intervalo entre a primeira e a segunda exposição foi de 7 ou 21 dias.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

Os procedimentos desta dissertação ocorreram após a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.009260/2011-64). Foi utilizado o mínimo de animais suficiente para a obtenção de análises estatísticas confiáveis.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* com 3 – 4 meses de idade, pesando entre 270 – 330 g, todos provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em grupos de 3 – 4 em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm), com livre acesso à água e comida. A temperatura ambiente foi mantida em 22 ± 1 °C e ciclo de luz claro/escuro de 12 h, com início às 07:00 h.

3.3 Drogas

- Anisomicina (ANI; Sigma-Aldrich, EUA): utilizada para o tratamento central na dose de 80 µg/hemisfério, dissolvida em ácido clorídrico (HCl) 1N, diluída em tampão fosfato salina (PBS) e posteriormente neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) 1N até a obtenção de pH próximo de 7,0. A dose foi escolhida com base em estudos prévios do laboratório (GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011) e na literatura que destaca prejuízo na reconsolidação da memória com doses entre 80 e 125 µg/hemisfério (VIANNA et al., 2001; DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; FRANKLAND et al., 2006; RODRIGUES-ORTIZ et al., 2008;).

- Midazolam (MDZ; Dormire®, Cristália, Brasil): foi diluído em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), utilizado no tratamento

sistêmico (*i.p.*) nas doses de 0,375 ou 0,5 mg/kg, com o volume de administração de 1,0 mL/kg.

3.4 Cirurgia estereotáxica e microinjeção hipocampal

Os ratos foram anestesiados com uma solução contendo xilazina (10 mg/mL/kg; Carlier, Brasil) e quetamina (100 mg/mL/kg; Sespo, Brasil) e após a perda total dos reflexos foram posicionados no aparelho estereotáxico. A assepsia da parte superior da cabeça foi realizada com uma solução de álcool iodado (2%), e uma solução de lidocaína 3% com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim®, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea no local da incisão. Foi realizado um corte local, com posterior raspagem do periósteo, que permitiu a visualização do crânio e das suturas lambdóide e coronal.

Após assepsia, foi fixado um parafuso de aço inoxidável no crânio dos animais, para auxiliar na posterior fixação da prótese de acrílico. Em seguida, duas cânulas-guias, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (25,0 x 7,0 mm), foram direcionadas para o HD (medindo 11,0 mm fixada 1,3 mm superior ao HD) ou para o HV (posicionada superiormente a 3,2 mm do sítio de injeção e medindo 15,0 mm de comprimento), a partir das coordenadas retiradas do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2009). As coordenadas utilizadas foram as seguintes: 3,6 mm posterior ao Bregma, 2,5 mm relativo ao eixo lateral e -2,1 mm relativo ao eixo dorsoventral para o HD; e 5,2 mm posterior ao Bregma, 5,0 mm relativo ao eixo lateral e -4,0 mm relativo ao eixo dorsoventral, para o HV.

Uma resina de acrílico odontológica auto-polimerizável de secagem rápida foi utilizada para fixar as cânulas-guia no crânio dos animais. Em seguida, para evitar obstrução, um fio de aço inoxidável (n° 30) foi inserido em cada uma das cânulas. Como tratamento pós-cirúrgico, todos os animais receberam uma solução de antibiótico contendo benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil; 1,0 ml/kg), por via intramuscular, para evitar uma possível infecção. Além disso, os ratos receberam flunixin meglumina (Schering-Plough, Brasil; 2,5 mg/kg) por via subcutânea, uma droga com propriedades analgésica, antipirética e anti-inflamatória. A seguir, foram mantidos em sala aquecida (25-27°C), no intuito de evitar hipotermia devido à anestesia, até demonstrarem deambulação na caixa moradia.

Após este, os animais foram direcionados ao biotério onde permaneceram por cinco a sete dias para recuperação.

No momento da microinjeção, o animal foi imobilizado, os fios de aço foram retirados e as cânulas-guia foram limpas com uma lima odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil), ajustada para o tamanho das cânulas. Após a limpeza e desobstrução, as agulhas de injeção (agulhas gengivais de 0,3 mm de diâmetro) foram conectadas a uma microseringa Hamilton (10 µl) por meio de um tubo de polietileno PE10 (Clay Adams, EUA), e foram inseridas dentro de cada cânula. Com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), cada animal recebeu 0,8 µl/hemisfério de anisomicina ou veículo, infundidos durante 60 s. Para o monitoramento do fluxo de injeção foi analisado o deslocamento de uma bolha de ar dentro do polietileno. As agulhas foram removidas 30 s após o fim da infusão. Considerando o cálculo descrito por Tehovnik e Sommer (1997) acredita-se que o volume de droga injetado não seja suficiente para atingir outras áreas do cérebro (0,8 µl = 200µm de raio).

3.5 Teste Comportamental

3.5.1 Labirinto em cruz elevado

O aparato consiste de um labirinto de MDF branco (EP-151, Insight, Brasil) com uma plataforma central e quatro braços, sendo dois abertos (50 x 10 cm, circundados por um anteparo de acrílico de 1 cm de altura) e dois fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm), dispostos de maneira oposta.

A sala, na qual se localiza o LCE, foi mantida com temperatura controlada (22-24°C) e iluminada com lâmpada incandescente (100 W) com intensidade (40 Lux) aferida e ajustada antes de cada experimento por meio de um luxímetro digital (MLM-1010, Minipa®, Brasil). Previamente (aproximadamente 40 min) aos experimentos, os animais foram alocados em uma antessala com as mesmas condições controladas de temperatura e luminosidade, objetivando uma ambientação.

Dependendo do protocolo os animais foram expostos ao LCE, uma, duas ou três vezes. Em todos os casos os animais permaneceram no aparato por cinco minutos e em seguida foram transferidos para outra sala, diferente do local onde estavam os animais não expostos. Antes e

após cada exposição dos animais, o labirinto foi limpo com solução de etanol (10% v/v). Todos os experimentos foram gravados em DVD (utilizado para análise posterior) por meio de uma câmera de vídeo, posicionada acima do LCE, acoplada a um monitor presente na antessala. Todos os animais foram colocados na plataforma central do LCE voltados para um dos braços fechados. Os experimentos foram desenvolvidos entre 8:00 e 11:00 h.

3.6 Análise comportamental

Durante os cinco minutos de exposição dos animais ao LCE foram analisados os seguintes parâmetros comportamentais:

- Número de entradas nos braços abertos/fechados do LCE, considerados apenas quando os animais colocavam as quatro patas em um dos braços abertos/fechados;

- Tempo de permanência nos braços abertos/fechados do LCE, quantificado com o uso de um cronômetro desde a entrada do rato em um dos braços (abertos/fechados) até que uma das patas fosse colocada na plataforma central do LCE.

- Frequência de posturas de estiramento (PAR), que foi considerada quando o animal colocou pelo menos uma pata em um dos braços abertos com conseqüente volta à posição inicial (centro ou braço fechado), comportamento este relacionado à avaliação de risco.

Dois parâmetros de exploração dos braços abertos foram calculados a partir dos dados coletados durante os cinco minutos de exposição ao LCE:

- Porcentagem de tempo nos braços abertos {%TA; [(tempo nos braços abertos/300) x 100]}.

- Porcentagem de entradas nos braços abertos {%EA; [número de entradas nos braços abertos/número total de entradas (aberto + fechado) x 100]}.

3.7 Protocolo experimental

3.7.1 Experimento 1: Curva dose-resposta do midazolam (MDZ) em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE)

Um total de 24 ratos foram alocados em três grupos experimentais (n=8/grupo) e receberam por via *i.p.* veículo ou midazolam (MDZ) nas doses de 0,375 mg/kg e 0,5 mg/kg, 30 min antes da exposição ao LCE. O experimento 1 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 3.

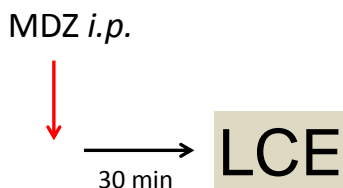


Figura 3. Protocolo utilizado para a avaliação da curva dose-resposta do midazolam (MDZ) em ratos expostos ao LCE. Veículo (1 mL/kg) ou MDZ (0,375 mg/kg e 0,5 mg/kg) foram administrados por via intraperitoneal (*i.p.*) 30 minutos antes da exposição ao LCE que durou 5 min.

3.7.2 Experimento 2: Influência da experiência prévia ao LCE sobre os efeitos comportamentais do MDZ

No presente grupo experimental 50 animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=7-10/grupo) com base no número de experiências prévias (0, 1 ou 2) e no tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg). O grupo “sem experiência prévia ao LCE” foi exposto ao aparato apenas uma vez, sendo que 30 min antes recebeu o tratamento sistêmico. O grupo com “uma experiência prévia” foi exposto ao LCE por 5 min e, 24h após foi re-exposto ao aparato, tendo recebido previamente (30 min) o tratamento sistêmico. Já o grupo com “duas experiências prévias” foi exposto ao LCE por 5 min, 24 h depois re-exposto ao aparato por 5 min e após 24 h foi re-submetido ao LCE por 5 min tendo recebido o tratamento sistêmico 30 min antes. O

experimento 2 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 4.

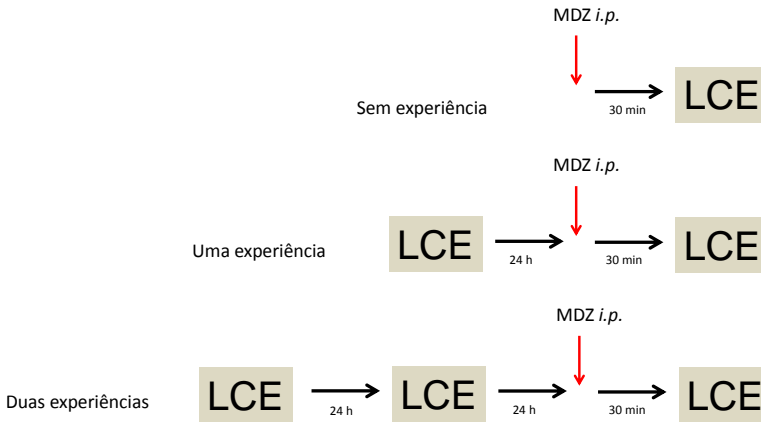


Figura 4. Protocolo utilizado para a avaliação da influência da experiência prévia ao LCE sobre os efeitos do MDZ. Animais sem, com uma ou duas experiências prévias ao LCE (duração de 5 min cada e intervalo de 24 h entre elas) receberam veículo (1 mL/kg) ou MDZ (0,5 mg/kg) que foram administrados por via intraperitoneal (*i.p.*) 30 minutos antes da (primeira, segunda ou terceira) exposição ao LCE que durou 5 min, grupos independentes.

3.7.3 Experimento 3: Efeitos da anisomicina intra-HD sobre a tolerância ao MDZ expressa durante a terceira exposição ao LCE

Para esta etapa 42 ratos foram expostos durante três dias consecutivos (intervalo de 24 h) no LCE por 5 min. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=10-11/grupo) baseados no tratamento central (veículo ou ANI 80µg/hemisfério no HD) imediatamente após a segunda exposição e o tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg) 30 min antes da terceira exposição ao LCE. O experimento 3 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 5A. Dois subgrupos (n=6/grupo) pertencentes aos tratamentos ANI-MDZ e veículo-MDZ foram re-expostos ao LCE 24 h depois, em uma quarta exposição com duração de 5 min, sendo que 30 min antes da exposição receberam novamente o tratamento sistêmico com MDZ 0,5 mg/kg (Fig. 5AB).

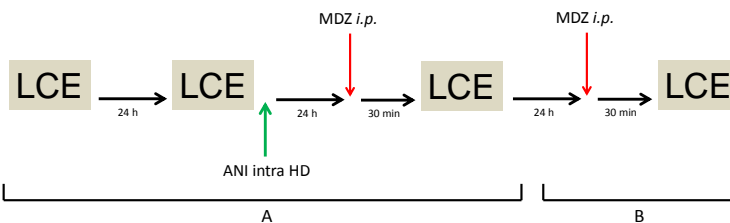


Figura 5. Esquema do protocolo utilizado no experimento 3. LCE – exposição ao LCE por 5 minutos. ANI intra-HD – infusão intra-hipocampo dorsal de anisomicina ou veículo. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 minutos antes da terceira (A) e quarta (B) exposição. 24 h depois um subgrupo pertencente aos tratamentos ANI-MDZ e PBS-MDZ foi reexposto ao LCE (B).

3.7.4 Experimento 4: Efeitos da anisomicina intra-HV sobre a tolerância ao MDZ expressa durante a terceira exposição ao LCE

Para esta etapa 37 ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos ($n=9-10/\text{grupo}$) baseado no tratamento central (veículo ou ANI 80 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ no HV) imediatamente após a segunda exposição e o tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg) dado 30 min antes da terceira exposição ao LCE. O intervalo entre as exposições foi de 24 h e a duração da exposição foi de 5 min. O experimento 4 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 6.

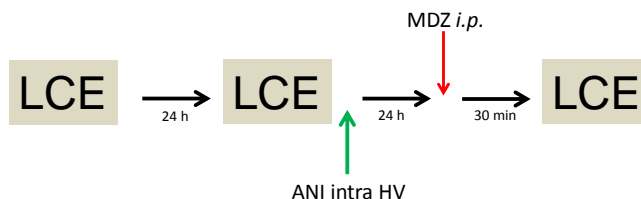


Figura 6. Esquema do protocolo utilizado no experimento 8. LCE – exposição ao LCE por 5 min. ANI intra-HV – infusão intra-hipocampo ventral de anisomicina ou veículo após a segunda exposição. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 min antes da terceira exposição. Intervalo entre as exposições foi de 24 h.

3.7.5 Experimento 5: Avaliação da inibição da síntese proteica em animais sem reativação da memória

Para realização deste grupo experimental 36 ratos foram alocados randomicamente em quatro grupos ($n=9/\text{grupo}$) baseado no tratamento central (veículo ou ANI 80 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ no HD) imediatamente após a segunda exposição que ocorreu em outro contexto (contexto neutro; CN) e no tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg) 30 min antes da terceira exposição, o intervalo entre os experimentos foi de 24 h. O CN consistiu em uma gaiola plástica padrão (36 x 30 x 15 cm) com serragem, fixada em cima do LCE, na ausência de grade, água ou ração, onde os animais permaneceram por 5 min. O experimento 5 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 7.

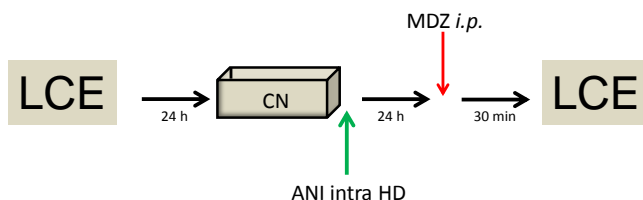


Figura 7. Esquema do protocolo utilizado no experimento 4. LCE – exposição ao LCE por 5 minutos. Na segunda exposição os animais foram alocados em um contexto diferente (neutro; CN) e não ao LCE. ANI intra-HD – infusão intra-hipocampo dorsal de anisomicina ou veículo. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 minutos antes da terceira exposição.

3.7.6 Experimento 6: Efeitos da anisomicina intra-HD 6h após a segunda exposição ao LCE sobre a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição

Nesta etapa 30 ratos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais ($n=7-8/\text{grupo}$) baseado no tratamento central (veículo ou ANI 80 $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ no HD) 6 h após a segunda exposição ao LCE e o tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg) 30 min antes da terceira exposição ao LCE. Cada exposição no LCE teve

duração de 5 min e o intervalo entre elas foi de 24 h. O experimento 6 foi realizado conforme o protocolo demonstrado na figura 8.

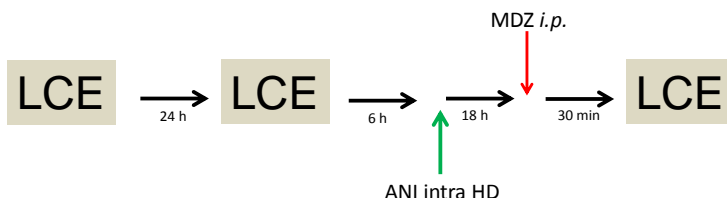


Figura 8. Esquema do protocolo utilizado no experimento 5. LCE – exposição ao LCE por 5 minutos. ANI intra-HD – infusão intra-hipocampo dorsal de anisomicina ou veículo 6h após a segunda exposição. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 minutos antes da terceira exposição.

3.7.7 Experimento 7: Análise do efeito de curto prazo e longo prazo da inibição da síntese proteica no HD após a reativação

Em um primeiro experimento (7A) 33 ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n=7-9/\text{grupo}$) de acordo com o tratamento central (veículo ou ANI $80\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ no HD) imediatamente após a segunda exposição ao LCE e o tratamento sistêmico (veículo ou MDZ $0,5 \text{ mg}/\text{kg}$) 30 min antes da terceira exposição ao LCE. O intervalo entre a primeira e a segunda exposição foi de 24h, no entanto entre segunda e a terceira foi de 3h, a exposição ao LCE teve duração de 5 min. Esse grupo experimental foi delineado conforme demonstrado na figura 9.

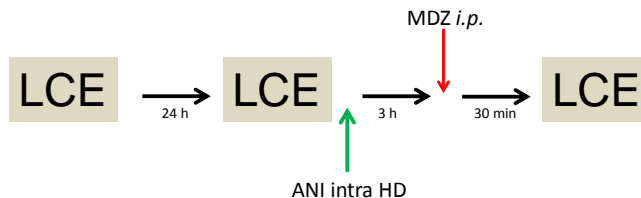


Figura 9. Esquema do protocolo utilizado no experimento 7A. LCE – exposição ao LCE por 5 minutos. ANI intra-HD – infusão intra-hipocampo dorsal de anisomicina ou veículo após a segunda exposição. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 minutos antes da terceira exposição. O intervalo entre a segunda e a terceira exposição foi de 3 h.

Em um segundo experimento (7B), 31 ratos foram divididos em quatro grupos ($n=7-8/\text{grupo}$) de acordo com o tratamento central (veículo ou ANI $80\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ no HD), realizado imediatamente após a segunda exposição, e sistêmico (veículo ou MDZ $0,5 \text{ mg}/\text{kg}$) que ocorreu 30 min antes da terceira exposição ao LCE. O intervalo entre a primeira e a segunda exposição foi de 24h e entre a segunda e a terceira exposição foi de 7 d. Em todos os casos os animais foram expostos ao LCE por 5 min. O protocolo experimental desse grupo é demonstrado na figura 10.

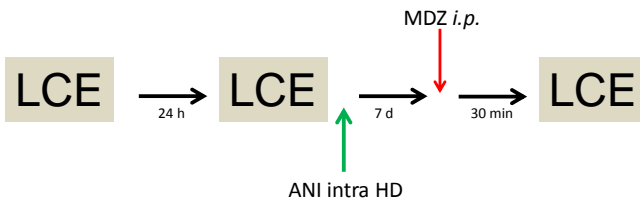


Figura 10. Esquema do protocolo utilizado no experimento 7B. LCE – exposição ao LCE por 5 minutos. ANI intra-HD – infusão intra-hipocampo dorsal de anisomicina ou veículo após a segunda exposição. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 minutos antes da terceira exposição. O intervalo entre a segunda e a terceira exposição foi de 7 dias.

3.7.8 Experimento 8: Avaliação dos efeitos da ANI no HD em uma memória de 7 e 21 dias

Em um primeiro grupo experimental (8A) 28 animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n=6-8/\text{grupo}$) de acordo com o tratamento central (veículo ou ANI $80\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ no HD), que ocorreu imediatamente após a segunda exposição ao LCE e o tratamento sistêmico (veículo ou MDZ $0,5 \text{ mg}/\text{kg}$), administrado 30 min antes da terceira exposição ao LCE. O intervalo entre a primeira e a segunda exposição foi de 7 d e entre a segunda e a terceira foi de 24 h. O protocolo experimental utilizado nesse grupo é demonstrado na figura 11.

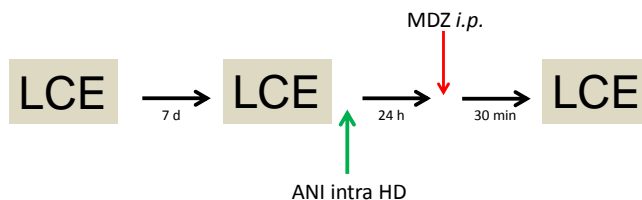


Figura 11. Esquema do protocolo utilizado no experimento 8A. LCE – exposição ao LCE por 5 minutos. ANI intra-HD – infusão intra-hipocampo dorsal de anisomicina ou veículo após a segunda exposição. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 minutos antes da terceira exposição. Intervalo entre a primeira e a segunda exposição foi de 7 dias.

Em um segundo grupo experimental (8B), 32 animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n=7-9$ /grupo) de acordo com o tratamento central (veículo ou ANI 80 μ g/hemisfério no HD) imediatamente após a segunda exposição ao LCE e o tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg) 30 min antes da terceira exposição ao LCE, com um intervalo de 21 d entre a primeira e a segunda exposição ao aparato, o intervalo entre a segunda e terceira exposição foi de 24 h. Em todos os grupos, os animais exploraram o LCE por 5 min. O delineamento experimental desta etapa é demonstrado na figura 12.

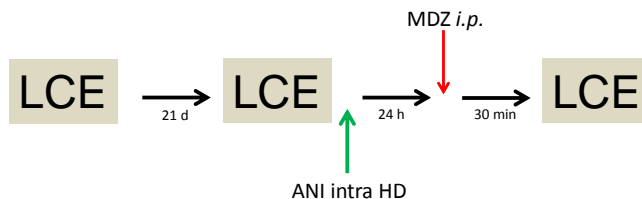


Figura 12. Esquema do protocolo utilizado no experimento 8B. LCE – exposição ao LCE por 5 minutos. ANI intra-HD – infusão intra-hipocampo dorsal de anisomicina ou veículo após a segunda exposição. MDZ *i.p.* – administração intraperitoneal de midazolam ou veículo 30 minutos antes da terceira exposição. Intervalo entre a primeira e a segunda exposição foi de 21 dias.

3.8 Análise histológica dos sítios de injeção

Após o experimento comportamental, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado a 15% (2,5 mg/mL/kg) e xilazina (10 mg/mL/kg) via *i.p.*, seguida por microinjeção de azul de evans (0,2 µl/hemisfério) e perfusão intracardiaca, inicialmente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formalina (10%). Os encéfalos foram, então, retirados e conservados individualmente em recipientes contendo solução de formalina 10%. 48 h antes da realização dos cortes histológicos, os encéfalos foram transferidos para recipientes contendo solução de sacarose 30%, para crioproteção.

No intuito de realizar a análise histológica e verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais (50 µm de espessura) foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha) (-20°C). Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Após secagem das lâminas com os cortes fixados, as mesmas foram coradas com a coloração de Giemsa modificada (ANEXO A), cobertas com lamínulas e seladas com resina sintética.

As lâminas foram fotografadas em uma lupa acoplada a uma câmera (Motic Moticam 2000; 2.0 MP *Live Resolution*) e a um programa de imagens (Motic Image Plus 2.0) e comparadas com os diagramas do atlas de neuroanatomia (PAXINOS; WATSON, 2009), sendo as microinjeções realizadas no HD entre 3,3 a 4,1 mm e no HV entre 4,8 a 5,3 mm posterior a Bregma (fig 13). Em todos os experimentos, apenas os animais com histologia bilateral para o HD ou HV foram incluídos na análise estatística, com acerto aproximado de 90%.

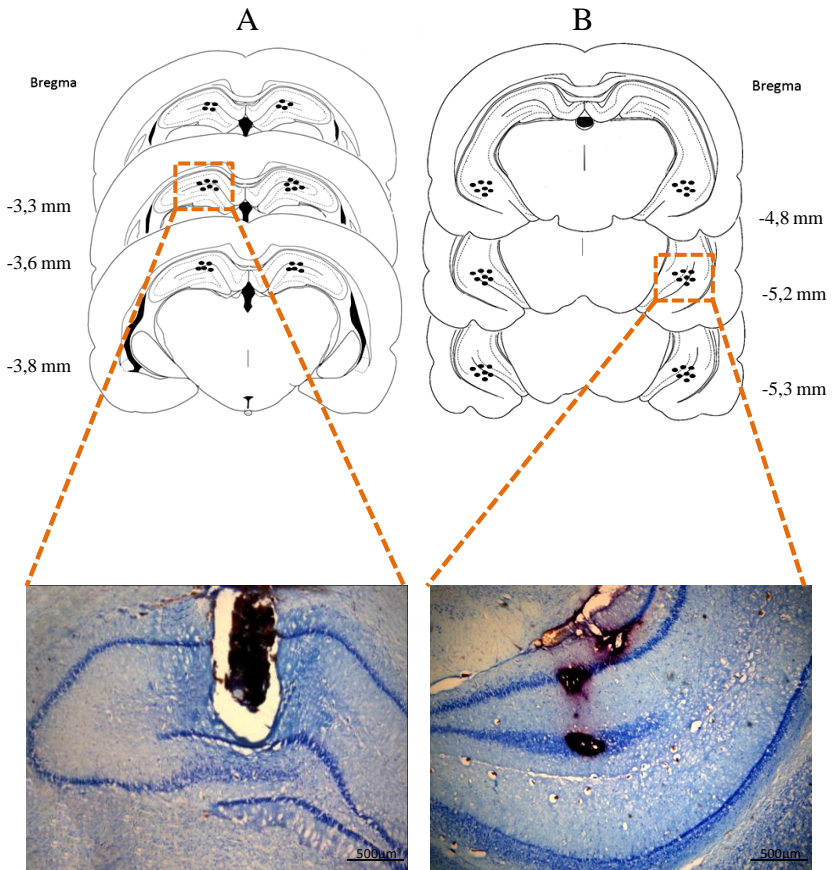


Figura 13. Acima, os diagramas de cortes coronais do cérebro de ratos mostrando os sítios de injeção no HD (A - esquerda) e no HV (B - direita). Abaixo, fotomicrografias do sítio de injeção no HD (esquerda) e no HV (direita). Barra de escala: 500 µm.

3.9 Análise estatística

Após verificar a normalidade e homogeneidade de variância, os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA). Para o experimento 1, utilizou-se ANOVA de uma via, na qual o fator independente foi o tratamento sistêmico. O experimento 2 foi analisado por meio da ANOVA de duas vias, na qual os fatores independentes foram o número de experiências prévias no LCE e o tratamento sistêmico. Para os experimentos 3-8 foi realizada uma ANOVA de duas vias na qual os fatores independentes foram o tratamento central e o tratamento sistêmico, os valores utilizados foram os da terceira exposição ao LCE. Para comparação de dois grupos independentes utilizou-se o teste “t” de Student. Quando apropriado, utilizou-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls, e valor de significância estatística adotado foi de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados pelo Statistica® 7 (StatSoft Inc., EUA) e representados em gráficos confeccionados no GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1. Efeitos do midazolam em ratos testados no LCE

Esse experimento teve como objetivo determinar a dose de MDZ necessária para provocar um aumento na exploração dos braços abertos de ratos submetidos ao LCE em nossas condições experimentais. Para tanto se utilizou o procedimento descrito no item 3.7.1. A ANOVA de uma via indicou uma diferença significativa para os parâmetros %TA ($F_{2,21}=5,1$; $P=0,01$; fig. 14A) e %EA ($F_{2,21}=3,9$; $P=0,03$; fig. 14B). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que o grupo tratado com a dose de 0,5 mg/kg de MDZ demonstrou um aumento em ambos os parâmetros em relação ao grupo que recebeu VEI (Fig. 14A,B). Essa dose resultou em diminuição significativa do parâmetro PAR ($F_{2,21}=5,2$; $P=0,01$; fig. 14C). Nenhuma alteração significativa com relação ao tratamento foi observada para o parâmetro EF ($F_{2,21}=0,05$; $P=0,9$; fig. 14D), um índice de atividade exploratória geral (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Assim, foi selecionada a dose de 0,5 mg/kg de MDZ como efetiva (tipo-ansiolítica) para os demais grupos experimentais deste trabalho.

4.2 Experimento 2. Ratos são tolerantes ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE

Tendo em vista que a dose de 0,5 mg/kg de MDZ resultou em um efeito “tipo-ansiolítico” em animais sem experiência prévia no LCE, o objetivo deste experimento foi reproduzir o fenômeno de tolerância à primeira exposição e analisar o comportamento de ratos durante a terceira exposição sob efeito do MDZ, para tanto se utilizou o protocolo descrito no item 3.7.2. A ANOVA de duas vias demonstrou uma interação significativa entre a experiência prévia e o tratamento para o parâmetro %TA ($F_{2,44}=7,5$; $P=0,001$; fig. 15A). Quanto à %EA, a ANOVA revelou um efeito significativo referente à experiência prévia ($F_{2,44}=37,5$; $P=0,00001$; fig. 15B) e em relação ao tratamento ($F_{1,44}=9,8$; $P=0,003$; fig. 15B), mas não uma interação significativa. O *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que apenas os animais sem experiência prévia e tratados com MDZ demonstraram um aumento na exploração dos braços abertos, enquanto animais com experiência prévia não demonstraram diferenças significativas quando comparados com o respectivo controle.

Além disso, animais com experiência prévia (tanto uma quanto duas), durante a re-exposição apresentaram esquivas adicionais aos braços abertos quando comparado com os animais sem experiência prévia. Quanto ao parâmetro PAR ($F_{2,44}=2,6$, $P=0,08$; fig. 15C) a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatística, apenas uma tendência. Vale nota que quando realizada ANOVA de uma via (formação de 6 grupos referentes à experiência prévia e referentes ao tratamento) para este parâmetro, a mesma revelou uma diferença significativa ($F_{5,44}=4,66$, $P=0,001$; fig. 15C), na qual o grupo sem experiência prévia que recebeu MDZ realizou um menor número de PAR. Quanto ao parâmetro EF ($F_{2,44}=0,27$, $P=0,76$; fig. 15D), a ANOVA não revelou alterações significativas. Este conjunto de resultados demonstra que em nossas condições experimentais, corroborando a literatura, apenas animais ingênuos exploraram mais os braços abertos quando administrado MDZ.

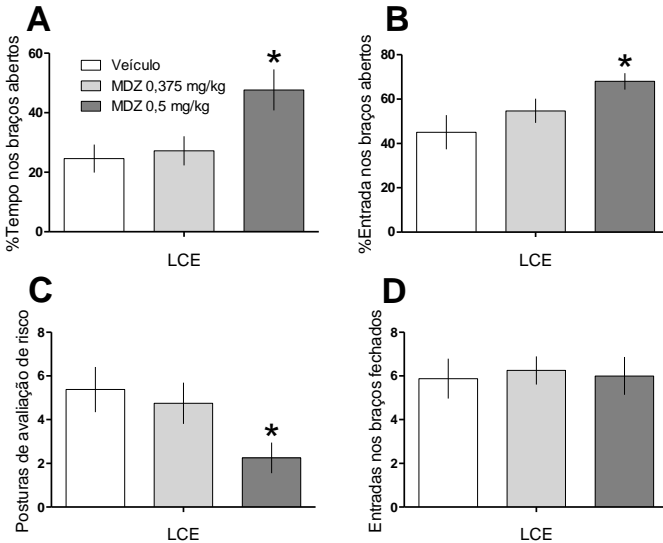


Figura 14. Curva dose-resposta do midazolam (MDZ) em ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE). A dose de 0,5 mg/kg resultou em aumento na exploração dos braços abertos (A,B), diminuição nas posturas de avaliação de risco (C), sem demonstrar alteração na atividade exploratória geral (D). As barras representam a média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

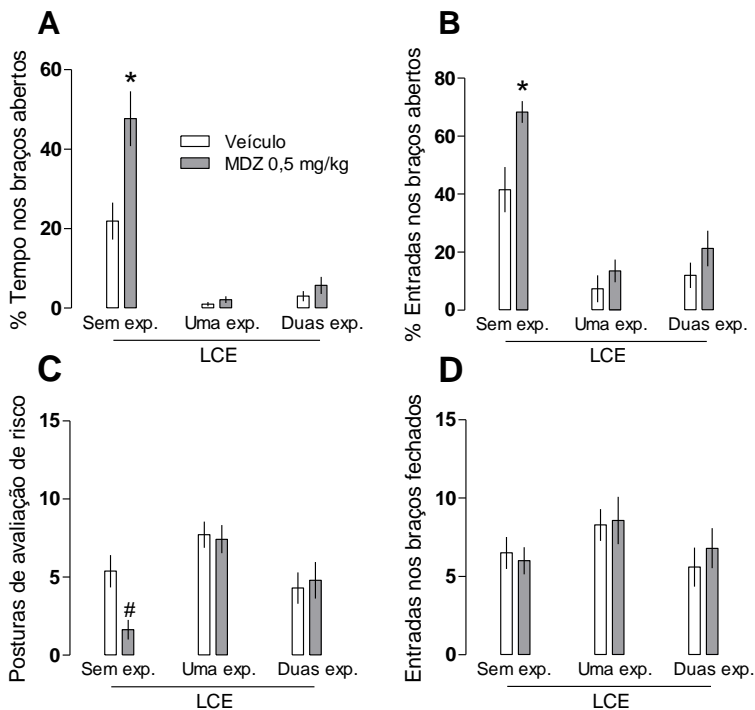


Figura 15. Efeito do midazolam (MDZ) em animais com (uma ou duas exp.: experiência) ou sem experiência prévia no labirinto em cruz elevado (LCE). Ratos sem experiência prévia que receberam 0,5 mg/kg de MDZ *i.p.* exploraram mais os braços abertos (A,B) que seu respectivo controle. Nenhuma diferença significativa foi observada em animais com uma ou duas experiências prévias ao aparato. Nenhum grupo apresentou diferença com relação às posturas de avaliação de risco (C) e à atividade exploratória geral (D). As barras verticais representam a média \pm EPM da primeira exposição (para o grupo sem exp.), da segunda exposição (para o grupo uma exp.) ou da terceira exposição (para o grupo duas exp.). Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). # - ANOVA de duas vias ($P = 0,08$), ANOVA de uma via ($P = 0,001$).

4.3 Experimento 3. Anisomicina intra-HD imediatamente após a segunda exposição ao LCE previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição

Levando em consideração que após a reativação de uma memória a mesma deverá se re-estabilizar, e que a síntese de novas proteínas parece ser essencial nesse processo (NADER; HARDT, 2009), e ainda, tendo em vista o resultado anterior (Fig. 15), o objetivo desse grupo foi analisar se a memória gerada durante a primeira exposição ao LCE, relacionada à tolerância a drogas ansiolíticas em exposições subsequentes, seria passível de interferência, via inibição da síntese de proteínas no HD, após a reativação (segunda exposição), impedindo a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição. O experimento transcorreu conforme descrito no item 3.7.3. A ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre o tratamento central e sistêmico para os parâmetros %TA ($F_{1,38} = 11,8$; $P=0,001$; fig. 16A) e %EA ($F_{1,38}=10,3$; $P=0,002$; fig. 16B). O teste *post-hoc* de Newman-keuls demonstrou um aumento nesses parâmetros para o grupo ANI-MDZ em relação aos demais grupos. Os tratamentos central ou sistêmico não alteraram os parâmetros PAR ($F_{1,38}=0,0004$; $P=0,98$; fig. 16C) e EF ($F_{1,38}=0,12$; $P=0,72$; fig. 16D). Vale ressaltar que o grupo ANI-MDZ sem acerto cirúrgico ou com acerto unilateral apresentou significativamente menos %TA ($P=0,001$) e %EA ($P=0,002$) durante a terceira exposição, quando comparado com o grupo com acerto bilateral. Todos os grupos apresentaram esquia adicional aos braços abertos durante a segunda exposição quando comparados com a primeira. Durante a primeira ou segunda exposição os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 3.

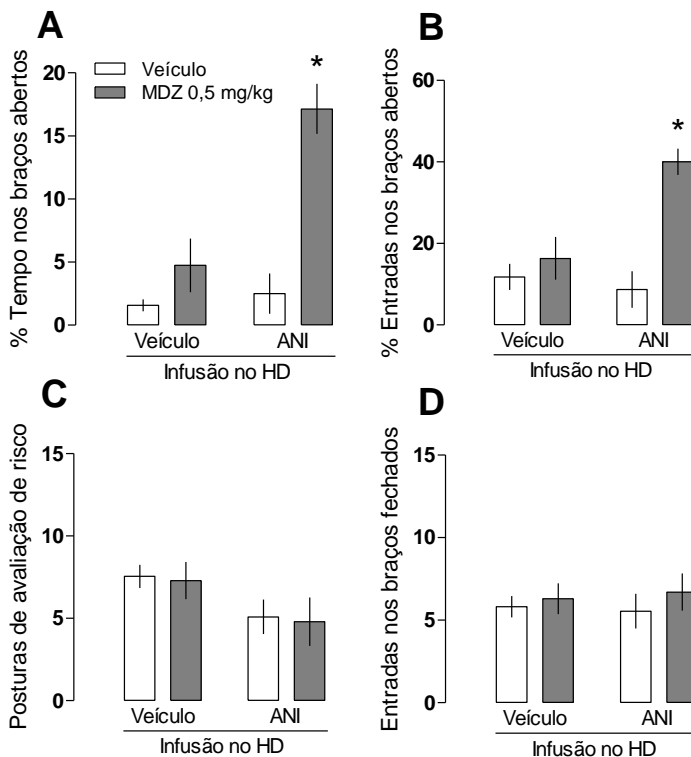


Figura 16. Anisomicina intra-HD imediatamente após a segunda exposição ao LCE previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição. Apenas o grupo tratado com ANI e MDZ apresentou aumento na exploração dos braços abertos durante a terceira exposição (A,B), ao contrário dos demais grupos. Não houve alterações significativas tanto nas posturas de avaliação de risco (C) quanto na atividade exploratória geral (D). As barras verticais representam a média \pm EPM durante a terceira exposição. Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Adicionalmente, conforme demonstrado na tabela 2, durante uma quarta exposição, os animais dos grupos analisados (ANI-MDZ e Veículo-MDZ) não demonstraram diferença significativa para nenhum dos parâmetros. Em conjunto os resultados sugerem que apenas a infusão de ANI bilateral no HD foi capaz de prejudicar a reconsolidação da memória responsável pela expressão comportamental da tolerância ao MDZ durante a terceira exposição. Sugere-se ainda que não houve dano funcional na estrutura, uma vez que, na exposição subsequente os animais apresentaram novamente tolerância ao MDZ.

Tabela 2. Perfil comportamental, durante a quarta exposição ao LCE, de ratos que receberam veículo ou anisomicina (80 µg/hemisfério) bilateralmente no hipocampo dorsal imediatamente após a segunda exposição, midazolam (0,5 mg/kg) via *i.p.* 30 min antes da terceira e quarta exposições, com intervalo de 24 h entre ambas. Os dados representam a média ± EPM.

	Veículo/MDZ (n=6)	Anisomicina/MDZ (n=6)	Teste t
%TA	2,3±0,9	2,2±1,0	t ₁₀ =0,07; P=0,94
%EA	15,5±5,8	9,0±1,6	t ₁₀ =0,89; P=0,38
PAR	5,5±2,7	6,0±2,4	t ₁₀ =0,13; P=0,89
EF	4,0±1,4	4,5±1,6	t ₁₀ =0,22; P=0,82

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

4.4 Experimento 4. Anisomicina intra-HV imediatamente após a segunda exposição ao LCE não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição

Para investigar se a inibição da síntese proteica no HV também mantém o efeito ansiolítico do MDZ em ratos com duas experiências prévias no LCE se fez uso do protocolo descrito no item 3.7.4. A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros %TA (F_{1,33}=0,48; P=0,49; fig. 17A), %EA (F_{1,33}=0,88; P=0,35; fig.17B), PAR (F_{1,33}=2,2; P=0,14; fig. 17C) e EF (F_{1,33}=0,27; P=0,60; fig. 17D). Embora a participação do HV durante a primeira exposição ao LCE seja evidente (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2011), a síntese proteica nessa região parece não estar envolvida na reconsolidação da memória responsável pela alteração da resposta ao MDZ em animais com duas experiências prévias ao LCE. Todos os

grupos apresentaram esquivas adicionais aos braços abertos durante a segunda exposição quando comparados com a primeira. Durante a primeira ou segunda exposição os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 4.

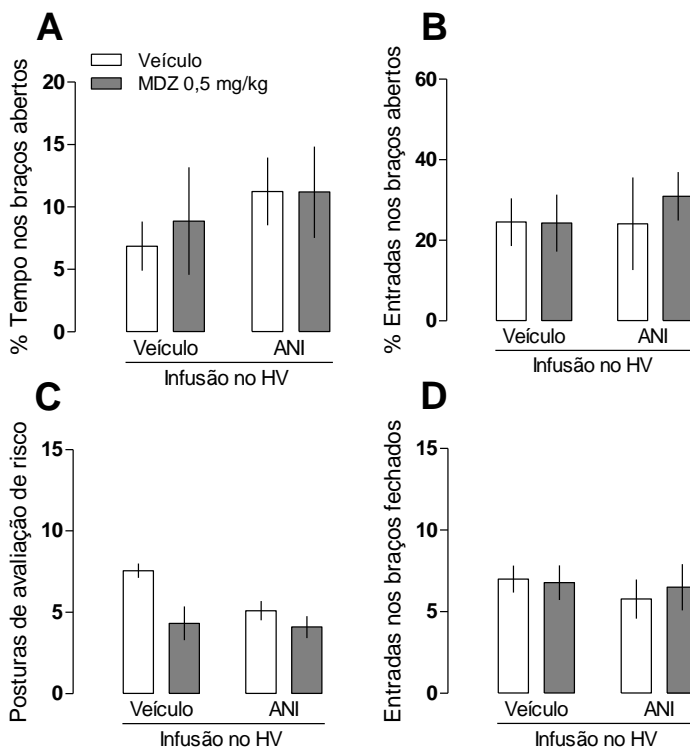


Figura 17. Anisomicina intra-HV não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE. A análise estatística não demonstrou diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados, sejam eles de exploração dos braços abertos (A,B), posturas de avaliação de risco (C) ou atividade exploratória geral (D). As barras verticais representam a média \pm EPM referentes à terceira exposição. ANOVA de duas vias.

Considerando que os nossos resultados sugerem a participação do HD, porém não do HV, no processamento da memória relacionada à tolerância ao MDZ, e no intuito de confirmar que o experimento 3 reflete a um prejuízo na reconsolidação da memória, a injeção central nos próximos grupos experimentais (5-7) (grupos controle) foram direcionadas apenas para o HD.

4.5 Experimento 5. A prevenção da tolerância ao MDZ produzida pela ANI no HD depende da reativação da memória

Após a exposição dos animais a um contexto ou pista no qual a memória foi formada, a mesma pode se tornar novamente instável e passível de manipulação, ao passo que memórias não reativadas seriam resistentes (NADER et al., 2000; FINNIE; NADER, 2012). Levando em conta o resultado do experimento anterior (Fig. 16), o objetivo desse grupo experimental foi investigar o efeito da ANI injetada após a exposição dos animais a um contexto neutro, ou seja, sem reativação. O experimento foi delineado conforme descrito no item 3.7.5. A ANOVA de duas vias não revelou diferença entre o tratamento central e sistêmico para os parâmetros %TA ($F_{1,32}=1,2$; $P=0,26$; fig. 18A), %EA ($F_{1,32}=0,2$; $P=0,6$; fig. 18B), PAR ($F_{1,32}=0,2$; $P=0,63$; fig. 18C) e EF ($F_{1,32}=0,02$; $P=0,88$ fig. 18D). O conjunto de resultados sugere que a exposição dos animais a um contexto neutro não foi capaz de reativar e, portanto, desestabilizar essa memória, que por consequência não teve a etapa da reconsolidação prejudicada pela infusão de ANI. Durante a primeira os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 5.

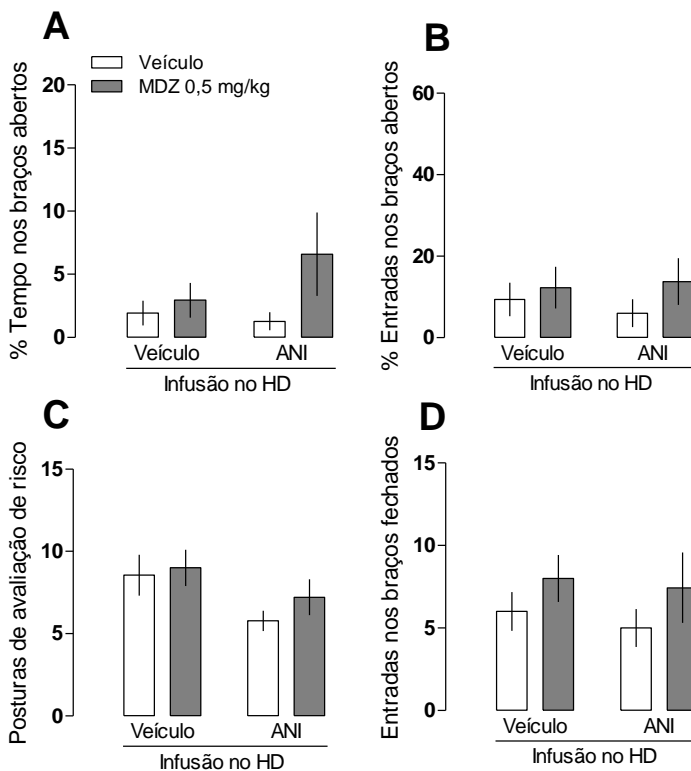


Figura 18. A prevenção da tolerância ao efeito do midazolam (MDZ) produzida pela anisomicina (ANI; 80 μ g/hemisfério) no HD depende da reativação da memória. Quando os animais não foram re-expostos ao LCE previamente à administração central de ANI a ANOVA não demonstrou diferença no perfil de exploração dos braços abertos (A,B), posturas de avaliação de risco (C) ou entradas nos braços fechados (D). As barras verticais representam a média \pm EPM referentes a terceira exposição. ANOVA de duas vias.

4.6 Experimento 6. Infusão tardia de ANI no HD não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE

A reconsolidação da memória é um processo dinâmico e gradual que leva até 6 h após a reativação para se completar (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000; DUDAI, 2004). A fim de confirmar que os resultados vistos anteriormente (Fig. 16) são devido ao prejuízo na reconsolidação, este grupo experimental foi delineado com o objetivo de administrar o inibidor de síntese proteica 6h depois da reativação da memória. O experimento foi desenvolvido conforme descrito no item 3.7.6. A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre os tratamentos central e sistêmico para os parâmetros %TA ($F_{1,26}=0,3$; $P=0,56$; fig. 19A), %EA ($F_{1,26}=0,2$; $P=0,55$; fig. 19B), PAR ($F_{1,26}=2,8$; $P=0,09$; fig. 19C) e EF ($F_{1,26}=0,1$; $P=0,69$; fig. 19D). Em conjunto os resultados sugerem que a administração tardia de ANI não prejudicou a reconsolidação da memória responsável pela tolerância comportamental ao MDZ durante a terceira exposição, uma vez que, o processo de reconsolidação parece já ter sido completado. Todos os grupos apresentaram esquia adicional aos braços abertos durante a segunda exposição quando comparados com a primeira. Durante a primeira ou segunda exposição os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 6.

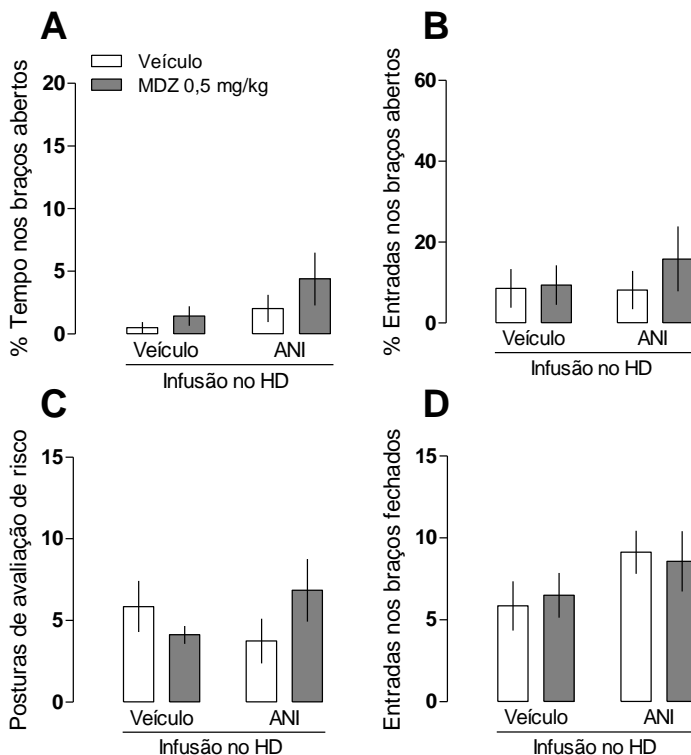


Figura 19. Infusão tardia de anisomicina (ANI; 80 μ g/hemisfério) no hipocampo dorsal (HD) não previne a tolerância ao MDZ durante a terceira exposição. A ANOVA não demonstrou diferença significativa entre os grupos durante a terceira exposição. Sejam elas relacionadas à exploração dos braços abertos (A,B), posturas de avaliação de risco (C), ou atividade exploratória geral (D). As barras verticais representam a média \pm EPM referentes à terceira exposição. ANOVA de duas vias.

4.7 Experimento 7. A prevenção da tolerância ao MDZ produzida pela ANI intra-HD é dependente do intervalo de tempo entre a infusão central e a re-exposição ao LCE

O presente grupo experimental adicional foi delineado (segundo o protocolo descrito no item 3.7.7 – Experimento 7A) no intuito de confirmar que o resultado descrito acima (Fig. 16) é reflexo de um prejuízo específico da reconsolidação. Num primeiro momento o objetivo foi observar a influência da diminuição do intervalo entre a injeção central e a terceira exposição para 3 h, uma vez que, a memória de curta duração pós-reativação (MCD-PR) não é alterada pela administração de ANI (NADER, 2003). A MCD-PR é um estado transitório no qual a MDL se encontra após ser reativada, cuja função seria expressar a memória enquanto ela é reconsolidada. Este estado não sofre interferência de ISP e inibidores de síntese de RNA (NADER; HARDT, 2009). A ANOVA de duas vias não demonstrou diferença significativa entre o tratamento central e sistêmico para os parâmetros %TA ($F_{1,29}=0,01$; $P=0,90$; fig. 20A), %EA ($F_{1,29}=0,02$; $P=0,87$; fig. 20B), PAR ($F_{1,29}=0,05$; $P=0,81$; fig. 20C) e EF ($F_{1,29}=0,09$; $P=0,76$; fig. 20D). Esses dados corroboram a literatura que utiliza o presente protocolo controle, afim de demonstrar que manipulações farmacológicas direcionadas à prejudicar a reconsolidação da memória mantém intacta a MCD-PR. Todos os grupos apresentaram esQUIVA adicional aos braços abertos durante a segunda exposição quando comparados com a primeira. Durante a primeira ou segunda exposição os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 7A.

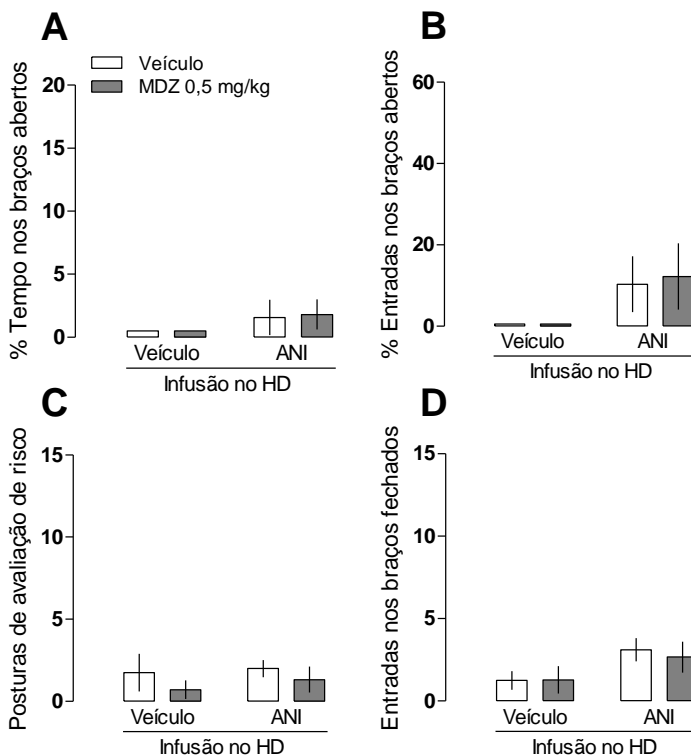


Figura 20. ANI não prejudica a memória de curta duração pós-reativação, indicada pela tolerância ao MDZ durante a terceira exposição ao LCE. Os resultados demonstram que quando o intervalo entre a segunda e a terceira exposição ao LCE foi de apenas 3 horas, não foram encontradas alterações nos parâmetros de exploração dos braços abertos (A,B), posturas de avaliação de risco (C) ou atividade exploratória geral (D). As barras verticais representam a média \pm EPM referentes à terceira exposição. ANOVA de duas vias.

Levando em conta de que a inibição da síntese proteica após a reativação da memória pode acarretar prejuízos duradouros (DUVARCI; NADER, 2004). O objetivo deste grupo experimental (delineado segundo o protocolo descrito no item 3.7.7 – Experimento 7B) foi analisar se o prejuízo na memória observado no experimento 3 seria reproduzido quando o intervalo entre a infusão central de ANI e a terceira exposição fosse de 7 dias. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o parâmetro %TA com relação ao tratamento central ($F_{1,27}=5,3$; $P=0,02$; fig. 21A) e ao tratamento sistêmico ($F_{1,27}=4,8$; $P=0,03$; fig. 21A). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o grupo ANI-MDZ explorou significativamente mais os braços abertos quando comparado com os demais grupos. Não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros %EA ($F_{1,27}=0,72$; $P=0,40$; fig. 21B), PAR ($F_{1,27}=0,28$; $P=0,6$; fig. 21C) e EF ($F_{1,27}=1,51$; $P=0,22$; fig. 21D). Em conjunto os resultados sugerem a ANI no HD provocou um prejuízo duradouro (de pelo menos sete dias) na reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ. Todos os grupos apresentaram esquivas adicionais aos braços abertos durante a segunda exposição quando comparados com a primeira. Durante a primeira ou segunda exposição os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 7B.

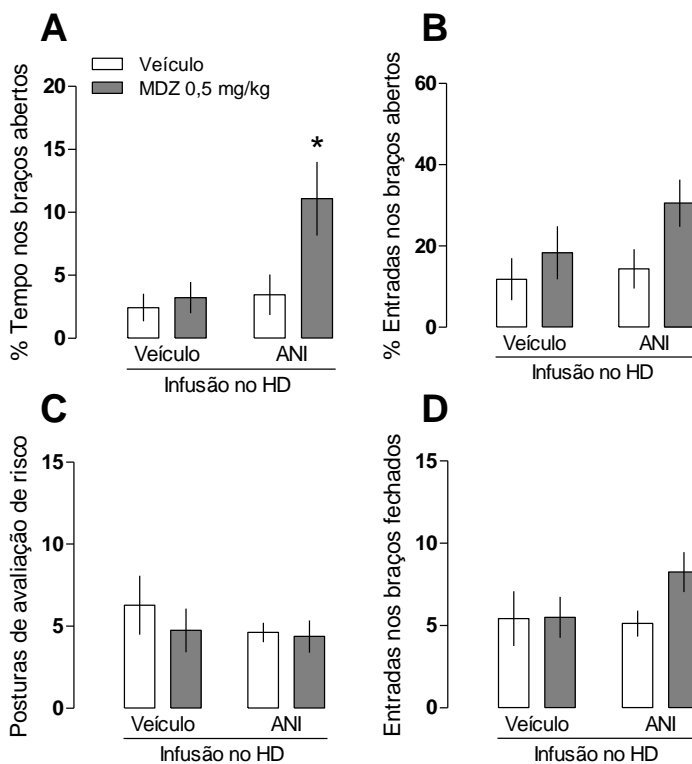


Figura 21. Anisomicina produz um prejuízo duradouro na reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ. O grupo ANI-MDZ demonstrou um maior tempo gasto nos braços abertos quando comparado com os demais grupos (A). Não foram encontradas diferenças significativas nos demais parâmetros (B,C,D). As barras verticais representam a média \pm EPM referentes a terceira exposição. Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.8 Experimento 8. A participação do HD na reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ varia de acordo com a idade da memória

Considerando que a vulnerabilidade aos efeitos da ANI diminui ao passo que a memória se torna mais remota (BESNARD; CABOCHE; LAROCHE, 2012), o objetivo desse grupo experimental foi investigar se o prejuízo na reconsolidação visto no experimento 3 seria reproduzido quando o intervalo entre a primeira e a segunda exposição fosse de 7 ou 21 dias. O procedimento experimental foi delineado segundo o protocolo descrito no item 3.7.8. Quando a sessão de reativação se deu sete dias após a primeira exposição ao LCE a ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre o tratamento central e sistêmico para os parâmetros %TA ($F_{1,24}=16,6$; $P=0,0004$; fig. 22A) e %EA ($F_{1,24}=4,4$; $P=0,04$; fig. 22B), no qual o *post-hoc* demonstrou que o grupo ANI-MDZ apresentou maior exploração dos braços abertos quando comparado com os demais grupos. A ANOVA não revelou diferença significativa para os parâmetros PAR ($F_{1,24}=2,8$; $P=0,10$; fig. 22C) e EF ($F_{1,24}=0,23$; $P=0,63$; fig. 22D). Todos os grupos apresentaram esquivas adicionais aos braços abertos durante a segunda exposição quando comparados com a primeira. Durante a primeira ou segunda exposição os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 8A.

No entanto, quando a segunda exposição se deu 21 dias após a primeira exposição, não foi observada nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados: %TA ($F_{1,28}=0,5$; $P=0,46$; fig. 23A), %EA ($F_{1,28}=0,17$; $P=0,89$; fig. 23B), PAR ($F_{1,28}=1,98$; $P=0,17$; fig. 23C) e EF ($F_{1,28}=0,2$; $P=0,6$; fig. 23D). Em conjunto, os resultados sugerem que a síntese proteica no hipocampo dorsal é necessária para a reconsolidação tanto de uma memória de um dia (experimento 3) quanto de sete dias de idade, no entanto parece não ser mais a principal responsável quando se trata de uma memória de 21 dias de idade. Todos os grupos apresentaram esquivas adicionais aos braços abertos durante a segunda exposição quando comparados com a primeira. Durante a primeira ou segunda exposição os grupos não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme análise estatística descrita no ANEXO B – experimento 8B.

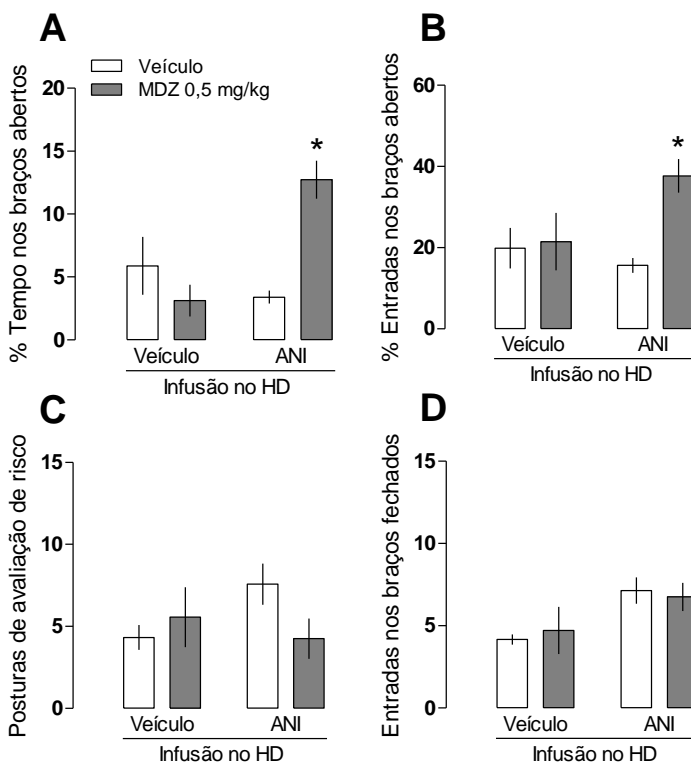


Figura 22. Anisomicina (ANI; 80 μ g/hemisfério) previne a tolerância ao MDZ em uma memória de sete dias. Os animais que receberam tratamento ANI-MDZ demonstraram maior exploração dos braços abertos (A,B) quando comparado com os demais grupos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para os demais parâmetros avaliados: posturas de avaliação de risco (C) e atividade exploratória geral (D). As barras verticais representam a média \pm EPM referentes à terceira exposição. Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao demais grupos (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

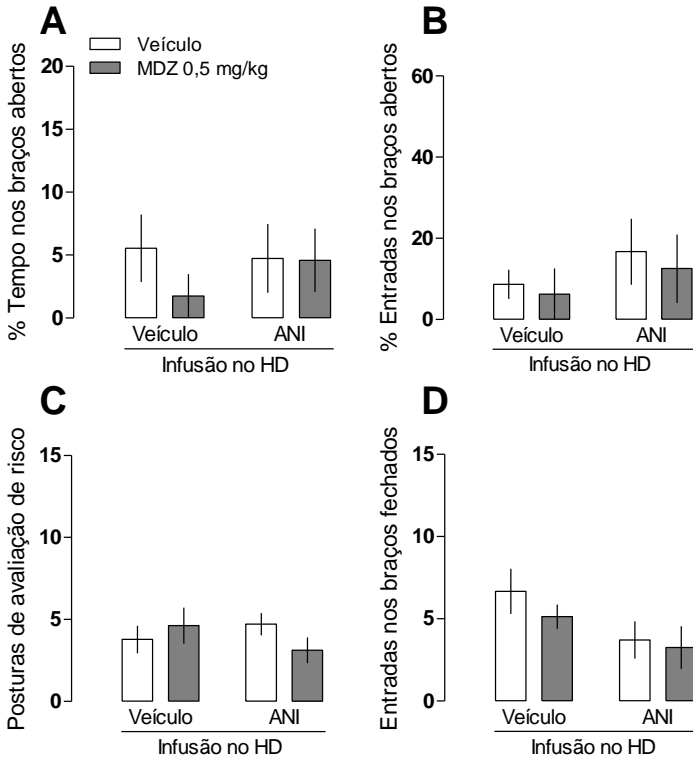


Figura 23. Anisomicina (ANI; 80 μ g/hemisfério) não previne a tolerância ao MDZ em uma memória de 21 dias. Os animais que receberam tratamento ANI-MDZ demonstraram semelhante exploração dos braços abertos (A,B) quando comparado com os demais grupos. Nenhuma alteração significativa foi encontrada para os demais parâmetros avaliados: posturas de avaliação de risco (C) e atividade exploratória geral (D). As barras verticais representam a média \pm EPM referentes à terceira exposição. ANOVA de duas vias.

5 DISCUSSÃO

Os principais resultados deste trabalho foram: (i) a inibição da síntese proteica intra-HD, imediatamente (porém não 6 h) após a segunda exposição ao LCE (e não a um contexto neutro), promoveu um aumento na exploração dos braços abertos do LCE em animais que receberam midazolam durante a terceira exposição aparato, independente do intervalo de 24 h ou sete dias entre a segunda e terceira exposição; (ii) a injeção de ANI não alterou comportamento dos animais re-submetidos ao LCE três horas após a mesma; (iii) a anisomicina preveniu a tolerância ao midazolam durante a terceira exposição quando a reativação se deu 7 dias (porém não 21) após a primeira exposição; (iv) a inibição da síntese proteica no HV não alterou o comportamento dos animais durante a terceira exposição ao aparato.

Este conjunto de resultados no qual sugerimos um prejuízo da etapa de reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao MDZ, adiciona a possibilidade de uso do presente protocolo como uma ferramenta para o estudo da neurobiologia da memória.

Em acordo com a literatura (ROSA et al., 2000), o midazolam (0,5 mg/kg *i.p.*) aumentou os índices de exploração dos braços abertos em ratos testados no LCE, sem alterar o parâmetro EF indicando não haver comprometimento na atividade exploratória geral (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Neste sentido, durante a segunda ou terceira exposição os animais demonstraram esquia adicional aos braços abertos e não expressaram resposta à administração de MDZ. O aumento na esquia aos braços abertos em ratos com experiência prévia ao LCE parece depender do conhecimento prévio de todo o aparato, ou seja, dos braços abertos e fechados (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000), e perdurar por até 18 exposições, o que sugere não haver habituação ao aparato (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). Embora durante a segunda exposição o perfil de tolerância já tenha sido demonstrado tanto para o MDZ (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002c) como para outras drogas, como por exemplo: clordiazepóxido (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990); diazepam (RODGERS; SHEPHERD, 1993); antagonistas glutamatérgicos (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003), etanol (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a), fenobarbital (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a), este trabalho descreve o perfil comportamental e a tolerância ao MDZ durante uma terceira exposição.

A tolerância a uma droga pode ser caracterizada pela perda ou diminuição do seu grau de efetividade, e na maioria dos casos está relacionada ao seu uso repetido (BRUNTON; CHABNER;

KNOLLMANN, 2011). Uma vez que os animais receberam MDZ apenas uma vez durante os experimentos, a tolerância farmacológica foi descartada como sendo a responsável pela ausência de resposta ao benzodiazepínico.

Cabe ressaltar que a TPE poderia ser resultado da incapacidade da droga em gerar alterações comportamentais mensuráveis no presente protocolo experimental e não em seu prejuízo farmacológico. Essa suposição parece válida quando se considera que os níveis de corticosterona plasmático de ratos durante a primeira ou segunda exposição ao LCE se elevam (FILE et al., 1994), no entanto, embora não haja aumento na exploração dos braços abertos, a capacidade do diazepam em diminuir os níveis desse hormônio é mantida independente do conhecimento prévio do aparato (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007). Desse modo, parece que um processo aprendido seria o responsável pelo aumento da esquivas dos braços abertos do LCE em animais com experiência prévia ao aparato (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; ROY et al., 2009; RODGERS et al., 2011).

Adicionalmente, não se pode negar o envolvimento mnemônico no momento da administração da droga e a sua influência no desenvolvimento da tolerância, ressaltando a possibilidade de haver a criação de um mecanismo compensatório capaz de inibir o efeito da droga quando há a exposição de pistas relacionadas à administração da mesma (WOODS; RAMSAY, 2000). De fato, Allison e Pratt (2003) demonstraram que tanto a tolerância quanto a memória compartilham vias comuns no processo de plasticidade neuronal. No presente trabalho, o aspecto mnemônico seria a experiência prévia ao LCE.

A hipótese de um aprendizado prévio é ainda mais relevante uma vez que se faz necessário um período mínimo de exploração para que os animais adquiram a tolerância aos benzodiazepínicos em uma re-exposição, ou seja, um período para o conhecimento concreto de todo o aparato (aprendizado) (DAL-CÓL et al., 2003).

A participação mnemônica no desenvolvimento da tolerância a drogas ansiolíticas em animais com experiência prévia ao LCE é evidente quando se considera que manipulações farmacológicas em diferentes etapas da formação e manutenção dessa memória culminam em prejuízo na tolerância (ESCARABAJAL; TORRES; FLAHERTY, 2003; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARAES, 2006; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008). Do mesmo modo, o favorecimento da consolidação acentua a TPE (RODGERS et al., 2011). E mais recente, a inibição da síntese proteica intra-hipocampo dorsal após a primeira exposição ao LCE (prejuízo da

consolidação) permitiu a resposta do MDZ em uma segunda exposição (GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011), revelando também a importância do processo de síntese proteica hipocampal na TPE. Levando em consideração o exposto acima, acreditamos que a tolerância ao MDZ seja dependente do aprendizado aversivo adquirido durante a primeira exposição ao LCE.

Analisando a literatura que indica que a reconsolidação pode recrutar as mesmas regiões anatômicas responsáveis por consolidar uma dada memória (SARA, 2000; KIDA et al., 2002; BOZON et al., 2003), seria possível supor que ao adaptar o LCE a um protocolo para estudo da reconsolidação (TRONSON; TAYLOR, 2007), o uso de um inibidor de síntese proteica seria capaz de impedir também a reconsolidação dessa memória relacionada à tolerância ao MDZ.

Quando foi administrado MDZ durante a terceira exposição em animais que receberam anisomicina no HD imediatamente após a segunda exposição foi encontrado um aumento na exploração dos braços abertos quando comparado com os demais grupos. Por outro lado, os grupos não reativado, ou com injeção no HV, não demonstraram nenhuma diferença significativa.

Em conjunto os resultados supracitados sugerem que a segunda exposição ao LCE foi capaz de reativar a memória e assim deixá-la passível à interferência da anisomicina. Conforme descrito acima, após a reativação, memórias consolidadas tornam-se instáveis (novamente vulneráveis) e para persistir necessitam passar por um novo processo de estabilização dependente de síntese proteica denominado reconsolidação (NADER et al., 2000; EISENBERG; DUDAI, 2004). Esse resultado corrobora a literatura que descreve a necessidade de síntese proteica no HD para a reconsolidação da memória em diversos paradigmas comportamentais, tais como: condicionamento de medo contextual (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002; FRANKLAND et al., 2006), condicionamento traço de medo (RUNYAN; DASH, 2005), labirinto aquático (MORRIS et al., 2006; ROSSATO et al., 2006) e reconhecimento de objetos (ROSSATO et al., 2007).

Do ponto de vista da reconsolidação, uma memória pode ser manipulada quando se encontra em um estado lábil, o que pode ocorrer após a evocação e consequente reativação. Uma vez que tanto a evocação de uma memória quanto a reativação são processos bioquimicamente ativos [a evocação de uma memória de longa duração por exemplo, necessita da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, atividade da proteína quinase A (PKA), via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), entre outros (SZAPIRO et al., 2002)],

não seria qualquer pista que teria a capacidade de reativar uma memória, sendo que apenas situações relevantes o fariam (LEE et al., 2005; ROBINSON; FRANKLIN, 2007; MILTON et al., 2008).

O primeiro trabalho a documentar que a “reativação” da memória é um processo bioquímico ativo foi o de Mamou e colaboradores (2006), que com o uso de antagonistas glutamatérgicos do tipo NMDA dado antes da reativação foi capaz de inibir o prejuízo causado pela anisomicina após a reativação. Recentemente, Lee e colaboradores (2008) demonstraram que a desestabilização da memória envolve a degradação proteica sináptica. Demonstrando então que, após a reativação de uma memória de medo ao contexto, é disparada uma marcação de proteínas por poliubiquitinação na região CA1 do hipocampo. Essas proteínas marcadas se tornariam alvo da via bioquímica ubiquitina-proteossoma levando à proteólise. Caso esse complexo seja inibido, não é visto mais o efeito prejudicial da anisomicina. Em conjunto esses resultados demonstram que a degradação de proteínas pré-existentes é necessária para que haja posterior reestabilização da memória. Considerando o exposto acima e conforme demonstrado por Duvarci e Nader (2004) a presença do estímulo aversivo (em nosso caso os braços abertos) seria um componente relevante ao ponto de reativar a memória.

Cabe nota que, embora os animais sem reativação da memória não apresentaram diferença estatística entre eles, o grupo tratado com ANI-MDZ demonstrou graficamente um valor superior aos demais. É possível que, uma vez que a sessão de exposição ao contexto neutro se deu no mesmo ambiente no qual a memória foi gerada, pistas contextuais tenham provocado uma reativação parcial na memória (LEE et al., 2005). Esta memória, em última análise, teve um prejuízo parcial em sua reconsolidação. Uma alternativa para evitar esse tipo de contaminante seria injetar a droga e retornar os animais para a caixa-moradia, sem contato com qualquer outro ambiente, conforme protocolo realizado por Morris e colaboradores (2006).

Quando foi injetado ANI no HV, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada durante a terceira exposição. No entanto, os grupos nos quais as cânulas foram direcionadas para o HV tiveram uma linha basal de exploração dos braços abertos superior aos animais com cirurgia no HD. Esse é um resultado esperado e corrobora a literatura que relata diminuição na esquia aos braços abertos quando há inativação com lidocaína (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006) e diminuição do comportamento defensivo após lesão com ácido

ibotênico (PENTKOWSKI et al., 2006), ambos para o HV porém não para o HD.

Embora a participação do HV seja evidente durante a primeira exposição ao LCE (KJELSTRUP et al., 2002; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2010). Alguns trabalhos relatam a participação dessa região no processamento de memórias emocionais (RUDY; MATUS-AMAT, 2005), porém nossos dados sugerem que a síntese proteica no HV parece não estar envolvida com a reconsolidação da memória relacionada a tolerância ao MDZ. De fato, um trabalho recente demonstra alta correlação entre o perfil comportamental de ratos no LCE e a taxa de disparo de neurônios do HV durante a primeira exposição, porém não no HD e tão pouco durante a segunda exposição (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2011), sendo que esses autores indicam uma alta participação do HV nos comportamentos relacionados à ansiedade. O fato da não observação desta correlação com o HD nos faz acreditar que o resultado obtido em nossos experimentos reflita mais especificamente no processo de reconsolidação da memória e não em processos puramente emocionais. Os resultados do presente estudo não podem descartar a participação do HV, uma vez que não inativamos essa estrutura, porém como demonstrado por Ruedger e colaboradores (2012) (em um paradigma de memória espacial), talvez a maior contribuição desta região, quando se trata de um protocolo de teste-reteste no LCE, seja na escolha de uma estratégia comportamental (esquivar-se dos braços abertos), enquanto o HD seria responsável por armazenar, processar e recuperar essa informação em exposições subsequentes.

Cabe nota que a divergência na expressão gênica entre as regiões dorsal e ventral do hipocampo possa ser a responsável pelo perfil comportamental que encontramos em nossos experimentos. Essa suposição é baseada no fato de alguns genes serem majoritariamente expressos no HD quando comparado com o HV, como por exemplo: região delta da proteína quinase C, peptidase específica da ubiquitina, protease de serina 35, fator de tradução 1B de eucariotos, proteína quinase ativada por mitógeno (tipos 5 e 11) (THOMPSON, et al., 2008). Considerando que os produtos transcritos por esses genes estão correlacionados com o processamento de memórias (TRONSON; TAYLOR, 2007), esses resultados enfatizam a importância do HD na questão mnemônica.

Embora a administração de ANI no HD preveniu a tolerância ao MDZ, nenhuma alteração no parâmetro PAR foi encontrada. É possível que nesse contexto outra estrutura cerebral seja a responsável pelo

processamento desse comportamento, possivelmente o córtex cingulado anterior (REIS et al., 2012). Além disso, em todos os casos animais com experiência prévia ao LCE exploraram menos os braços abertos durante exposições subsequentes e apresentaram tolerância ao MDZ. Embora esses dois fenômenos ocorram simultaneamente, os mecanismos neurais que controlam esses processos não são necessariamente os mesmos, pois em alguns casos o prejuízo na tolerância foi observado em ocasiões onde a esquia aos braços abertos permaneceu inalterada (BERTOGLIO et al., 2005; STERN et al., 2008). Já a inativação com cobalto região infra-límbica do córtex pré-frontal impediu a esquia adicional aos braços abertos, sugerindo um papel dessa estrutura neste comportamento, possivelmente um prejuízo na evocação (STERN et al., 2010).

Adicionalmente, não foi observada tolerância ao midazolam quando o intervalo entre a injeção central e a terceira exposição foi de sete dias. Esse resultado corrobora a hipótese de que a ANI prejudicou de modo duradouro a reconsolidação (e a consequente reestabilização) da memória relacionada à tolerância ao midazolam. De forma semelhante, Milekic e colaboradores (2006) constataram um prejuízo na resposta comportamental por quatro semanas em um paradigma de condicionamento ao lugar.

Morris e colaboradores (2006) demonstraram um déficit de 94% na síntese proteica hipocampal após a administração central de ANI. Uma vez que são necessárias novas proteínas para a reestabilização da memória reativada, essa diminuição de proteínas disponíveis explicaria o efeito amnésico da anisomicina (NADEL; HARDT, 2011). No entanto, é sugerido que a inibição da síntese proteica não seja o único mecanismo pelo qual a ANI cause o prejuízo sobre a reconsolidação (RUDY et al., 2006).

A diminuição da produção e liberação de catecolaminas (noradrenalina, por exemplo) seria outra hipótese que explicaria o efeito amnésico produzido pela anisomicina (ALBERINI, 2008). Uma vez que a ativação dos receptores adrenérgicos desempenha um papel importante no estabelecimento da potenciação de longa duração (GELINAS; NGUYEN, 2005), a quantidade insuficiente de noradrenalina explicaria, pelo menos em parte, o prejuízo duradouro na reconsolidação causado pela ANI.

A ação apoptótica da ANI também tem sido descrita como responsável pela ação amnésica dessa droga, no qual, a morte neuronal seria o mecanismo responsável pelo prejuízo na reconsolidação (RUDY et al., 2006), embora, Santini e colaboradores (2004) não observaram

perda glial ou celular após o uso de inibidores de síntese proteica. Além disso, no intuito de esclarecer que o prejuízo da reconsolidação causado pela ANI não é produto de uma perda da funcionalidade da região cerebral na qual a droga foi administrada, vários grupos de pesquisa tem adicionado um experimento controle. Neste, é verificado que o animal não perde a capacidade de adquirir um novo aprendizado (DUVARCI; NADER, 2004; PARSONS et al., 2006). Nossos resultados estão de acordo com o exposto acima, uma vez que o sub-grupo de animais ANI-MDZ que explorou os braços abertos durante a terceira exposição, não mais o fez em uma quarta exposição. Sugerindo que o HD permaneceu funcional, uma vez que durante a terceira exposição os animais novamente adquiriram a informação relacionada à estrutura espacial do LCE e apresentaram tolerância ao MDZ em uma exposição subsequente.

Outra condição em debate sobre os limites nos quais a memória é reconsolidada consiste na previsibilidade do estímulo durante a reativação (DUDAI, 2006). Esta suposição emergiu primeiramente de estudos com o crustáceo *Chasmagnathus*, os quais revelam que a incompatibilidade entre os eventos que são esperados e aqueles que realmente ocorrem durante a sessão de reativação é que seria capaz de desencadear a reconsolidação (PEDREIRA; PÉREZ-CUESTA; MALDONADO, 2004), suposição também proposta para roedores (MORRIS et al., 2006). Pedreira e colaboradores (2004) demonstraram que a memória apenas foi passível a interferência quando uma pista visual aversiva foi apresentada após a exposição do animal ao contexto no qual a memória foi adquirida. Em conjunto, sugere que a memória apenas estaria susceptível a interferência após uma sessão de reativação com reforço (DUVARCI; NADER, 2004; EISENBERG; DUDAI, 2004). Debiec e colaboradores (2006) demonstram que apenas uma memória diretamente reativada, porém não indiretamente, seria reconsolidada. Adicionalmente, Lee (2009) enfatiza que a similaridade entre a sessão de treino e a de reativação constitui um fator importante para a reativação total da memória (NADER; HARDT, 2009), enquanto a apresentação de apenas algumas pistas durante a sessão de reativação poderia levar a uma reativação parcial da memória (FORCATO et al., 2009), o que explicaria, em última análise, o prejuízo transitório da reconsolidação visto por alguns grupos de pesquisa (para revisão ver, ALBERINI, 2008). Considerando o exposto acima, consideramos que a presença do estímulo aversivo (em nosso caso os braços abertos do LCE) durante a segunda exposição seria capaz de reativar e consequentemente desestabilizar a memória.

Outro grupo controle nos protocolos para estudo da reconsolidação da memória é a memória de curta duração pós-reativação, que seria um estado transitório responsável por expressar a dada memória enquanto ela é reconsolidada (NADER; HARDT, 2009). De fato, manipulações que visam prejudicar a reconsolidação mantêm intacta a memória de curta duração demonstrada após a reativação em vários paradigmas comportamentais tais como: condicionamento de medo auditivo (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000), condicionamento de medo contextual em ratos (DEBIEC; LEDOUX; NADER, 2002) e camundongos (KIDA et al., 2002), reconhecimento de objetos (BOZON; DAVIS; LAROCHE, 2003). Assim, nossos resultados corroboram essa suposição, uma vez que animais que receberam infusão intra-HD após a reativação e foram re-submetidos ao LCE 3 h após não demonstraram qualquer resposta tanto ao tratamento central quanto ao tratamento sistêmico (MDZ). Além disso, já tem sido demonstrado que as MCD e MLD são entidades diferentes que recrutam mecanismos bioquímicos distintos, nos quais para memórias de curta duração não há envolvimento de síntese proteica ou síntese de RNA (IZQUIERDO et al., 2006; NADER; HARDT, 2009).

Em seguida, não foram encontradas alterações comportamentais quando a infusão de ANI se deu 6 h após a reativação. Esse resultado substancia o de trabalhos prévios que relatam que a reconsolidação da memória é um processo dinâmico e gradual que leva até 6 h após a reativação para se completar (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000; DUDAI, 2004) e que a injeção de inibidores de síntese proteica fora desse período não são efetivos.

Quanto à idade da memória, sabe-se que memórias remotas são menos susceptíveis a interferência quando reativadas (BEVILAQUA et al., 2008). Milekic e Alberini (2002) testaram essa hipótese investigando se o grau de vulnerabilidade da memória evocada muda em função do tempo entre o treino e a evocação. Como resultado, foi visto que memórias de 2 ou 7 dias de idade foram prejudicadas pela anisomicina enquanto memórias de 14 e 28 dias foram resistentes (ALBERINI, 2011). O mesmo perfil já havia sido observado em camundongos (SUZUKI et al., 2004).

De maneira análoga esses resultados foram reproduzidos durante nossos experimentos, no qual animais com um intervalo entre a primeira e a segunda exposição ao LCE de um ou sete dias demonstraram maior exploração aos braços abertos durante uma terceira exposição quando injetados ANI no HD e MDZ periféricamente. No entanto não houve

diferença significativa quando o intervalo entre a primeira e segunda exposição foi de 21 dias.

É apropriado ressaltar que a reativação de memórias mais remotas pode ser acompanhada por uma nova onda de síntese proteica, sendo a não efetividade da ANI nesses casos devido ao fato de essas novas proteínas não serem essenciais para a manutenção da memória (ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006). Outra justificativa cabe à natureza celular e molecular do processo no qual a memória utiliza para sua estabilização. Um ponto de vista dominante na hipótese do armazenamento da memória é que a consolidação é acompanhada pelo desenvolvimento de novas sinapses (BAILEY; KANDEL, 1993; GEINISMAN et al., 2001). Assim, acredita-se que, conforme passa o tempo após o treino e a consolidação vai se processando, há um aumento no número de sinapses que alcança um platô. Quando uma memória é reativada, um dado número dessas mesmas sinapses recém-formadas é rearranjado e assim, estas são desestabilizadas e reorganizadas no intuito de incorporar novas informações. Como resultado, se uma reativação ocorre próximo ao treino, ela pode potencialmente desestabilizar grande parte (talvez a maioria) dessas novas sinapses (ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006). Por outro lado, se a reativação é mais tardia, a proporção de sinapses a serem recrutadas e desorganizadas é menor. Conseqüentemente, com o passar do tempo, a vulnerabilidade da memória progressivamente diminui.

Outra hipótese a ser considerada é que ambas, tanto a consolidação inicial, quanto a reconsolidação, compartilham fisicamente um mesmo processo de codificação, no entanto temporalmente utilizam diferentes estruturas cerebrais, ou seja, com o passar do tempo, as modificações de circuitaria de armazenamento não necessitariam do hipocampo (AMBROGI-LORENZINI, 1999; WILTGEN et al., 2004). Ainda, pensando que a efetividade dos inibidores de síntese proteica é mais curta do que o período em que ainda existe uma vulnerabilidade da memória reativada nos faz acreditar que talvez outros fatores sejam mais relevantes no processo, como a ação moduladora hormonal ou ainda vias neuronais envolvendo outras áreas do cérebro (MCGAUGH, 2000; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; NADEL; GOMEZ; NEWMAN-SMITH, 2012).

A codificação inicial de uma memória ocorre através da formação de várias redes corticais associativas. O hipocampo integra informações a partir dessas redes e as distribui nos módulos corticais de acordo com a característica de cada memória. Posteriormente essas características são fundidas à traço de memória pré-existente. Com o passar do tempo e/ou

ativações dessa rede córtico-hipocampal há um fortalecimento das conexões corticais (até mesmo com o surgimento de novas). Desse modo, eventualmente essas memórias passam a ter seu processamento independente do hipocampo. Uma característica chave para este modelo seria que as conexões córtico-hipocampais seriam transitórias, enquanto as conexões corticais seriam duradouras (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). Esse fenômeno explicaria o resultado encontrado em nossas condições experimentais.

6 CONCLUSÃO

A inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal de ratos após a segunda exposição ao labirinto em cruz elevado prejudica a reconsolidação da memória relacionada à tolerância ao midazolam, visualizado pelo aumento da exploração dos braços abertos em uma terceira exposição ao aparato.

Além do uso do LCE para o estudo das etapas clássicas de formação de memórias aversivas, o presente trabalho adiciona a possibilidade do estudo da etapa da reconsolidação, reforçando o uso desse protocolo experimental no estudo da dinâmica de formação das memórias.

REFERÊNCIAS

ADAMEC, R.E.; BLUNDELL, J.; BURTON, P. Phosphorylated cyclic AMP response element binding protein expression induced in the periaqueductal gray by predator stress: its relationship to the stress experience, behavior and limbic neural plasticity. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.27, p.1243–1267. 2003.

ADAMEC, R.E.; BLUNDELL, J.; COLLINS, A. Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v.25, p.721-744. 2001.

ADAMEC, R.; KENT, P.; ANISMAN, H.; SHALLOW, T.; MERALI Z. Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals—implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.23, p.301-318. 1998.

ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M.A.; GORDON, J.A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, v.65, p.257-269. 2010.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Cerebral Cortex**, v.16, p.1759-1765. 2006.

ALBERINI, C.M. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89(3), p.234-246. 2008.

ALBERINI, C.M. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.7, p.5-12. 2011.

ALBERINI, C.M.; MILEKIC, M.H.; TRONEL, S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.63, p. 999-1008. 2006.

ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M.C.; FRANCI, C.R.; BRANDÃO, M.L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Hormones and Behavior**, v.52(2), p.267-273. 2007.

ALLISON, C.; PRATT, J.A. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. **Pharmacology and Therapeutics**, v.98(2), p.171-195. 2003.

ALVAREZ, E.O.; BANZAN, A.M. The activation of histamine-sensitive sites of the ventral hippocampus modulates the consolidation of a learned active avoidance response in rats. **Behavioural Brain Research**, v.189, p.92-99. 2008.

AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v.31(3), p.571-591. 1989.

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

ANAGNOSTARAS, S.G.; GALE, G.D.; FANSELOW, M.S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, v.11(1), p.8-17. 2001.

ANDREATINI, R.; VITAL, M.A.B.F.; SANTOS, G.L. The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plus-maze. **European Neuropsychopharmacology**, v.13(4), p.S378-379. 2003.

ANDRADE, T.G.; SILVA, A.M.; SILVA, C.L.; GRAEFF, F.G. Effect of electrolytic lesion of the median raphe nucleus on behavioral and physiological measures of stress. **Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana**. v.49, p.279-289. 1999.

ARTINIAN, J.; DE JAEGER, X.; FELLINI, L.; DE SAINT BLANQUAT, P.; ROULLET, P. Reactivation with a simple exposure to the experimental environment is sufficient to induce

reconsolidation requiring protein synthesis in the hippocampal CA3 region in mice. **Hippocampus**, v.17, p.181-191. 2007.

ARTINIAN, J.; MCGAURAN, A.M.; DE JAEGER, X.; MOULEDOUS, L.; FRANCES, B.; ROULLET, P. Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. **European Journal of Neuroscience**, v.27, p.3009-3019. 2008.

BAILEY, C.H.; KANDEL, E.R. Structural changes accompanying memory storage. **Annual Review of Physiology**, v.55, p.397-426. 1993.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus: memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28(3), p.273-283. 2004.

BAST, T.; ZHANG, W.N.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats, different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA_A agonist muscimol. **Experimental Brain Research**, v.139, p.39-52. 2001.

BERTOGLIO, L.J.; ANZINI, C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; CAROBREZ, A.P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Behavioural Brain Research**, v.162(1), p.99-107. 2005.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.73(4), p.963-969. 2002a.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. **Psychopharmacology**, v.170(4), p.335-342. 2003.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during

diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. **Behavioural Brain Research**, v.132(2), p.135-143. 2002b.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.108(2), p.197-203. 2000.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.72(1-2), p.449-455. 2002c.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. **Behavioural Pharmacology**, v.15(1), p.45-54. 2004.

BERTOGLIO, L.J.; JOCA, S.R.; GUIMARÃES, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v.175(1), p.183-188. 2006.

BESNARD, A.; CABOCHE, J.; LAROCHE, S. Reconsolidation of memory: a decade of debate. **Progress in Neurobiology**, v.99, p.61-80. 2012.

BEVILAQUA, L.R.; MEDIA, H.J.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Reconsolidation and the fate of consolidated memories. **Neurotoxicity Research**, v.14(4), p.353-358. 2008.

BONINI, J.S.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, v.147, p.37-45. 2007.

BOZON, B.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. **Neuron**, v.40, p.695-701. 2003.

BURMAN, M.A.; STARR, M.J.; GEWIRTZ, J.C. Dissociable effects of hippocampus lesions on expression of fear and trace fear conditioning memories in rats. **Hippocampus**, v.16, p.103–113. 2006.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. Goodman and Gilman's. **The pharmacological basis of therapeutics**. 12th ed. The McGraw-Hill, California, 2011.

CALABRESE E.J. An assessment of anxiolytic drugs screening tests: hormetic dose responses predominate. **Critical Reviews in Toxicology**, v.38, p. 489-542. 2008.

CARBALLO-MÁRQUEZ, A.; VALE-MARTÍNEZ, A.; GUILLANZO-BLANCH, G.; MARTÍ-NICOLOVIUS, M. Muscarinic receptor blockade in ventral hippocampus and prelimbic cortex impairs memory for socially transmitted food preference. **Hippocampus**, v.19, p.446-455. 2009.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29(8), p.1193-1205. 2005.

CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v.25(7), p.697-709. 2001.

CENQUIZCA, L.A.; SWANSON, L.W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v.56(1), p.1-26. 2007.

CHEUNG, T.H.; CARDINAL, R.N. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. **BMC Neuroscience**, v.6, p.36-60. 2005.

CZERNIAWSKI, J.; YOON, T.; OTTO, T. Dissociating space and trace in dorsal and ventral hippocampus. **Hippocampus**, v.19, p.20-32. 2009.

DAL-CÓL, M.L.; PEREIRA, L.O.; ROSA, V.P.; CALIXTO, A.V.; CAROBREZ, A.P.; FARIA, M.S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1.

Pharmacology, Biochemistry, and Behavior, v.74(2), p.395-400. 2003.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus**, v.18, p.29–39. 2008.

DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P.; STANHOPE, K.J.; IVERSEN, S.D.; TRICKLEBANK, M.D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology**, v.113(3-4), p.570-572. 1994.

DEBIEC, J.; DOYÈRE, V.; NADER, K.; LEDOUX, J. Directly reactivated, but not indirectly reactivated, memories undergo reconsolidation in the amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103(9), p.3428-3433. 2006.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J.E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v.36, p.527-538. 2002.

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Current Opinion in Neurobiology**, v.16, p.174-178. 2006.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual Review of Psychology**, v.55, p.51-86. 2004.

DUVARCI, S.; NADER, K. Characterization of fear memory reconsolidation. **The Journal of Neuroscience**, v.24(42), p.9269-9275. 2004.

EISENBERG, M.; DUDAI, Y. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in medaka: old fears don't die. **The European Journal of Neuroscience**, v.20(12), p.3397-3403. 2004.

EISENBERG, M.; KOBILO, T.; BERMAN, D.E.; DUDAI, Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. **Science**, v.301, p.1102-1104. 2003.

ESCARABAJAL, M.D.; TORRES, C.; FLAHERTY, C.F. The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. **Life Sciences**, v.73, p.1063-1074. 2003.

FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v.65(1), p.7-19. 2010.

FILE, S.E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology**, v.100(2), p.281-282. 1990.

FILE, S.E.; ANDREWS, N.; WU, P.Y.; ZHARKOVSKY, A.; ZANGROSSI, H. Jr. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. **European Journal of Pharmacology**, v.218(1), p.9-14. 1992.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, v.19(5), p.397-405. 1998.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; GALLANT, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v.21(2), p.312-320. 1999.

FILE, S.E.; MABBUTT, P.S.; HITCHCOTT, P.K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.102(1), p.98-101. 1990.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. Jr. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology**, v.110(1-2), p.240-244. 1993.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. Jr.; SANDERS, F.L.; MABBUTT, P.S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.113(3-4), p.543-546. 1994.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. Jr; VIANA, M.; GRAEFF, F.G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology**, v.111(4), p.491-494. 1993.

FINNIE, P.S.B.; NADER, K. The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.36, p.1667-1707. 2012.

FORCATO, C.; ARGIBAY, F.P.; PEDREIRA, M.E.; MALDONADO, H. Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: the relevance of the reminder structure. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.91, p.50-57. 2009.

FRANKLAND, P.W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v.6(2), p.119-130. 2005.

FRANKLAND, P.W.; DING, H.K.; TAKAHASHI, E.; SUZUKI, A.; KIDA, S.; SILVA, A.J. Stability of recent and remote contextual fear memory. **Learning and Memory**, v.13, p.451-457. 2006.

GAZARINI, L.; STERN, C.A.; BERTOGLIO, L.J. Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience. **Neuroscience**, v.14, p. 179-187. 2011.

GEINISMAN, Y.; BERRY, R.W.; DISTERHOFT, J.F.; POWER, J.M.; VAN DER ZEE, E.A. Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. **The Journal of Neuroscience**, v.21, p.5568-5573. 2001.

GELINAS, J.N.; NGUYEN, P.V. Beta-adrenergicreceptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.3294-3303. 2005.

GOTTHARD, G.H.; KNOPPEL, A.B. Cycloheximide produces amnesia for extinction and reconsolidation in an appetitive odor discrimination task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.93, p.127-131. 2010.

GRUEST, N.; RICHER, P.; HARS, B. Memory consolidation and reconsolidation in the rat pup require protein synthesis. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p.10488-10492. 2004.

HALLER, J.; ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Current Opinion in Psychiatry**, v.25, p.59-64. 2012.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg's. **Archives of Pharmacology**, v.327(1), p.1-5. 1984.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.23(7), p.971-980. 1999.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.60(2), p.473-488. 1998.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2.ed, Porto Alegre: Artmed. 2011.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v.29(9), p.496-505. 2006.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J.L. Behavioural Pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**, v.11, p.517-534. 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.68(3), p.285-316. 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v.103(1), p.1-11. 1999.

JARDIM, M.C.; GUIMARAES, F.S. GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.69, p.579-584. 2001.

JOBIM, P.F.; PEDROSO, T.R.; WERENICZ, A.; CHRISTOFF, R.R.; MAURMANN, N.; REOLON, G.K.; SCHRODER, N.; ROESLER, R. Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. **Behavioural Brain Research**, v.228, p.151-158. 2012.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of Neural Sciences**. 4th ed, New York: McGraw-Hill. 2000.

KELLY, A.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **The Journal of Neuroscience**, v.23, p.5354-5360. 2003.

KESNER, R.P.; HUNSAKER, M.R.; ZIEGLER, W. The role of the dorsal and ventral hippocampus in olfactory working memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.96(2), p.361-366. 2011.

KIDA, S.; JOSSELYN, S.A.; PEÑA, O.S.; KOGAN, J.H.; CHEVERE, I.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nature Neuroscience**, v.5, p.348-355. 2002.

KIM, R.; MOKI, R.; KIDA, S. Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. **Molecular Brain**, v.4, p.9-13. 2011.

KJELSTRUP, K.G.; TUVNES, F.A.; STEFFENACH, H.A.; MUSISON, R.; MOSER, E.; MOSER, M.B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v.99(16), p.10825-10830. 2002.

KOBILO, T.; HAZVI, S.; DUDAI, Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. **The European Journal of Neuroscience**, v.25, p.3417-3421. 2007.

LABAR, K.S., CABEZA, R. Cognitive neuroscience of emotional memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7(1), p.54-64. 2006.

LACROIX, L.; SPINELLI, S.; HEIDBREDER, C.A.; FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v.114, p.1119-1130. 2000.

LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; SILVEIRA, R.; MORATO, S.; WALSH, T.J. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v.117, p.97-105. 2000.

LANGUILLE, S.; DAVIS, S.; RICHER, P.; ALCACER, C.; LAROCHE, S.; HARS, B. Extracellular signal-regulated kinase activation is required for consolidation and reconsolidation of memory at an early stage of ontogenesis. **The European Journal of Neuroscience**, v.30, p.1923-1930. 2009.

LEE, J.L. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. **Nature Neuroscience**, v.11, p.1264-1266. 2008.

LEE, J.L. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Trends in Neurosciences**, v.32, p.413-420. 2009.

LEE, J.L.; EVERITT, B.J. Appetitive memory reconsolidation depends upon NMDA receptor-mediated neurotransmission. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.90, p.147-154. 2008.

LEE, J.L.; CIANO, P.D.; THOMAS, K.L.; EVERITT, B.J. Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. **Neuron**, 47(6), p.795-801. 2005.

LEE, J.L.; EVERITT, B.J.; THOMAS, K.L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, v.304, p.839-843. 2004.

LISTER, R.G. Ethologically based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v.46, p.321-340. 1990.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92(2), p.180-5. 1987.

LORENTE DE NO, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*, v.46, p.113-77. 1934, *apud* O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press. 1978.

MAMOU, B.C.; GAMACHE, K.; NADER, K. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. **Nature Neuroscience**, v.9, p.1237-1239. 2006.

MAROUN, M.; AKIRAV, I. Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. **Neuropsychopharmacology**, v.33, p.394-405. 2008.

MAROUN, M.; AKIRAV, I. Differential involvement of dopamine D1 receptor and MEK signaling pathway in the ventromedial prefrontal cortex in consolidation and reconsolidation of recognition memory. **Learning and Memory**, v.16, p.243-247. 2009.

MCGAUGH, J.L. Memory: a century of consolidation. **Science**, v.287(5451), p.248-251. 2000.

MILEKIC, M.H.; ALBERINI, C.M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, v.36, p.521-525. 2002.

MILTON, A.L.; LEE, J.L.; EVERITT, B.J. Reconsolidation of appetitive memories for both natural and drug reinforcement is dependent on β -adrenergic receptors. **Learning and Memory**, v.15, p.88-92. 2008.

MISANIN, J.R.; MILLER, R.R.; LEWIS, D.J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of consolidated memory trace. **Science**, v.160, p. 554-555. 1968.

MISHIMA, K.; IWASAKI, K.; TSUKIKAWA, H.; MATSUMOTO, Y.; EGASHIRA, N.; ABE, K.; EGAWA, T.; FUJIWARA, M. The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.84, p.163-173. 2000.

MORRIS, R.G.M.; INGLIS, J.; AINGE, J.A.; OLVERMAN, H.J.; TULLOCH, J.; DUDAI, Y.; KELLY, P.A.T. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. **Neuron**, v.50, p.479-489. 2006.

MOSER, M.B.; MOSER, E. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v.8, p.608-619. 1998.

MOSER, E.; MOSER, M.B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **The Journal of Neuroscience**, v.13 (9), p.3916-3925. 1993.

MOSER, M.B.; MOSER, E.I.; FORREST, E.; ANDERSEN, P.; MORRIS, R.G. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92(21), p.9697-9701. 1995.

NADEL, L.; HARDT, O. Update on memory systems and processes. **Neuropsychopharmacology**, v.36, p. 251-273. 2011.

NADEL, L.; HUPBACH, A.; GOMEZ, R.; NEWMAN-SMITH, K. Memory formation, consolidation and transformation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.36(7), p.1640-1645. 2012.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends in neurosciences**, v.26(2), p.65-72. 2003.

- NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10(3), p.224-234. 2009.
- NADER, K.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. The labile nature of consolidation theory. **Nature Reviews Neuroscience**, v.1(3), p.216-219. 2000.
- NEVES, G.; COOK, S.F.; BLISS, T.V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9, p.65-75. 2008.
- NUNES-DE-SOUZA, V.; NUNES-DE-SOUZA, R.; RODGERS, R.J.; CANTO-DE-SOUZA, A. Blockade of 5-HT₂ receptors in the periaqueductal grey matter (PAG) abolishes the anxiolytic-like effect of 5-HT_{1A} receptor antagonism in the median raphe nucleus in mice. **Behavioural Brain Research**, v.225, p.547-553. 2011.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press. 1978.
- PACKARD, M.G.; CAHILL, L. Affective modulation of multiple memory systems. **Current Opinion in Neurobiology**, v.11(6), p.752-756. 2001.
- PARSONS, R.G.; GAFFORD, G.M.; BARUCH, D.E.; RIEDNER, B.A.; HELMSTETTER, F.J. Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. **The European Journal of Neuroscience**, v.23, p.1853-1859. 2006.
- PARSONS, R.G.; RESSLER, K.J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nature Neuroscience**, v.16, p.146-153. 2013.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press. 2009.
- PEDREIRA, M.E.; PÉREZ-CUESTA, L.M.; MALDONADO, H. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. **Learning and Memory**, v.11, p.579-585. 2004.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14(3), p.149-167. 1985.

PENG, J.Y.; LI, B.M. Protein synthesis is essential not only for consolidation but also for maintenance and post-retrieval reconsolidation of acrobatic motor skill in rats. **Molecular Brain**, v.28, p.2-12. 2009.

PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, C.D.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R.J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **European Journal of Neuroscience**, v.23, p.2185-2196. 2006.

PINHEIRO, S.H.; ZANGROSSI, H. Jr.; DEL-BEM, C.M.; GRAEFF, F.G. Elevated mazes as animal model of anxiety: effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79(1), p.71-85. 2007.

PITKANEN, A.; PIKKARAINEN, M.; NURMINEN, N.; YLINEN, A. Reciprocal connections between the amygdale and hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.911, p.369-391. 2000.

PRATCHETT, L.C.; DALY, K.; BIERER, L.M.; YEHUDA, R. New approaches to combining pharmacotherapy and psychotherapy for posttraumatic stress disorder. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.15, p.2339-2354. 2011.

PURVES, D.; AUGUSTINI, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. **Neuroscience**. 3rd ed., Sunderland: Sinauer Associates. 2004.

RAMON Y CAJAL, S. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: A.Maloine. Reprinted (1955) Madrid: Instituto Ramon y Cajal. 1911, *apud* ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEF, J. **The hippocampus book**. Oxford: Oxford University Press. 2007.

RASMUSSEN, D.D.; MITTON, D.R.; GREEN, J.; PUCHALSKI, S. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.25, p.999-1005. 2001.

REIS, F.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; FRANCI, C.R.; BRANDÃO, M.L. Risk assessment behaviors associated with corticosterone trigger the defense reaction to social isolation in rats: role of the anterior cingulate cortex. **Stress**, v.15(3), p.318-328. 2012.

RICHMOND, M.A.; VEENMAN, B.P.L.; FELDON, J.; YEE, B.K.; RAWLINS, J.N.P.; BANNERMAN, D.M. Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. **Behavioral Neuroscience**, v.113, p. 1189-1203. 1999.

ROBINSON, M.J.F.; FRANKLIN, K.B.J. Central but not peripheral beta-adrenergic antagonism blocks reconsolidation for a morphine place preference. **Behavioural Brain Research**, v.182, p. 129-134. 2007.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L.H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.52 (4), p.805-813. 1995.

RODGERS, R.J.; HARVEST, H.; HASSALL, C.; KADDOUR, L.A. D-cycloserine enhances memory consolidation in the plus-maze retest paradigm. **American Psychological Association**, v.125(1), p.106-116. 2011.

RODGERS, R.J.; SHEPHERD, J.K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology**, v.113(2), p.237-242. 1993.

RODRIGUES-ORTIZ, C.J.; TORRE, P.G.; BENAVIDEZ, E.; BALLESTEROS, M.A.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Intrahippocampal anisomycin fusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89, p. 352-359. 2008.

ROGERS, J.L.; HUNSAKER, M.R.; KESNER, R.P. Effects of dorsal and ventral CA1 subregional lesions on trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.8, p.72-81. 2006.

ROSA, V.P.; VANDRESEN, N.; CALIXTO, A.V.; KOVALESKI, D.F.; FARIA, M.S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.67, p.177-182. 2000.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. **Learning and Memory**, v.13, p.431-440. 2006.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning and Memory**, v.14(1), p.36-46. 2007.

ROY, V.; CHAPILLON, P.; JELJELI, M.; CASTON, J.; BELZUNG, C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. **Psychopharmacology**, v.203(1), p.131-141. 2009.

RUDY, J.W.; BIEDENKAPP, J.C.; MOINEAU, J.; BOLDING, K. Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. **Learning and Memory**, v. 13(1), p.1-3. 2006.

RUDY, J.W.; MATUS-AMAT, P. The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, v. 119(1), p.154-163. 2005.

RUEDIGER, S.; SPIRIG, D.; DONATO, F.; CARONI, P. Goal-oriented searching mediated by ventral hippocampus early in trial-and-error learning. **Nature Neuroscience**, v.15(11), p.1563-1571. 2012.

RUNYAN, J.D.; DASH, P.K. Inhibition of hippocampal protein synthesis following recall disrupts expression of episodic-like memory in trace conditioning. **Hippocampus**, v.15, p.333-339. 2005.

SARA, S.J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learning and Memory**, v.7, p.73-84. 2000.

SANTINI, E.; GE, H.; REN, K.; PENA-DE-ORTIZ, S.; QUIRK, G.J. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p.5704-5710. 2004.

SETHY, V.H.; KUHAR, M.J.; ROTH, R.H.; VAN WOERT, M.H.; AGHAJANIAN, G.K. Cholinergic neurons: effect of acute septal lesions on acetylcholine and choline content of rat hippocampus. *Brain Research*, v.55, p.481-484. 1973, *apud* O'KEEFE J; NADEL L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press. 1978.

STERN, C.A.; CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.90(4), p.545-550. 2008.

STERN, C.A.; DO MONTE, F.H.M.; GAZARINI, L.; CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v.170, p.214-222. 2010.

SURIS, A.; SMITH, J.; POWELL, C.; NORTH, C.S. Interfering with the reconsolidation of traumatic memory: Sirolimus as a novel agent for treating veterans with posttraumatic stress disorder. **Annals of Clinical Psychiatry**, v.24, p.33-40. 2013.

SUZUKI, A.; JOSSELYN, S.A.; FRANKLAND, P.W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p.4787-4795. 2004.

SZAPIRO, G.; GALANTE, J.M.; BARROS, D.M.; STEIN, M.L.; VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, L.A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Molecular Mechanisms of Memory Retrieval. *Neurochemical Research*, v.27(11), p.1491-1498. 2002.

TEHOVNIK, E.J.; SOMMER, M.A. Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. **Journal of Neuroscience Methods**, v.74, p.17-26. 1997.

THOMPSON, C.L.; PATHAK, S.D.; JEROMIN, A.; NG, L.L.; MACPHERSON, C.R.; MORTRUD, M.T.; CUSICK, A.; RILEY, Z.L.; SUNKIN, S.M., BERNARD, A.; PUCHALSKI, R.B.; GAGE, F.H., JONES, A.R.; BAJIC, V.B.; HAWRYLYCZ, M.J.; LEIN, E. Genomic anatomy of the hippocampus. **Neuron**, v.60, p.1010-1021. 2008.

TORRAS-GARCIA, M.; LELONG, J.; TRONEL, S.; SARA, S.J. Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. **Learning and Memory**, v.12, p.18-22. 2005.

TREIT, D.; MENARD, J. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. **Behavioral Neuroscience**, v.111, p.653-658. 1997.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.44(2), p.463-469. 1993.

TRONSON, N.C.; TAYLOR, J.R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v.8(4), p.262-275. 2007.

VARGAS, K.M.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Amphetamine and pentylenetetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.30(8), p.1394-1402. 2006.

VIANNA, M.R.M.; SZAPIRO, G.; MCGAUGH, J.L.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98(21), p. 12251-12254. 2001.

WANG, S.H.; OSTLUND, S.B.; NADER, K; BALLEINE, B.W. Consolidation and reconsolidation of incentive learning in the amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.830-835. 2005.

WIBLE, A.P. Remembering to attend: The anterior cingulate cortex and remote memory. **Behavioural Brain Research**, no prelo. 2013.

WILTGEN, B.J.; BROWN, R.A.M.; TALTON, L.E.; SILVA, A.J. New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. **Neuron**, v.44, p.101-108. 2004.

WINTERS, B.D.; TUCCI, M.C.; DACOSTA-FURTADO, M. Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. **Learning and Memory**, v.16, p.545-553. 2009.

WINTERS, B.D.; TUCCI, M.C.; JACKLIN, D.L.; REID, J.M.; NEWSOME, J. On the dynamic nature of the engram: evidence for circuit-level reorganization of object memory traces following reactivation. **The Journal of Neuroscience**, v.31, p.17719-17728. 2011.

WOODS, S.C.; RAMSAY, D.S. Pavlovian influences over food and drug intake. **Behavioural Brain Research**, v.110(1-2), p.175-182. 2000.

YEHUDA, R. Clinical relevance of biologic findings in PTSD. **The Psychiatry Quarterly**, v.73(2), p. 123-133. 2002.

YEHUDA, R. Disease markers: molecular biology of PTSD. **Disease Markers**, v.30, p.61-65. 2011.

YEHUDA, R.; JOELS, M.; MORRIS, R.G. The memory paradox. **Nature Reviews Neuroscience**, v.12, p.837-839. 2010.

YOON, T.; OTTO, T. Differential contributions of the dorsal and ventral hippocampus in rats to trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.87, p.464-475. 2007.

ANEXO A

Coloração de Giemsa modificada

1. Hidratação das lâminas em cuba contendo água destilada – 2 baterias de 3 min cada;
2. Imersão em corante Giemsa modificado (GS1L, Sigma-Aldrich, EUA) por 6 min;
3. Lavagem rápida com água destilada;
4. Repetir passo 1;
5. Lavagem rápida com etanol 70%;
6. Lavagem rápida com etanol 95%;
7. Lavagem rápida com água destilada;
8. Imersão em etanol 100% - 3 baterias de 3 min cada;
9. Imersão em CitroSolv® - 2 baterias de 5 min cada;
10. Cobrir com *permount* ou *entellan* e lamínula.

ANEXO B

Análise estatística complementar

O presente anexo demonstra uma análise estatística adicional referente aos grupos experimentais 3-8. Conforme supracitado nenhum grupo apresentou diferença significativa durante as exposições anteriores aos tratamentos farmacológicos. Para confirmar esse ponto foi realizada uma ANOVA de uma via, na qual o fator independente foi o tratamento (central e sistêmico), desse modo, obtiveram-se quatro grupos (ANI-MDZ; ANI-veículo; veículo-MDZ e veículo-veículo). Adicionalmente a mesma análise foi realizada com os dados referentes à segunda exposição. Além disso, foi efetuada uma ANOVA de medidas repetidas (ANOVA MR), na qual foram analisadas as diferenças entre os comportamentos referentes à repetição, os dados comparados foram provenientes da primeira e da segunda exposição. Consideramos diferença estatística quando $P < 0,05$.

De maneira geral, conforme demonstrado abaixo, a ANOVA de uma via revela que todos os grupos, durante a primeira e durante a segunda exposição não demonstram diferenças significativas.

A ANOVA MR demonstra diferença significativa para o fator repetição referente os parâmetros %TA e %EA, no qual o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revela uma diminuição para ambos os parâmetros durante a segunda exposição em comparação com a primeira (corroborando a literatura que relata que uma experiência prévia de 5 min no LCE resulta, em uma segunda exposição, esquiva adicional aos braços abertos) Cabe ressaltar que este resultado também foi visto para os grupos no qual o intervalo entre a primeira e segunda exposição foi de 7 ou 21 dias. Nenhuma diferença estatística foi observada para os parâmetros EF e PAR.

Experimento 3

Parâmetro	n	1ª Exposição ANOVA	2ª Exposição ANOVA	ANOVA MR
%TA	10-11	$F_{(3, 38)}=0,4;$ $P=0,74$	$F_{(3, 38)}=1,0;$ $P=0,37$	$F_{(1, 38)}=67,94;$ $P=0,001$
%EA	10-11	$F_{(3, 38)}=1,0;$ $P=0,39$	$F_{(3, 38)}=1,1;$ $P=0,35$	$F_{(1, 38)}=71,94;$ $P=0,001$
PAR	10-11	$F_{(3, 38)}=1,0;$ $P=0,40$	$F_{(3, 38)}=1,1;$ $P=0,32$	$F_{(1, 38)}=0,05;$ $P=0,98$
EF	10-11	$F_{(3, 38)}=1,0;$ $P=0,36$	$F_{(3, 38)}=1,2;$ $P=0,28$	$F_{(1, 38)}=1,06;$ $P=0,30$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

Experimento 4

Parâmetro	n	1ª Exposição ANOVA	2ª Exposição ANOVA	ANOVA MR
%TA	9-10	$F_{(3, 33)}=0,21;$ $P=0,88$	$F_{(3, 33)}=2,73;$ $P=0,07$	$F_{(1, 33)}=42,24;$ $P=0,001$
%EA	9-10	$F_{(3, 33)}=0,53;$ $P=0,66$	$F_{(3, 33)}=2,76;$ $P=0,07$	$F_{(1, 33)}=128,59;$ $P=0,001$
PAR	9-10	$F_{(3, 33)}=2,27;$ $P=0,09$	$F_{(3, 33)}=1,36;$ $P=0,26$	$F_{(1, 33)}=0,52;$ $P=0,47$
EF	9-10	$F_{(3, 33)}=2,66;$ $P=0,06$	$F_{(3, 33)}=0,41;$ $P=0,74$	$F_{(1, 33)}=0,75;$ $P=0,39$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

Experimento 5*

Parâmetro	N	1ª Exposição ANOVA
%TA	9	$F_{(3, 32)}=0,59; P=0,62$
%EA	9	$F_{(3, 32)}=0,66; P=0,57$
PAR	9	$F_{(3, 32)}=0,60; P=0,61$
EF	9	$F_{(3, 32)}=0,31; P=0,8$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados. *Este grupo não foi submetido ao LCE durante a segunda exposição.

Experimento 6

Parâmetro	n	1ª Exposição ANOVA	2ª Exposição ANOVA	ANOVA MR
%TA	7-8	$F_{(3,26)}=0,25;$ $P=0,85$	$F_{(3,26)}=1,3;$ $P=0,27$	$F_{(1,26)}=33,2;$ $P=0,001$
%EA	7-8	$F_{(3,26)}=0,90;$ $P=0,45$	$F_{(3,26)}=1,66;$ $P=0,19$	$F_{(1,26)}=65,1;$ $P=0,001$
PAR	7-8	$F_{(3,26)}=0,5;$ $P=0,62$	$F_{(3,26)}=0,76;$ $P=0,5$	$F_{(1,26)}=2,31;$ $P=0,13$
EF	7-8	$F_{(3,26)}=0,07;$ $P=0,9$	$F_{(3,26)}=0,20;$ $P=0,89$	$F_{(1,26)}=3,12;$ $P=0,07$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

Experimento 7A

Parâmetro	n	1ª Exposição ANOVA	2ª Exposição ANOVA	ANOVA MR
%TA	7-9	$F_{(3,26)}=0,25;$ $P=0,85$	$F_{(3,26)}=1,3;$ $P=0,27$	$F_{(1,26)}=33,2;$ $P=0,01$
%EA	7-9	$F_{(3,26)}=0,90;$ $P=0,45$	$F_{(3,26)}=1,6;$ $P=0,19$	$F_{(1,26)}=65,1;$ $P=0,01$
PAR	7-9	$F_{(3,26)}=0,58;$ $P=0,62$	$F_{(3,26)}=0,76;$ $P=0,52$	$F_{(1,26)}=2,31;$ $P=0,13$
EF	7-9	$F_{(3,26)}=0,07;$ $P=0,97$	$F_{(3,26)}=0,20;$ $P=0,89$	$F_{(1,26)}=3,12,;$ $P=0,07$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

Experimento 7B

Parâmetro	n	1ª Exposição ANOVA	2ª Exposição ANOVA	ANOVA MR
%TA	7-8	$F_{(3,27)}=0,1;$ $P=0,8$	$F_{(3,27)}=0,76;$ $P=0,52$	$F_{(1,27)}=23,3;$ $P=0,01$
%EA	7-8	$F_{(3,27)}=0,36;$ $P=0,7$	$F_{(3,27)}=2,06;$ $P=0,14$	$F_{(1,27)}=2,83;$ $P=0,1$
PAR	7-8	$F_{(3,27)}=0,28;$ $P=0,83$	$F_{(3,27)}=1,0;$ $P=0,37$	$F_{(1,27)}=3,3;$ $P=0,06$
EF	7-8	$F_{(3,27)}=0,64;$ $P=0,59$	$F_{(3,27)}=1,5;$ $P=0,23$	$F_{(1,27)}=3,4;$ $P=0,06$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

Experimento 8A

Parâmetro	n	1ª Exposição ANOVA	2ª Exposição ANOVA	ANOVA MR
%TA	6-8	$F_{(3,24)}=1,43;$ $P=0,25$	$F_{(3,24)}=0,71;$ $P=0,55$	$F_{(1,24)}=29,3;$ $P=0,001$
%EA	6-8	$F_{(3,24)}=1,95;$ $P=0,14$	$F_{(3,24)}=0,98;$ $P=0,41$	$F_{(1,24)}=6,89;$ $P=0,015$
PAR	6-8	$F_{(3,24)}=0,89;$ $P=0,45$	$F_{(3,24)}=0,50;$ $P=0,68$	$F_{(1,24)}=0,02;$ $P=0,86$
EF	6-8	$F_{(3,24)}=0,50;$ $P=0,68$	$F_{(3,24)}=3,23;$ $P=0,06$	$F_{(1,24)}=0,99;$ $P=0,32$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

Experimento 8B

Parâmetro	n	1ª Exposição ANOVA	2ª Exposição ANOVA	ANOVA MR
%TA	7-9	$F_{(3,28)}=0,28;$ $P=0,83$	$F_{(3,28)}=2,76;$ $P=0,06$	$F_{(1,28)}=42,2;$ $P=0,001$
%EA	7-9	$F_{(3,28)}=0,56;$ $P=0,64$	$F_{(3,28)}=2,46;$ $P=0,11$	$F_{(1,28)}=29,9;$ $P=0,001$
PAR	7-9	$F_{(3,28)}=0,12;$ $P=0,94$	$F_{(3,28)}=1,41;$ $P=0,25$	$F_{(1,28)}=0,38;$ $P=0,54$
EF	7-9	$F_{(3,28)}=1,10;$ $P=0,36$	$F_{(3,28)}=0,33;$ $P=0,73$	$F_{(1,28)}=2,77;$ $P=0,10$

Legenda: %TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.